



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

**BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS
CONTAMINADOS CON
HIDROCARBUROS EN CLIMA FRÍO
Y TEMPLADO.
ENSAYO Y EVALUACIÓN DE
DISTINTAS ESTRATEGIAS**

Lic. Romina Laura Dias
Tesis Doctoral 2011

Director: Dr Walter P. Mac Cormack
Co-Director: Dra María Teresa Del Panno

Lugar de trabajo

Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones
Industriales-CINDEFI
Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de la Plata

Director: Dr Walter P. Mac Cormack
Co-Director: Dra María Teresa Del Panno

Agradecimientos

- ◆ A mi director Walter que siempre estuvo presente cuando lo necesite y siempre me brindó su apoyo, su conocimiento y su tiempo con mucho entusiasmo. Por su confianza, humor, respeto y paciencia desde el principio y a lo largo de estos años. Gracias!
- ◆ A mi co-directora Tere, que siempre estuvo al pie del cañón conmigo, siempre presente con su aliento, su sonrisa y buenas vibras ante los buenos momentos y no tan buenos. Por su confianza, amor, amistad, aliento constante y tiempo. Gracias por tanto Tere!
- ◆ A mi familia hermosa que forma parte de mi corazón y que siempre está ahí firme en todos los momentos de mi vida, brindándome su aliento, amor, apoyo, paciencia y todo lo que soy. Gracias Ma por ser incondicional!
- ◆ A Nachis ya que soy afortunada de estar a su lado, gracias por tu amor, tu bella energía, tus sonrisas, tu paciencia, tu apoyo, tu aliento, por todo todo. Sos un sol.
- ◆ A mis amigas del corazón, Lau, Jesi, Naty, Esty, Romi y Clau como las quiero! Gracias por todo lo que me brindan, gracias por su amistad hermosa!
- ◆ A mis compañeros de laboratorio de la Plata, Lau, Ani, Bibi, Clau, Agus, Jorge, Sabri, Fla, Diego, Manue, Vero e Irma, gracias por la paciencia, por entenderme, por escucharme y alentarme siempre. A todos mis compañeros de los otros grupos y al personal técnico y administrativo del CINDEFI, gracias!
- ◆ A mis compañeros de laboratorio de la UBA, FFyB, cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología, Lucas, Edy, Sil y Susana, gracias por su compañía, guía y ayuda en algunos ensayos en el laboratorio y a campo en la Base Jubany! y a todos mis compañeros de los otros grupos que también forma parte de la cátedra. A José Luis por su buena onda, apoyo y ayuda en el análisis de las secuencias. Gracias Edy por tu amistad y tu ayuda en estadística!
- ◆ Al Instituto Antártico Argentino por permitirme acudir a las 4 campañas de verano en la Base Jubany para realizar los experimentos que describo en esta tesis y consecuentemente por sumar momentos y experiencias únicas e inolvidables que formaran parte de mí por siempre. Al grupo de amigos antárticos genios que conocí en las campañas, en especial a Arie, Carlis, Martita, Lu, Mary, Eduín, Dolo, Paz y el Negro.
- ◆ Al CINDEFI y a la cátedra de Biotecnología Industrial y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, por darme un lugar y permitirme realizar parte de esta tesis.
- ◆ A la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado las becas para realizar este trabajo de tesis.

Gracias a todos!!!!

Índice

I. Introducción	
I.A. La contaminación con hidrocarburos: un problema alarmante.....	1
I.B. El suelo.....	2
I.B.1. Estructura y componentes del suelo.....	2
I.B.2. Estudio de la diversidad microbiana.....	5
I.B.3. Suelos contaminados con hidrocarburos.....	7
I.B.3.1. Suelos contaminados con hidrocarburos en la Antártida.....	9
I.C. Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos.....	12
I.C.1. Técnicas disponibles para eliminar hidrocarburos	12
I.C.2. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos: una tecnología amigable.....	14
I.C.2.1. Factores que condicionan la biorremediación de un suelo.....	15
I.C.2.2. Bioestimulación.....	17
I.C.2.3. Bioaumento.....	18
I.C.2.3. Utilización de surfactantes.....	19
I.C.2.4. Biorremediación en áreas de clima frío.....	20
II. Hipótesis y objetivos.....	23
III. Materiales y Métodos	
III.A. Materiales.....	25
III.A.1. Tierras.....	25
III.A.2. Medios de cultivo.....	31
III.A.3. Cepas y consorcios bacterianos.....	35
III.A.4. Soportes para inmovilización.....	35
III.A.5. Nutrientes.....	35
III.B. Metodología.....	36
III.B.1. Preparación de los inóculos.....	36
III.B.2. Preparación e inmovilización del inóculo en los distintos soportes.....	37
III.B.3. Determinación de la capacidad degradadora de hidrocarburos.....	38

III.B.4. Caracterización microscópica.....	39
III.B.5. Determinación de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana.....	40
III.B.6. Determinación de la adhesión de las células bacterianas a partículas de suelo.....	41
III.B.7. Determinación de la capacidad quimiotáctica.....	42
III.B.8. Determinación de la capacidad de formación de biofilm en una superficie inerte.....	42
III.B.9. Preparación de los microcosmos de suelo.....	43
III.B.10. Determinación del contenido de humedad, medida del pH y de la temperatura.....	55
III.B.11. Recuento de microorganismos viables.....	55
III.B.12. Cuantificación de hidrocarburos totales.....	57
III.B.13. Actividad microbiana mediante la enzima deshidrogenasa.....	58
III.B.14. Perfiles de Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE) a partir del gen del ARNr 16S.....	59
III.B.15. Clonación y secuenciación.....	61
III.B.16. Análisis de secuencias.....	62
III.B.17. Índices de biodiversidad.....	63
III.C. Análisis estadístico.....	63

Resultados y discusión

IV. Bioestimulación en suelo proveniente de clima frío. Efecto del agregado de nutrientes sobre la degradación de gas oil en tierra crónicamente contaminada.

IV.A. Introducción.....	64
IV.B. Ensayo de bioestimulación utilizando parcelas como diseño experimental	64
IV.B.1. Evolución de las poblaciones cultivables, el pH y la temperatura.....	65
IV.B.2. Eliminación de hidrocarburos totales del suelo.....	70
IV.B.3. Dinámica de las comunidades bacterianas.....	72
IV.B.3.1. Análisis de la estructura de la comunidad por DGGE.....	72
IV.B.3.2. Estimación de la biodiversidad bacteriana.....	74
IV.B.3.3. Estimación de cambios poblacionales mediante análisis de componentes principales (ACP).....	75
IV.C. Ensayo de bioestimulación utilizando Biopilas como diseño experimental.....	77

IV.C.1. Ensayo I.....	77
IV.C.1.1. Actividad microbiana deshidrogenasa.....	78
IV.C.1.2. Evolución de las poblaciones cultivables, el pH y la temperatura.....	79
IV.C.1.3 Eliminación de hidrocarburos totales del suelo.....	85
IV.C.1.4. Dinámica de las comunidades bacterianas.....	87
IV.C.1.4.a. Análisis de la estructura de la comunidad por DGGE.....	87
IV.C.1.4.b. Estimación de la biodiversidad bacteriana.....	93
IV.C.1.4.c. Análisis filogenético.....	95
IV.C.2. Ensayo II.....	98
IV.C.2.1.Evolución de las poblaciones cultivables.....	99
IV.C.2.2. Eliminación de hidrocarburos totales del suelo.....	101
IV.C.2.3. Dinámica de las comunidades bacterianas.....	102
IV.C.2.3.a. Análisis de la estructura de la comunidad por DGGE.....	102
IV.C.2.3.b. Estimación de la biodiversidad bacteriana.....	104
IV.C.2.3.c. Análisis filogenético.....	105
IV.C.2.3.d. Estimación de cambios poblacionales mediante análisis de componentes principales (ACP).....	108
IV.D. Discusión.....	110

V. Bioestimulación en área de clima templado. Efecto del agregado de nutrientes sobre la degradación de gas oil en suelo crónicamente contaminado

V.A. Introducción.....	122
V.B. Microcosmos de suelo Polo petroquímico La Plata-Ensenada (I).....	122
V.B.1. Actividad microbiana deshidrogenasa.....	123
V.B.2. Evolución de las poblaciones cultivables.....	124
V.B.3. Eliminación de hidrocarburos totales del suelo	128
V.B.4. Dinámica de las comunidades bacterianas.....	129
V.B.4.1. Análisis de la estructura de la comunidad por DGGE.....	129
V.B.4.2. Análisis filogenético.....	134
V.C. Microcosmos de suelo Polo petroquímico La Plata-Ensenada (II).....	139
V.C.1. Actividad microbiana deshidrogenasa.....	139
V.C.2. Evolución de las poblaciones cultivables.....	140
V.C.3. Eliminación de hidrocarburos totales del suelo.....	142

V.C.4. Dinámica de las comunidades bacterianas.....	143
V.C.4.1. Análisis de la estructura de la comunidad por DGGE.....	143
V.D. Discusión.....	150

VI. Bioestimulación combinada con bioaumentación en área de clima frío. Efecto del agregado de nutrientes y de un inóculo sobre la degradación de gas oil en suelos antárticos contaminados

VI.A. Introducción.....	160
VI.B. Estudio de algunas propiedades de los inóculos.....	160
VI.B.1. Capacidad degradadora de hidrocarburos en MML suplementado con distintos hidrocarburos.....	161
VI.B.2. Caracterización mediante microscopía electrónica.....	164
VI.B.3. Propiedades de superficie: Medida del porcentaje de adhesión a partículas de suelo y del porcentaje de hidrofobicidad.....	168
VI.B.4. Capacidad quimiotáctica.....	169
VI.B.5. Formación de biofilm.....	172
VI.C. Ensayos de bioaumentación combinado con bioestimulación utilizando microcosmos en frascos como diseño experimental.....	173
VI.C.1. Ensayo preliminar en Antártida utilizando suelo crónicamente contaminado.....	173
VI.C.1.1. Evolución de las poblaciones cultivables.....	174
VI.C.2. Ensayo en los laboratorios de Buenos Aires.....	175
VI.C.2.1. Evolución de las poblaciones cultivables.....	176
VI.C.2.2. Eliminación de hidrocarburos totales del suelo.....	178
VI.C.3. Ensayo <i>on site</i> utilizando biopilas como diseño experimental.....	180
VI.C.3.1. Actividad microbiana deshidrogenasa.....	181
VI.C.3.2. Evolución de las poblaciones cultivables, el pH y la temperatura.....	183
VI.C.3.3. Eliminación de hidrocarburos totales del suelo.....	184
VI.C.3.4. Dinámica de las comunidades bacterianas.....	185
VI.C.3.4.a. Análisis de la estructura de la comunidad por DGGE.....	185
VI.C.3.4.b. Estudio de la biodiversidad bacteriana.....	188
VI.C.4. Ensayo de bioaumentación utilizando bateas como diseño experimental y un inóculo inmovilizado.....	189
VI.C.4.1. Evolución de las poblaciones cultivables y el pH.....	190

VI.C.4.2. Eliminación de hidrocarburos totales del suelo.....	193
VI.C.4.3. Observación microscópica (SEM) de las diferentes matrices utilizadas.....	194
VI.D. Discusión.....	197
VII. Conclusiones generales.....	207
VIII. Bibliografía.....	210

CAPÍTULO I

INTRODUCCION

I.A. La contaminación con hidrocarburos: un problema alarmante

El crecimiento demográfico y la industrialización amenazan continuamente nuestro ambiente. El resultado de esto es la acumulación de contaminantes químicos en la biosfera, especialmente en suelos y sedimentos. Para citar un ejemplo, Estados Unidos produce anualmente entre 5-20 millones de toneladas métricas de etileno, propileno, cloruro de vinilo, benceno y etilbenceno y 1-5 millones de toneladas de otros productos químicos orgánicos. También se producen aproximadamente 140 millones de toneladas de polímeros sintéticos en todo el mundo. Si solo el 1 % del crudo producido mundialmente ingresa al ambiente ya sea por derrames, eliminación de residuos o volatilización, esto equivale a 266 millones de barriles producidos anualmente.

Muchos químicos sintetizados en grandes volúmenes difieren en su estructura con los compuestos orgánicos naturales y resultan, por lo tanto, recalcitrantes para ser biodegradados. Por ejemplo el diesel es utilizado comúnmente para el transporte y la limpieza de máquinas. Este combustible es una mezcla compleja de n-alcanos, iso y cicloalcanos e hidrocarburos aromáticos. Particularmente los hidrocarburos aromáticos son de gran preocupación por su potencial carcinogénico y mutagénico (White, 2004). Debido a la importante utilización del diesel, se generan pérdidas en suelos y aguas subterráneas durante su almacenamiento, derrames accidentales durante su transporte (Figura I.1) o incluso durante vertidos ilegales. Al poseer una alta hidrofobicidad, baja volatilidad y solubilidad y alta absorción, resulta complicada su limpieza, especialmente en sistemas tan heterogéneos como el suelo (Atlas y Bartha, 1993; Nannipieri y col, 2002; Chia-Hsien y col, 2011). Esta información resulta alarmante y debería generar concientización y toma de medidas urgentes en cuanto a la generación y al tratamiento de estos residuos generados, para cuidado del medio ambiente y de la humanidad (Ward, 2004).

a)



Figura I.1. Imagen de ambientes contaminados con hidrocarburos. a) Aspecto de la costa luego de un derrame de petróleo en el mar.

I.B. El suelo

I.B.1. Estructura y componentes del suelo

El suelo se define como la parte superior de la corteza terrestre, y está compuesto por componentes minerales (meteorización de las rocas), componentes orgánicos (humus y derivados, biomasa viva y muerta), gas (aire en el espacio existente en los poros), y agua envolviendo partículas y el espacio capilar (Figura I.2). En términos generales, está formado por un 50 % de espacio libre (la mitad del espacio poroso ocupada por gases y la otra mitad por líquidos); un 40-50 % de sólidos minerales (meteorización de las rocas) y un 0,5-5% de materia orgánica (humus y derivados, biomasa viva y muerta) (Brock y Madigan, 2000). El suelo constituye la interfaz entre la tierra, el aire y el agua, lo que le confiere la capacidad de desempeñar tanto funciones naturales como de uso antropogénico. Según las proporciones de arenas (2-0,05 mm de diámetro), limos (2-50 μm de diámetro), arcillas (inferior a 2 μm de diámetro) y materia orgánica, principalmente humus y derivados, existe una

gran variedad de tipos diferentes de suelos. Los componentes minerales y la materia orgánica se distribuyen en el espacio generando una estructura porosa. Los poros pueden contener agua o aire, de manera que existen tres fases: sólida, líquida y gaseosa. El agua contenida en los poros del suelo contiene sales minerales y nutrientes y es el medio en el cual se puede desarrollar la actividad metabólica de los microorganismos que lo colonizan. El contenido en agua de un suelo puede oscilar enormemente, afectando dicha actividad.

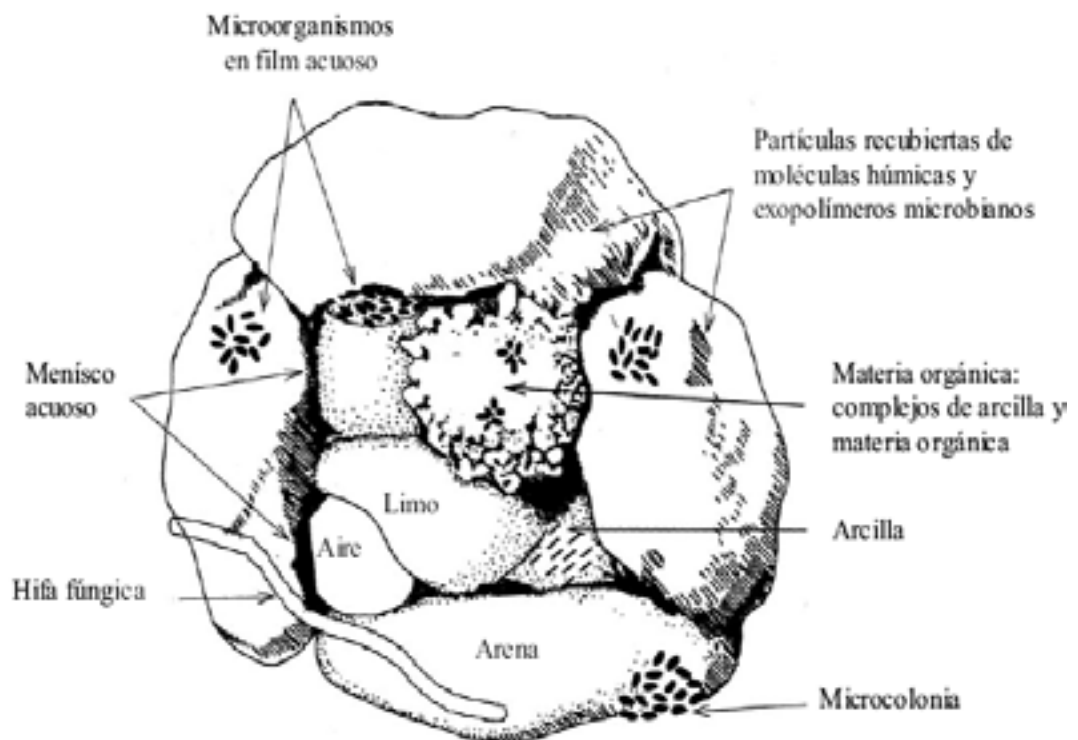


Figura I.2. Esquema de la disposición en el espacio de los agregados constituyentes de un suelo.

El suelo es fundamental e irremplazable; coordina el crecimiento de las plantas de los ecosistemas terrestres y mantiene los ciclos biogeoquímicos, ya que los microorganismos del suelo degradan virtualmente todos los componentes orgánicos, inclusive los compuestos

xenobióticos y polifenólicos persistentes. Las poblaciones que habitan el suelo incluyen a la macrofauna, mesofauna, microfauna y microflora. Cabe señalar que el 80-90 % de las reacciones biológicas en el suelo son mediadas por microorganismos (Nannipieri y Badaluco, 2003) siendo las bacterias y los hongos los que llevan a cabo estas reacciones. Es importante considerar distintos puntos que definen al suelo como una estructura compleja:

1. La población microbiana en el suelo es diversa. Torsvik y col., (1996) calculó la presencia de aproximadamente 6000 genomas bacterianos por gramo de suelo, tomando el tamaño del genoma de *Escherichia coli* como una unidad.

2. La organización estructural de las partículas del suelo confiere una heterogeneidad espacial para los microorganismos, los cuales viven en microhábitats (Stotzky, 1997). Las características químicas, físicas y biológicas de estos microhábitats difieren en tiempo y espacio, y su tamaño depende del tamaño del microorganismo. El espacio ocupado por microorganismos vivos representa una pequeña proporción del espacio disponible. Otra característica importante es la presencia de “hot spots”, o sea zonas de alta actividad biológica como los agregados que poseen propiedades fisicoquímicas especiales; zonas de alta acumulación de materia orgánica y la rizósfera. La ecología, actividad y la dinámica de los microorganismos del suelo puede verse afectada por varios factores ambientales como las fuentes de carbono y energía, los nutrientes minerales, los factores de crecimiento, la composición iónica, la disponibilidad acuosa, la temperatura, la presión, la composición del aire, la radiación electromagnética, el pH, el potencial de oxido-reducción, la superficie, las relaciones espaciales, la genética de los microorganismos y las relaciones entre ellos. Este hecho implica que en un suelo se puedan encontrar una gran variedad de poblaciones microbianas con capacidades metabólicas distintas, condicionadas también por la biodisponibilidad de las distintas fuentes de carbono y energía, que a su vez está condicionada por las características fisicoquímicas propias de cada suelo (Kästner, 2000b). Cabe señalar que casi el 80-90% de los microorganismos que viven en el suelo permanecen sobre superficies sólidas por medio de distintos mecanismos, entre ellos gracias a la producción de polisacáridos extracelulares que interactúan con las partículas de arcilla formando así fuertes complejos que persisten incluso luego de la muerte del microorganismo (Nannipieri y col. 2002).

3. La fase sólida tiene la propiedad de adsorber moléculas biológicas importantes como proteínas y ácidos nucleicos. Por ejemplo, algunas enzimas extracelulares pueden mantener su actividad siendo adsorbidas por minerales de la arcilla o atrapadas por los ácidos húmicos.

También el ADN puede ser adsorbido a estas estructuras manteniéndose su integridad, posibilitando de esta forma los procesos de transferencia de material genético (Transformación) (Pietramellara y col., 1997).

4. La superficie de los componentes minerales del suelo pueden catalizar muchas reacciones. Por ejemplo los minerales de las arcillas y Mn (III y IV) y el óxido de Fe (III) catalizan las reacciones de transferencia de electrones como la oxidación de fenoles y polifenoles con la formación de las sustancias húmicas (Nannipieri y col., 2003).

I.B.2. Estudio de la diversidad microbiana

La diversidad microbiana es un término general que comprende la diversidad genética, que es la cantidad y distribución de la información genética de las especies microbianas; la diversidad de las bacterias y los hongos que forman parte de las comunidades microbianas; y la diversidad ecológica, que es la variación en la estructura de las comunidades, la complejidad de las interacciones, el número de niveles tróficos y el número de agrupaciones. Así, la diversidad microbiana incluye el número de las distintas especies bacterianas y fúngicas (riqueza) y su abundancia relativa en la microflora del suelo (Kennedy y Smith, 1998).

Es importante tener en cuenta que solo un 1-10 % de los microorganismos del suelo son realmente cultivables. Los estudios clásicos de diversidad microbiana basados únicamente en el aislamiento de microorganismos representarían tan sólo una parte minoritaria de la diversidad real existente (Torsvik y col., 2003). Es probable que tan reducido margen de cultivo sea debido a la interdependencia entre microorganismos, a la imposibilidad de crear las condiciones ambientales que enfrentan realmente los microorganismos en el suelo, y también el hecho que algunos microorganismos son cultivables tan sólo bajo ciertas condiciones fisiológicas (Heuer y col., 2001).

Las técnicas dependientes de cultivo presentan una importante ventaja, que es la posibilidad de obtener cultivos puros, útiles para estudios posteriores, y permiten obtener información acerca de actividades metabólicas de interés. Entre las más aplicadas citamos: el cultivo en placa de microorganismos en medios sintéticos de laboratorio, la estimación del número más probable (NMP) que consiste en la siembra de diluciones seriadas de la muestra en un medio de cultivo líquido adecuado, y estimación del NMP, en base a la turbidez obtenida luego de un

tiempo de incubación; la siembra en policubetas de Ecoplate (Biolog®) que consiste básicamente en la inoculación de un volumen de una dilución adecuada de la muestra, en pocillos de una policubeta conteniendo diversos sustratos. La técnica permite estimar un perfil fisiológico de la comunidad, a través de la utilización de los sustratos, revelado por un indicador redox (El Fantroussi y col., 1999).

Actualmente, existen técnicas moleculares disponibles que ofrecen la posibilidad ampliar el marco de estudio y analizar la estructura, composición y cambio poblacional de las comunidades microbianas del suelo. Estas técnicas son independientes de cultivo y de acuerdo a su sensibilidad pueden ser aplicadas con diferentes fines, como el de detectar grupos taxonómicos. Entre estas técnicas, encontramos:

1. Análisis de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana (PLFA): se basa en el análisis de los componentes fosfolipídicos de las membranas celulares de los microorganismos del suelo. Esta técnica es útil para detectar cambios rápidos en la estructura de las comunidades microbianas, pero no para asignar afiliaciones filogenéticas en una mezcla ambiental. (Nannipieri y col., 2003).

2. Análisis de restricción de genes rRNA (ARDRA): se basa en la amplificación los genes rRNA mediante la reacción de PCR a partir del DNA total de una comunidad microbiana. Los fragmentos de DNA obtenidos por PCR, pueden ser clonados y analizados, o bien por restricción, o bien con el uso de sondas específicas, y finalmente, los clones pueden ser secuenciados (Viñas Canals, 2005).

3. Polimorfismo de longitud de los fragmentos terminales de restricción (T-RFLP): se utiliza para el análisis rápido y sensible de la diversidad de comunidades microbianas. Se utilizan los productos de PCR de genes rRNA, en los que se ha marcado con un agente químico fluorescente, uno de los 2 cebadores. Los productos son digeridos con enzimas de restricción y separados mediante una electroforesis capilar o en poliacrilamida, en un secuenciador de ADN. El tamaño de los diferentes fragmentos terminales es determinado mediante un detector de fluorescencia, generando perfiles reproducibles que caracterizan a la comunidad (Liu y col., 1997).

4. Hibridación in situ con sondas fluorescentes (FISH): Las moléculas de rRNA de las células se hibridan con sondas específicas marcadas con agentes químicos fluorescentes, directamente sobre la muestra previamente fijada y permeabilizada. Las células se visualizan en un microscopio de epifluorescencia pudiéndose comparar cuantitativamente la población total analizada con la población específica que hibrida con la sonda utilizada (Hicks y col., 1992).

5. Gel de electroforesis con gradiente desnaturizante (DGGE y TGGE) (Heuer y col, 2001): permite detectar rápidamente de un modo cualitativo y semicuantitativo (relativo) los diferentes productos de PCR de genes 16SrRNA de la comunidad. Con un gradiente desnaturizante de urea y formamida (o de temperatura para TGGE) optimizado, se corren los productos de PCR a analizar en un gel de electroforesis y los fragmentos de ADN de igual tamaño pero distinta secuencia, se separan y resuelven electroforéticamente. Se asume que cada banda de DGGE (o TGGE) obtenida representa una unidad taxonómica operativa (OTU), la cual se puede denominar con el término especie para simplificar el análisis (Canals, 2005). Se pueden estudiar moléculas de DNA de hasta 700 pares de bases de longitud, con la característica de llevar acoplada una cola artificial muy rica en GC en uno de los extremos, para evitar la desnaturalización completa del DNA (Muyzer y col., 1998).

El conocimiento de la diversidad microbiana ha sido mejorado muy significativamente sobre la base de la utilización reciente de las técnicas no dependientes de cultivo.

En el caso de este trabajo de tesis, se utilizó la técnica de DGGE para realizar los análisis de las comunidades bacterianas.

I.B.3. Suelos contaminados con hidrocarburos

Durante las maniobras de extracción, procesamiento y transporte de los hidrocarburos, los suelos están continuamente sometidos a derrames accidentales. Cuando un suelo recibe un derrame cambia sus características, tanto químicas como biológicas. Desde el punto de vista químico, la principal modificación consiste en un incremento enorme del contenido de carbono (C). Este aporte de C altera la relación C:N:P.

Desde el punto de vista biológico, la presencia de los hidrocarburos en un suelo causa una reducción notable de la diversidad de las comunidades que lo habitan (Castle y col., 2006). A nivel biológico los hidrocarburos resultan un factor de stress (adicional a los existentes en el suelo) que condiciona el desarrollo de los diferentes componentes de la comunidad microbiana, permitiendo el crecimiento de aquellas poblaciones con capacidades metabólicas adecuadas (y que pueden utilizar la presencia del hidrocarburo como fuente de C y E), obligando a permanecer en formas de resistencia a otros (aquellos que pueden tolerar la presencia del hidrocarburo pero no pueden aprovecharla como una ventaja, al menos en ciertas condiciones) y eliminando a aquellos que resultan sensibles.

Los suelos contaminados suelen diferenciarse en dos categorías, “Suelos contaminados en forma aguda” o “Suelos contaminados en forma crónicas”, en base a su grado y tiempo de exposición a los contaminantes.

Un suelo prístino (sin exposición previa a los hidrocarburos) que recibe de manera repentina una gran dosis de hidrocarburos puede ser definido como “**suelo contaminado en forma aguda**”. El aporte repentino del contaminante condicionará el desarrollo de diferentes miembros de la comunidad microbiana, permitiendo el establecimiento y colonización de los mejores adaptados a la nueva condición. Así mismo, y según la composición química del contaminante, este se distribuirá en la matriz según procesos de adsorción a las partículas del suelo, percolado a zonas más profundas, y/o eliminado por volatilización.

Por el otro lado, un suelo que sufrió un evento de contaminación que ocurrió hace tiempo o que recibe un evento de contaminación constantemente, pueden considerarse como un “**suelo contaminado en forma crónica**”.

Los suelos crónicos se distinguen de los agudos porque en los primeros se pueden encontrar proporciones significativas de microorganismos adaptados a las condiciones de stress generado por la contaminación y por lo tanto capaces de tolerar y degradar los contaminantes. Estos microorganismos han logrado colonizar el suelo consumiendo las fracciones disponibles y fácilmente degradables. Consecuentemente y con el transcurso el tiempo, las fracciones disponibles se irán agotando y se acentuarán los procesos de adsorción.

Este proceso de “envejecimiento” se produce por una serie de fenómenos como son: la adsorción con la materia particulada del suelo dentro de pequeños poros (0.2-0.8 μm) inaccesibles para las bacterias; la absorción a la materia orgánica del suelo; la baja difusividad de los compuestos, principalmente desde los microporos; la disolución en fases líquidas no

acuosas (en inglés NAPLs); la formación de uniones covalentes con la materia orgánica e inorgánica del suelo o bien su dispersión en aguas subterráneas de sitios contaminados (Nannipieri y col., 2003).

De esta manera, la adsorción por la fase sólida, el pequeño tamaño de los poros, la alta tortuosidad del sistema y la disolución en la fase líquida no acuosa, conducirán a una reducida difusión de las moléculas, varios órdenes de magnitud más baja que en el agua (Johnsen y col., 2005).

Como consecuencia del proceso de envejecimiento la fuente de C resultará poco disponible para los microorganismos, condicionando el crecimiento a las estrategias que puedan desarrollar para superar esta limitación. Convencionalmente se considera biodisponible a un hidrocarburo u otro sustrato, si se encuentra disuelto en la fase acuosa accesible al microorganismo y no biodisponible si está asociado a algún adsorbente (Bastiaens y col., 2000).

Si bien el aprovechamiento de la biodegradación bacteriana de los hidrocarburos es una vía posible para lograr la “limpieza” de suelos contaminados (Lei y col., 2004; Vacca y col., 2005), la reducida biodisponibilidad de estos compuestos constituye una de las principales limitaciones del proceso debido a que se encontrarán poco accesibles para los microorganismos (Kanaly y Harayama, 2000). Una alternativa aplicable a suelos crónicamente contaminados es optimizar el potencial degradador de esta microbiota autóctona, con la nivelación de los nutrientes esenciales para su crecimiento y supervivencia.

Con la intención de superar la barrera que representa la baja disponibilidad del contaminante, actualmente han sido publicados numerosos trabajos sobre las estrategias que han desarrollado los microorganismos aislados bajo condiciones limitantes del hidrocarburo (Johnsen y col., 2005; Johnsen y col., 2007; Coppotelli y col., 2010; López, 2011, Trabajo de tesis; Dias, 2006). La aplicación de estos microorganismos como inoculantes en suelos crónicos, podría resultar en la exitosa reducción del contaminante.

I.B.3.1. Suelos contaminados con hidrocarburos en la Antártida

En las regiones polares (el continente antártico y ártico) las actividades humanas como la generación de energía, calor y utilización de vehículos, barcos y aviones y el incremento del turismo (Aislabie y col., 2004) han ido incrementándose a lo largo de los años. Su impacto

genera preocupación en lo que es una de las últimas áreas prístinas de la tierra. Dichas actividades humanas requieren hidrocarburos derivados del petróleo que generan, aunque de manera aislada, derrames accidentales de cantidades significativas de combustible tanto en suelos como cursos de agua (Chuvilin y Miklyaeca, 2003; Poland y col, 2003; Mac Cormack, 2011). Tales son los casos del hundimiento del crucero liberiano *Explorer* en aguas antárticas, más específicamente en las cercanías del archipiélago de las Islas Shetland, en el año 2007 (Figura I.3 a) y el hundimiento del transporte polar argentino *Bahía Paraíso* en Arthur Harbour (Isla Anvers), Península Antártica, en el año 1989, que provocó el derrame de aproximadamente 6×10^5 litros de combustible diesel, cubriendo un área de 100 Km^2 (Mahlon y col., 1991). El gas oil derramado en ambientes prístinos de este y otros tipos (Figura I.3 b) impactan en las comunidades microbiana presentes (Atlas, 1981); influyen en los procesos de congelamiento-descongelamiento del suelo (Grechishchev y col., 2001) y en el pH, la humedad y la disponibilidad de nutrientes (Everett, 1978). En definitiva, los mismos niveles de contaminación pueden provocar mayor impacto en ambientes de clima frío que templado, ya que los ecosistemas de ambientes fríos son más sensibles al haberse adaptado a las duras condiciones ambientales (Yang y col, 2009).

Estas zonas, que hasta el momento no habían recibido ninguna atención, han comenzado a ser el foco de diversos proyectos de investigación tendientes a reducir su nivel de contaminación. La amenaza que dichos contaminantes representan para la salud humana y la ecología de la región ha llevado a que la actual reglamentación ambiental para el continente antártico, regida por el Tratado Antártico (1959) y su posterior Protocolo de Madrid (1991, firmado en Madrid) exija la reducción de las actividades contaminantes y la mitigación de la contaminación actualmente presente.

a)



b)



Figura I.3. Imágenes de contaminación con gas oil en la Antártida. a) Hundimiento del crucero Explorer, se puede observar el campo de hielo que finalmente rodeó al buque siniestrado. b) Agua contaminada con gas oil proveniente de la rotura de una cisterna, en la Base Jubany, año 2009.

I.C. Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos

El tratamiento y recuperación de suelos contaminados se puede definir como el conjunto de operaciones realizadas con el objetivo de controlar, disminuir o eliminar los contaminantes presentes.

I.C.1. Técnicas disponibles para eliminar hidrocarburos

La necesidad de eliminar (o reducir al mínimo) el contenido de hidrocarburos provenientes de la actividad humana ha llevado al desarrollo de diversas estrategias. No existe, en la mayoría de los casos, un único procedimiento a aplicar, y la elección de la estrategia a seguir depende del sistema afectado (derrame en ecosistemas acuáticos o terrestres), y las características físicas y químicas de los contaminantes, como así también de su viabilidad económica y del tiempo estimado para su desarrollo (Reddy y Chinthamreddy, 1999).

Cuando los derrames ocurren en tierra, se plantean una serie de opciones que involucran desde la atenuación natural, hasta la aplicación de tratamientos físicos y/o químicos (Acharya y Ives, 1994; Araruna y col., 2004).

La atenuación natural, también llamada recuperación pasiva o intrínseca, se está utilizando cada vez más dado que se trata de un método de recuperación de suelos y aguas contaminadas de bajo costo (Mulligan y Yong, 2004). No obstante, a pesar de que puede ser utilizado en lugares muy variados, raramente se suele aplicar dado que es un tratamiento mucho más lento que los que utilizan tecnologías ingenieriles (Mulligan, 2001). De acuerdo con la USEPA (1999), la atenuación natural consiste en utilizar procesos naturales para contener la propagación de la contaminación procedente de los vertidos químicos y reducir la concentración y la cantidad de los agentes tóxicos en las zonas contaminadas. Los procesos naturales que se invocan para la recuperación son biológicos, como la biodegradación aerobia, anaerobia y co-metabólica, y procesos físico-químicos como la volatilización, dispersión, dilución, desintegración radioactiva, estabilización química y bioquímica, precipitación y sorción en partículas de materia orgánica y arcillas del suelo. El éxito de cada proceso de atenuación natural dependerá de las características geológicas, hidrológicas y microbiológicas de la zona afectada (Mulligan y Yong, 2004).

En la actualidad, los tratamientos físicos y/o químicos solo se aplican en ciertos casos y como

primera acción de emergencia a fin de remover grandes masas de contaminantes, a causa de su elevado costo y la perturbación adicional que generan sobre la zona bajo tratamiento. Algunos de estos métodos destruyen el suelo y otros alteran sus características de manera irreversible. Para citar alguna de las técnicas, se encuentran:

-la **desorción térmica** que consiste en el tratamiento del suelo contaminado en una secadora en donde el mismo es calentado hasta temperaturas que causan la volatilización y consecuente separación física de los contaminantes de las partículas de suelo.

-el **lavado** que consiste en la remoción de contaminantes del suelo tratándolo con surfactantes químicos biodegradables y agua. Esta estrategia no es en general aplicable en suelos con más del 30% de arcilla o limo.

-la **oxidación química** que es un métodos *in situ* el cual consiste en la oxidación de los contaminantes orgánicos utilizando oxidantes fuertes, como por ejemplo permanganato de potasio.

-la **extracción orgánica** en fase solida que es un método aplicable *ex situ* para el tratamiento de suelos contaminados con sustancias orgánicas, como HAPs, PCBs y otros compuestos poco solubles en agua.

- la **incineración** que consiste en la quema a elevadas temperaturas del material contaminado.

- la **extracción con co-solventes** que es una tecnología *in situ* que permite la remediación de suelos y aguas subterráneas contaminadas mediante la inyección de agua y un co-solvente, comúnmente un alcohol (etanol, metanol o isopropanol), en el área contaminada.

La mayoría de estas tecnologías son muy costosas para ser aplicadas a gran escala y requieren monitoreos continuos para asegurar su eficacia.

Alguna de ellas no resultan en la completa destrucción de los contaminantes, por lo que han sido sustituidas (o complementadas) por tratamientos biológicos compatibles con el medio

ambiente y que podrían lograr la eliminación de fracciones de los contaminantes que no pueden ser removidos por métodos físicos.

I.C.2. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos: una tecnología amigable

En las últimas décadas, con el objetivo de eliminar hidrocarburos de suelos contaminados, se han desarrollado diferentes estrategias económicamente atractivas y más amigables con el medio ambiente que los métodos físicos/químicos disponibles. Todas ellas se basan en el aprovechamiento de las capacidades metabólicas de los microorganismos para degradar los contaminantes y reciben el nombre genérico de procesos de **biorremediación**.

La biorremediación podría definirse como una biodegradación asistida y controlada que provee una solución definitiva, diferenciándose de otras tecnologías que solo proveen una solución temporal mediante el aislamiento y contención del contaminante (Crawford, 2002).

Esta tecnología utiliza microorganismos, componentes celulares o enzimas libres, con el fin de lograr la mineralización o bien una transformación parcial del contaminante en sustancias menos tóxicas o inocuas para el medio ambiente y la salud humana (Röling y col., 2001).

Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han utilizado con éxito para tratar suelos o lodos y sedimentos contaminados (Lina, 2010) incluso de ambientes fríos (Ruberto, 2009).

Al igual que otras tecnologías de remediación, la biorremediación puede realizarse *in situ*, es decir en el mismo lugar, u *on site* lo cual implica excavar el material y tratarlo dentro del área afectada. Otra alternativa es el tratamiento *ex situ*, donde se puede excavar el material y trasladarlo fuera del lugar contaminado (Velasco y Volke Sepúlveda, 2003).

La biorremediación *in situ* es la más aplicada ya que trata el contaminante en el lugar, aprovechando la capacidad degradadora de los microorganismos autóctonos del sitio (Benavides López de Mesa y col., 2006). Particularmente la biorremediación *on site* de suelos contaminados de la Antártida ha resultado ser, hasta el momento, la mejor opción debido a que evita el alto costo económico que implica el traslado de material al continente, para su tratamiento.

I.C.2.1. Factores que condicionan la biorremediación de un suelo

La biodegradabilidad de una mezcla de hidrocarburos presente en un suelo contaminado depende de diversos factores como son: la presencia de una comunidad microbiana degradadora potencialmente activa, la estructura molecular del contaminante, su concentración y biodisponibilidad, y factores ambientales como la, temperatura, el pH, humedad del suelo, presencia de aceptores de electrones, y la existencia de nutrientes inorgánicos (fuente de N y P) disponibles.

1. El pH, temperatura y la humedad. Cada cepa microbiana tiene un determinado rango de tolerancia a factores ambientales como son: la temperatura, el pH y la salinidad, los cuales pueden afectar al crecimiento y actividad de las poblaciones microbianas. En consecuencia, cuanto mayor sea la diversidad de microorganismos existentes, potencialmente mayor será el rango de tolerancia. No existen unas condiciones preestablecidas que sean óptimas en todos los casos, pero en términos generales los rangos óptimos para la biodegradación son: pH entre 6-8 y temperaturas entre 20-30 °C (Alexander, 1999).

La variación del pH del suelo afecta a la actividad microbiana y también a la solubilización y adsorción/absorción de los contaminantes y de los iones. Las formas catiónicas (NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) son más solubles a pH ácido mientras que las formas aniónicas (NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , Cl^-) son más solubles a pH alcalino (Sharpley, 1991). En general, el pH óptimo para el crecimiento de las bacterias heterótrofas es neutro (pH 6-8), mientras que es más ácido para los hongos (pH 4-5).

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afecta la actividad metabólica de los microorganismos y la tasa de biodegradación (ver más adelante en “Biorremediación en áreas de clima frío”).

La humedad del suelo puede limitar de forma severa la biodegradación, fundamentalmente en suelos superficiales afectados por oscilaciones importantes en el contenido de agua. No obstante el nivel óptimo de humedad depende de las propiedades de cada suelo, el tipo de contaminación y si la biodegradación es aeróbica o anaeróbica. Un déficit de agua puede disminuir el transporte de nutrientes y de contaminantes, así como también la migración bacteriana a través del suelo. El exceso de agua en un suelo desplaza el aire residente en los poros del suelo, generándose con

mayor facilidad condiciones anaeróbicas, al agotarse el oxígeno disuelto en agua (Menn y col., 2000).

2. Estructura química. De las distintas familias de hidrocarburos del petróleo, los n-alcanos y los alcanos ramificados (isoprenoides) de cadena intermedia (C10-C20) son los sustratos más fácilmente degradables por los microorganismos del suelo, tendiendo a ser eficazmente biodegradados. Sin embargo, los alcanos de cadena larga (>C20) son más difíciles de degradar debido a su elevado peso molecular y su baja solubilidad en agua. Los cicloalcanos, por norma general, se degradan más lentamente que los n-alcanos y alcanos ramificados. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) de 2 a 3 anillos pueden ser biodegradados eficazmente en el suelo en condiciones ambientales óptimas, mientras que los HAP de 4 anillos, y especialmente, los de 5 o más anillos bencénicos presentan una mayor recalcitrancia y una baja solubilidad. Las fracciones de resinas y asfaltenos son las que presentan una menor degradabilidad debido a las complejas estructuras químicas y a su elevado peso molecular (Harayamay col., 1997, 1999).

3. Biodisponibilidad. Uno de los factores limitantes de la biodegradación de contaminantes en suelo crónicamente contaminados es la biodisponibilidad. La adsorción por la fase sólida, el pequeño tamaño de los poros, la alta tortuosidad del sistema y la disolución en la fase líquida no acuosa del suelo, conducirán a una reducida difusión de los hidrocarburos, disminuyendo la disponibilidad hacia los microorganismos (Johnsen y col., 2005).

4. Presencia de aceptores de electrones. La mayor parte de los hidrocarburos del petróleo y derivados son degradados con mayor extensión y rapidez de forma aeróbica (O_2 como aceptor final de electrones), ya que en ausencia de O_2 , y en presencia de aceptores de electrones alternativos (NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , Mn^{4+} y Fe^{3+}) los hidrocarburos pueden ser degradados, pero con unas tasas de biodegradación muy inferiores a las aeróbicas (Massias y col., 2003).

5. Nutrientes inorgánicos. Las concentraciones de nitrógeno y fósforo asimilables presentes en el suelo, suelen ser limitantes para un incremento y activación de la población microbiana, mientras que otros nutrientes esenciales como el Ca^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} y SO_4^{2-} ya están presentes en cantidades suficientes en el suelo (Menn y col., 2000).

El enfoque de la biorremediación consiste en una modificación ambiental que incentiva la capacidad degradadora intrínseca de los microorganismos del suelo.

Han sido desarrolladas diferentes estrategias con el fin de aumentar la capacidad degradadora del suelo. La bioestimulación y el bioaumento son algunas de las más extensamente estudiadas.

I.C.2.2. Bioestimulación

La bioestimulación consiste básicamente en el ajuste de las variables fisicoquímicas claves del sitio a tratar, de forma de estimular el crecimiento de la microflora autóctona degradadora. En general, la disponibilidad de macronutrientes (N y P) es la condición a corregir. Una relación de C/N/P de 100:10:1 se considera óptima, en términos generales, para el metabolismo microbiano (U.S. Environmental Protection Agency o EPA, 1995). Si bien es claro que niveles adecuados de C/N/P son imprescindibles para optimizar la biodegradación, es escasa la atención que se le ha prestado a los efectos de la concentración de macronutrientes sobre la velocidad de degradación de hidrocarburos. Diversos estudios mostraron incrementos en las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados por el agregado de nutrientes (Braddock y col., 1997; Chaîneau y col., 2003; Nikolopoulou y Kalogerakis, 2008). También existen estudios que han descripto efectos inhibitorios en degradación de hidrocarburos por la adición de N inorgánico (Morgan y Watkinson, 1992; Genouw y col., 1994).

Es importante destacar que la acción de los nutrientes inorgánicos puede estar limitada debido a la interacción química con los minerales del suelo (el amonio se puede unir a las arcillas por intercambio catiónico y el fosfato puede unirse y precipitar con iones calcio, hierro y aluminio) (Morgan y Watkinson, 1992). Para evitar el exceso de nutrientes, así como la pérdida de los mismos por lixiviación, también se han utilizado fertilizantes inorgánicos oleofílicos de liberación lenta (Inipol EPA[®] 22, OSEII[®]) para la biorremediación de suelos contaminados (Pritchard y Costa, 1991; Zhu y col., 2004).

La adición de nutrientes orgánicos al suelo puede mejorar las propiedades físicas y químicas del suelo como por ejemplo la capacidad de campo, la aireación, el pH y la capacidad de intercambio catiónico (CIC) (Zhu y col. 2004)

El éxito de la bioestimulación con N y P es dependiente entonces del tipo de nutrientes agregado (sales inorgánicas, fertilizantes comerciales, residuos orgánicos), pero también de la estrategia de agregado (en una vez o en etapas), del ambiente afectado (propiedades fisicoquímicas) e incluso del tipo de hidrocarburo involucrado (Breedveld y Sparrevik, 2000) por lo cual debe optimizarse con el sistema a remediar (Lee y col. 2008).

I.C.2.3. Bioaumentación

El bioaumentación consiste en el aumento de las capacidades biodegradativas de los sitios contaminados a través de la inoculación de microorganismos con determinadas capacidades catabólicas. Es considerado una de las herramientas con mayor potencial para aumentar la eficiencia de los procesos de biorremediación (Osokawa y col., 2009).

Esta estrategia consiste en la inoculación de la matriz a remediar con microorganismos que aporten funciones metabólicas que aumenten la velocidad y el grado de biodegradación de los contaminantes (Madueño y col., 2011).

En general se utilizan microorganismos con capacidad degradadora pero también hay reportes donde se inocularon bacterias productoras de surfactantes, favoreciendo la biodisponibilidad de los contaminantes (Dean y col., 2001).

Diversos estudios han demostrado que los factores ambientales bióticos y abióticos influyen la efectividad del bioaumentación (Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010) por lo tanto, es crítico utilizar microorganismos autóctonos del sitio contaminado para realizar el bioaumentación (Hosakawa y col., 2009; Bouchez y col., 2000; Copotelli, 2008).

Estudios previos indican que tanto la estrategia de inoculación como el destino de los microorganismos inoculados en el suelo durante la aplicación de estrategias de bioaumentación son factores importantes a tener en cuenta (Gentry y col., 2004; Berthe-Corti y col., 2007). Incluso la manera de agregar el inóculo y la eventual fijación del mismo a matrices inertes que lo retengan en el sitio contaminado, reduciendo su pérdida por escurrimiento, son puntos que deben analizarse al momento de evaluar el bioaumentación como estrategia válida (Mishra y col., 2001; Xu y Lu, 2010). Actualmente, con el objetivo de seguir el destino y establecimiento de las cepas degradadoras inoculadas en los suelos contaminados, se están aplicando métodos de detección basados en técnicas de PCR (Baker y col. 2003; Coppotelli y col., 2008).

Los microorganismos han desarrollado diversas estrategias que les permiten lograr una eficiente degradación de hidrocarburos mediante un mayor contacto célula-contaminante, aun en ambientes con reducida biodisponibilidad. Diversos estudios han mostrado una alta correlación entre la habilidad de degradar hidrocarburos y la hidrofobicidad de la superficie bacteriana la cual expresa la afinidad de un microorganismo por una fase orgánica (Obuekwe y col. 2009). Por otro lado, otras propiedades como la adhesión a las partículas de suelo o a los hidrocarburos (Huysman y Verstraete, 1993, b), la capacidad quimiotáctica hacia hidrocarburos (Mehmannavaz y col., 2000) y la capacidad de formación de biofilm sobre superficies hidrofóbicas (Eriksson y col, 2002; Alexandre y col., 2005) pueden resultar de interés en la selección de microorganismos inoculantes, con el fin de aumentar la eficiencia del proceso.

I.C.2.4. Utilización de surfactantes

En algunos suelos contaminados, a pesar de existir un número adecuado de microorganismos degradadores y una disponibilidad de nutrientes adecuada, los contaminantes no se encuentran biodisponibles para ser degradados. Este problema se torna más relevante al aumentar la hidrofobicidad de los mismos, siendo particularmente relevante para los HPA. El uso de surfactantes aparece como una solución posible debido a su capacidad de reducir la tensión superficial del agua y formar micelas, incrementando de esta manera la movilización y la biodisponibilidad de los compuestos orgánicos hidrofóbicos. González y col (2010) citaron que los ácidos grasos C16 y C18 y los surfactantes Triton X-100, Fl 70, 75 y Brij, estimulan el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en hexadecano. En el caso específico de los HPAs, la aplicación de surfactantes ha mostrado resultados contradictorios. Por un lado, números autores han observado un mejoramiento de la biodegradación de HAPs mediada por surfactantes tanto en medio líquido (Cuny y col., 1999) como en suelos (Fang y col., 2002; Chritofi y Ivshina, 2002). Por otro lado, se ha reportado falta de efecto e incluso inhibición de la biodegradación para HPAs en general (Tiehm, 1994) y para fenantreno en particular (Wong y col., 2004; Kyung-Hee y col., 2005).

En resumen, las ventajas observadas en la utilización de los surfactantes son:

- ◆ Aumento de solubilidad y biodisponibilidad de los hidrocarburos,
- ◆ De fácil comercialización, distribución y de bajo costo,

- ◆ Mejora la degradación del hidrocarburo,
- ◆ Algunos son biodegradables,
- ◆ Pueden ser utilizados como sustrato primario cuando el contaminante se degrada co-metabólicamente (Robles y col., 2008).

En cuanto a las desventajas de su utilización, podemos citar:

- ◆ Su toxicidad y los efectos de los residuos intermedios debido a que suelen ser más tóxicos que los compuestos originales,
- ◆ La degradación preferencial del surfactante puede disminuir la degradación del contaminante y por lo tanto no se reducirá la biodisponibilidad de los mismos.

Varios investigadores (Atagana y col., 2002; Coulon y Delille, 2003) han citado que la combinación de nutrientes con surfactantes puede incrementar también la biodisponibilidad de los contaminantes. Por todo lo anteriormente mencionado, resulta indispensable testear si la utilización del surfactante seleccionado favorece la biorremediación del suelo a tratar.

I.C.2.5. Biorremediación en áreas de clima frío

La biodegradación de contaminantes en suelos de áreas frías es más difícil de lograr que la desarrollada en áreas templadas. Aunque el traslado de estos suelos para su tratamiento en áreas templadas podría ser una solución, no resulta rentable ni viable en este caso. Dichas limitaciones muestran la necesidad de realizar los saneamientos “*in situ*”. Aquí, la biorremediación ha sido citada como la herramienta más conveniente para sanear suelos, sedimentos y aguas antárticas contaminadas (Ruberto y col., 2006).

Cualquiera sea la estrategia a emplear en un proceso de biorremediación, el factor abiótico más limitante en zonas de media o alta latitud es la baja temperatura. La temperatura influencia el crecimiento y la actividad metabólica microbiana, afectando los componentes celulares, fundamentalmente proteínas y lípidos y disminuyendo los coeficientes de temperatura de las reacciones enzimáticas (Q_{10}). Así, la velocidad de crecimiento de cada microorganismo en particular, variará en función de la temperatura de un modo característico, como resultado de la

compleja interacción de todos los factores involucrados.

Los procesos de biodegradación de hidrocarburos se ven profundamente afectados también por la temperatura. A bajas temperaturas cambian las características físicas y químicas de los hidrocarburos, aumentando la viscosidad del petróleo y se reduciendo la evaporación de los alcanos de cadena corta (altamente tóxicos) lo que disminuye la velocidad de biodegradación así como la transferencia de masa de sustratos y/o receptores de electrones en el suelo congelado que son cruciales para los microorganismos adaptados al frío (Aislable y col., 2006). La temperatura también influye sobre la degradación afectando la composición de la comunidad microbiana. En ambientes más templados, la degradación de hidrocarburos es más de un orden de magnitud más rápido, siendo óptimos los 15-30 °C para procesos de degradación óxicos y los 25-35 °C para procesos anóxicos; en cambio durante el periodo invernal la degradación se ve notablemente reducida (Atlas, 1981). Como la temperatura del suelo de regiones frías es desfavorable, los procesos de biorremediación deben aplicarse durante los veranos, ya que estos se correlacionan con una mejor tasa de crecimiento microbiano y degradación.

Sin embargo, el grado y el tiempo de exposición previa de una comunidad microbiana a un cierto factor, lleva a una selección natural de los individuos más adaptados a las condiciones imperantes. Aún en ambientes que presentan valores extremos de ciertos parámetros, es posible aislar microorganismos adaptados a desarrollar en esas condiciones. En 1975, Morita realizó una clasificación de los organismos adaptados a bajas temperaturas de crecimiento que aún hoy es utilizada como referencia. Según la misma, los organismos sicrófilos estrictos son aquellos capaces de crecer a 0 °C, poseen temperaturas óptimas de crecimiento cercanas a los 10 °C y su temperatura máxima de crecimiento no supera los 20 °C. Por el contrario, los organismos sicrotróficos o sicrotolerantes, si bien pueden crecer a 0 °C, presentan temperaturas óptimas entre 20 y 30 °C y límites superiores de hasta 40 °C. , por lo que sólo aquellos que sean sicrófilos o sicrotolerantes pueden ser utilizados exitosamente para procesos de biorremediación (Panicker y col., 2002; Ruberto y col. 2009).

La mayor parte de los estudios realizados indican que las condiciones mesofílicas (20-30 °C) son las óptimas para la biorremediación de suelos contaminados (Menn y col., 2000). No obstante, también se ha descrito biodegradación de hidrocarburos temperaturas extremas: a 10 °C en suelos subárticos (Margesin y Schinner, 1997 b), 5 °C en suelos árticos (Whyte et al., 1999) y hasta 60 °C por una cepa termófila de *Bacillus stearothermophilus* aislada de un suelo contaminado con crudo de petróleo del desierto kuwaití (Sorkoh et al., 1993).

El aislamiento, caracterización y estudio de las condiciones de crecimiento de cepas bacterianas psicrófilas y psicrotóxicas degradadoras de hidrocarburos es un paso esencial tanto para la comprensión de la respuesta de la flora autóctona de ese ambiente a una descarga aguda o crónica de aquellos contaminantes, como para poder evaluar la potencial utilización de estos microorganismos en procesos de descontaminación de sistemas que, por diversas razones, requieran el agregado de microorganismos degradadores autóctonos o alóctonos para lograr una efectiva degradación. El diseño y la aplicación de estos procesos es hoy en día una de las áreas con más desarrollo de la microbiología ambiental y constituye la metodología más prometedora para mitigar los graves efectos producidos por la contaminación sobre los diversos ecosistemas.

Actualmente, son numerosos los reportes acerca de la aplicación exitosa de procesos de biorremediación de hidrocarburos “*in situ*” en zonas de clima frío extremo.

Las estrategias y conocimientos obtenidos son aplicables también al desarrollo de procesos de biorremediación en otras zonas del planeta que, si bien presentan condiciones menos estrictas, pueden encontrarse, al menos durante una parte del año en condiciones de limitación por temperatura, como lo es una extensa zona de nuestro país que posee una gran actividad petrolera, ya sea como productora (Patagonia) o como procesadora (Polo petroquímico La Plata-Ensenada).

Por las razones anteriormente expuestas es que, para aportar en el desarrollo y optimización de las estrategias de biorremediación, consideramos interesante utilizar como modelos de estudio la zona de clima más estricto de nuestro territorio en donde existe un problema de polución por hidrocarburos: La Antártida y una de las zona de clima templado con mayores problemas de contaminación por estos compuestos: el polo petroquímico La Plata-Ensenada.

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

- ❖ Estrategias como la bioestimulación y el bioaumento son herramientas adecuadas para favorecer la biorremediación de hidrocarburos en suelos aguda y crónicamente contaminados, aún en ambientes de clima frío donde la biodegradación se ve limitada.
- ❖ La bioestimulación provoca cambios en las comunidades bacterianas de suelos contaminados con hidrocarburos. Tales cambios conducen a una comunidad eficientemente degradadora de hidrocarburos.
- ❖ La bioestimulación de la mezcla de una tierra con alta concentración de hidrocarburos con otra de menor concentración, favorece la remoción de hidrocarburos.
- ❖ La presencia de un surfactante favorece la eliminación de hidrocarburos en suelos contaminados.

Objetivos

Objetivo general

- ❖ Aportar nuevos conocimientos que contribuyan al desarrollo y la optimización de estrategias de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, tanto en áreas de clima frío extremo (Antártida) como templado (La Plata).

Objetivos específicos

- ❖ Estudiar a escala laboratorio y en ensayos “*on site*”, tanto en suelos provenientes de áreas de clima frío extremo (Antártida) como de áreas de clima templado (La Plata), el efecto de la utilización de diferentes fuentes de macronutrientes (N y P).
- ❖ Estudiar el efecto que tiene la mezcla de dos tierras de zona templada, con diferente concentración de hidrocarburos, sobre la estructura de las respectivas comunidades bacterianas y sobre la eficiencia de eliminación de hidrocarburos. Analizar el efecto de la bioestimulación con distintos nutrientes.

- ❖ Analizar el efecto del agregado de compuestos surfactantes sobre la eficiencia del proceso de biorremediación.
 - ❖ Estudiar la dinámica de la comunidad bacteriana presente en los suelos contaminados con hidrocarburos utilizados en los ensayos e identificar taxonómicamente las poblaciones dominantes.
- ❖ Estudiar algunas propiedades de dos inóculos bacterianos degradadores de hidrocarburos: la cepa ADH y el consorcio M10.
- ❖ Analizar la capacidad degradadora de los inóculos ADH y M10 en microcosmos conteniendo suelo contaminado con gasoil y suplementado con diferentes nutrientes.
- ❖ Comenzar estudios de inmovilización de un inóculo bacteriano sobre matrices sólidas e investigar si la biodegradación de un suelo contaminado con hidrocarburos mejora al ser bioaumentado con el inóculo inmovilizado.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

III. Materiales y Métodos

III.A. Materiales

III.A.1. Tierra

Área: Clima frío extremo

Zona de muestreo: Base Jubany ($62^{\circ}14'$ Sur, $58^{\circ}40'$ Oeste) localizada en la Península Potter, Isla 25 de Mayo, Islas Shetland del Sur, Antártida. Esta base, emplazada a orillas de la Caleta Potter (Figura III.1) funciona en forma ininterrumpida desde hace más de 58 años y en sus cisternas de almacenamiento ingresan aproximadamente 200.000 l. de gasoil por año.

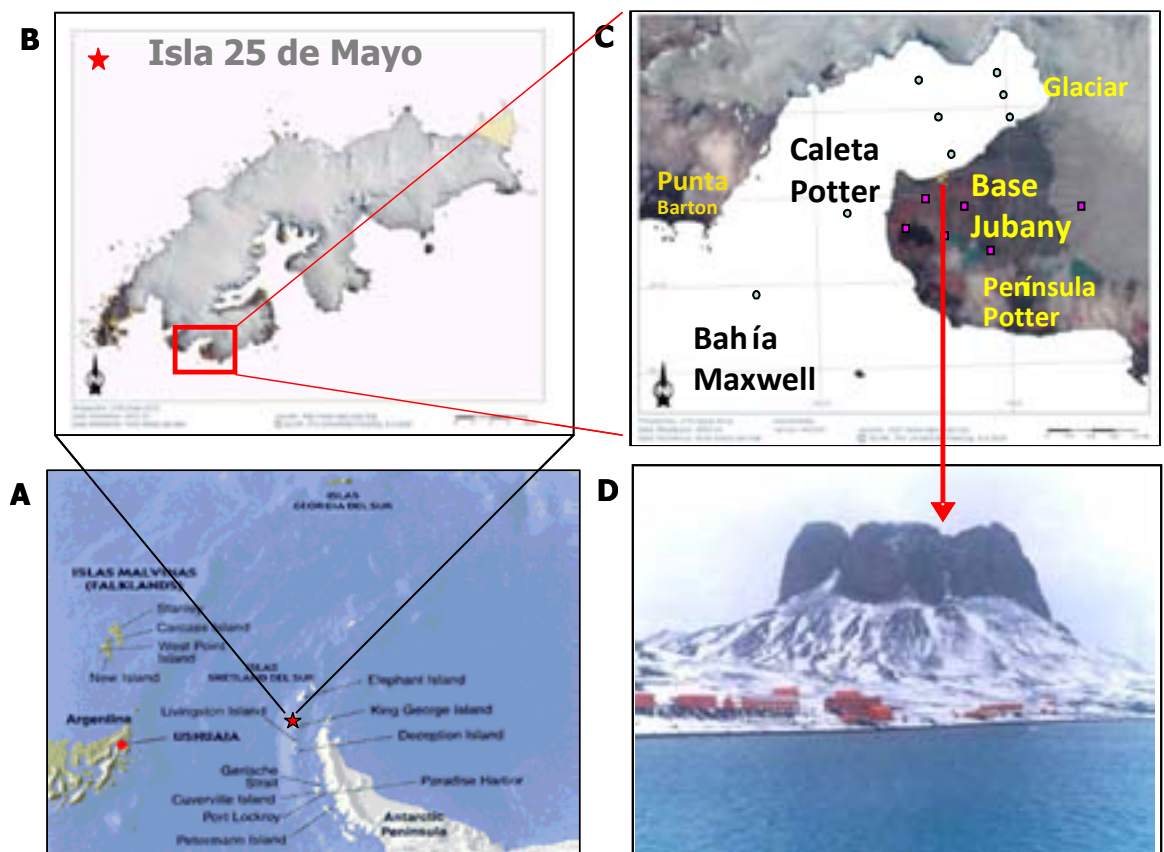


Figura III.1. Localización relativa de la base argentina Jubany en la península antártica (A) y en la Isla 25 de Mayo (B y C). D: vista de la base desde Caleta Potter.

La base tiene actividad científica y logística durante todo el año y en el verano su dotación puede superar las 100 personas. Esta actividad continua ha llevado a una situación de extrema fragilidad al ambiente cercano a las instalaciones, donde hay zonas con importantes contenidos de hidrocarburos producto de derrames de pequeña o mediana magnitud. Esta situación se hace aun más relevante si se tiene en cuenta que la base Jubany se encuentra al lado de la denominada ZAEP 132 (Zona Antártica Especialmente Protegida N° 13), un área que ha sido protegida por el el SCAR (Scientific Committe on Antarctic Research) debido a su gran biodiversidad, que le confieren un enorme valor ambiental. Sumado a ello, la base cuenta con las mejores instalaciones para la realización de estudios científicos. Es entonces por su grado de exposición a los hidrocarburos, su relevancia ambiental y biológica y sus facilidades logísticas y científicas que se eligió esta zona como sistema de estudio de clima frío extremo.

Sitios / material almacenado: Si bien edafológicamente en la Base Jubany no hay un verdadero “suelo” se utilizará este término para referirse al material utilizado en los estudios. El suelo crónicamente contaminado utilizado para los ensayos de clima frío fue obtenido de dos sitios diferentes: A) De los alrededores de los piletones de contención de las cisternas de almacenamiento de gasoil (suelo CRO1). Este material fue almacenado en barriles metálicos por más de un año antes de su utilización, por lo cual se encontraba compactado y envejecido al momento de su estudio (Figura III.2.a). B) Debajo de una de las tuberías que transportaba gasoil a las cisternas (Figura III.3). Este material no fue almacenado previamente a su utilización (suelo CRO2) y permanecía recibiendo gas oil al momento del muestreo de una grieta de la tubería.

El suelo prístino utilizado para los ensayos de clima frío fue obtenido de un área alejada de la influencia de la Base Jubany (Figura III.4).

En todos los casos a los suelos se le retiraron los componentes gruesos (piedras) manualmente y luego se los tamizó a través de una malla cuadrículada de acero inoxidable de 2 mm de lado (Figura III.2.b).

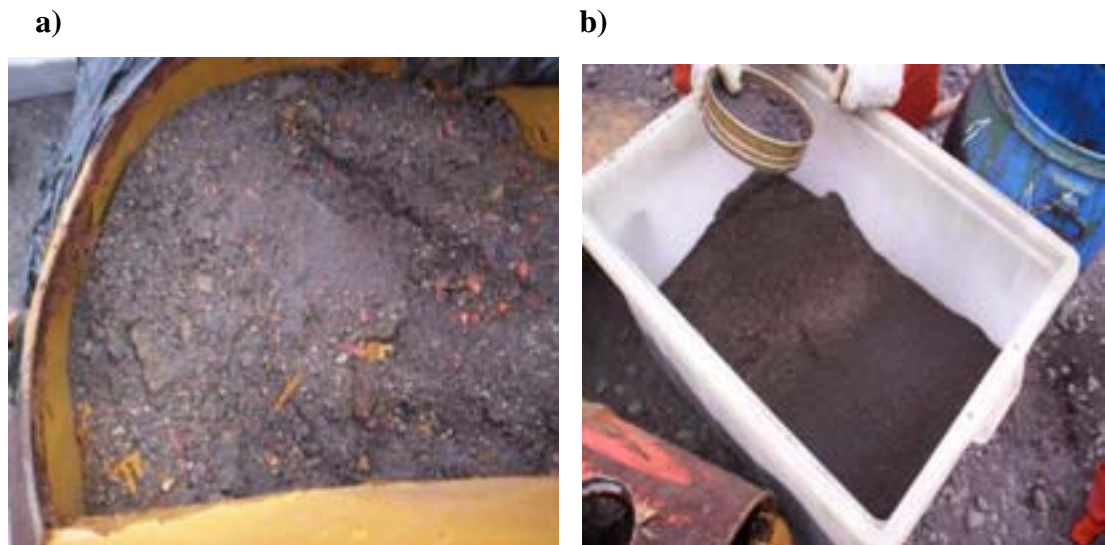


Figura III.2. a) Suelo crónicamente contaminado proveniente de los piletones de contención de los tanques de combustible y que fue almacenado en barriles metálicos. b) Material obtenido luego del tamizado del suelo por malla de 2 mm.



Figura III.3 Excavación realizada debajo de una de las tuberías que conducen gasoil para retirar el suelo contaminado (CRO2) que se iba a utilizar en el ensayo.



Figura III.4. Ubicación, en las cercanías de la Base Jubany, del sitio donde se obtuvo el suelo prístino (suelo PRI) utilizado en los ensayos de biorremediación (flecha amarilla).

Análisis de suelo:

Tabla III.1. Características de los suelos provenientes de áreas de clima frío utilizados en los diferentes ensayos de biorremediación.

Nombre	Sitio	Caracterización	Material almacenado
PRI	Área alejada de la influencia de la Base Jubany	Textura arenosa (93 % de arena, 4 % de limo y 3 % de arcilla). 0,51 % de carbono orgánico. También 0,05 % de nitrógeno; 14,6 ppm de fósforo y. pH: 7,1. Contenido de agua: 12 %.	No
CRO1	Alrededores de los piletones de contención de los tanques de almacenamiento de gas oil, Jubany.	Textura arenosa (94,4 % de arena, 3,8 % de limo y 1,8 % de arcilla), 1,021 % de carbono orgánico; 32 ppm de nitrógeno; 0,5 % de fósforo extractable y Kjeldhal. pH: 6,8. Contenido de agua: 10 %.	Si

CRO2	Debajo de una de las tuberías que transportaba gas oil a los tanques	Textura Arenosa (93,3 % de arena, 4 % de limo y 2,7 % de arcilla), 1,21% de carbono total; 32 ppm de nitrógeno; $1,09 \times 10^{-3}$ % de fósforo. pH 7,1. Contenido de agua: 11 %.	No
------	--	---	----

Área: Clima templado.

Zona de muestreo: sitio bajo la influencia del polo petroquímico La Plata-Ensenada: Barrio Mosconi. Fue muestreado un suelo próximo a un arroyo que rodea al barrio Mosconi (Suelo B, Figura III.5.a) y un segundo suelo obtenido de las orillas del Canal Oeste (Suelo O, Figura III.5.b).

a)



b)



Figura III.5. Sitios de clima templado donde se obtuvieron los suelos crónicamente contaminados del Barrio Mosconi: a) orillas de un arroyo y b) orillas del Canal Oeste.

El barrio Mosconi (Buenos Aires, Argentina) está ubicado frente al Polo Petroquímico Ensenada. Este complejo industrial se encuentra en el límite entre Berisso y Ensenada (La Plata), e incluye las siguientes empresas: YPF Petroken (LyondellBasell), Copetro (Oxbow), Gases Ensenada, Ipako y Air Liquide. El suelo de toda la zona sufre la contaminación con hidrocarburos, ya sea a través de la atmósfera o por las sucesivas inundaciones de los diversos canales existentes. Han sido abiertas numerosas causas judiciales debido a las consecuencias en

la salud de los vecinos (cáncer y problemas respiratorios, entre otros) provocada por el alto nivel de contaminación presente en el barrio.

El Canal Oeste oficia de frontera entre los habitantes de Barrio Mosconi y los enormes tanques y piletones de “contención” y reaprovechamiento de hidrocarburos del Polo Petroquímico de la Plata. Está contaminado con metales pesados y otros residuos peligrosos desde la inundación que se produjo en el año 1993 que causó un desborde de este canal (fallo judicial “Decilio, José O. y otros c/Y.P.F. y otro s/daños y perjuicios” de la Sala II de la Cámara Federal de Apelaciones, 2006). Luego de este fallo que ordenó a Repsol YPF a realizar una serie de obras de infraestructura y de limpieza periódica del canal para aminorar la contaminación ambiental (http://www.latecla.info/2/nota_1.php?noticia_id=41305), se observa en el canal la presencia de plantas flotantes y en las orillas del mismo, la presencia de pasto al igual que en el suelo próximo al arroyo (Figuras III.5.a y b).

Análisis de suelo:

Tabla III.2. Características de los suelos provenientes de áreas de clima templado utilizados en los ensayos de biorremediación. * CIC: capacidad de intercambio catiónico.

Nombre	Sitio	Caracterización
B	Barrio Mosconi	Textura franco arcillosa, 4,44 % de carbono oxidable, 7,67 % de materia orgánica, 0,36 % de nitrógeno, 25,33 ppm de fósforo; CIC* (cmolc/kg): 36,17; calcio: 28,53; magnesio: 5,73; sodio: 1,71 y potasio 1,98. pH: 7.
O	Canal Oeste	Textura franco, 4,36 % de carbono oxidable, 7,51 % de materia orgánica; 1,9 % de nitrógeno, 63 ppm de fósforo; CIC (cmolc/kg): 33,6; calcio 26,1; magnesio: 5,3; sodio: 1 y potasio 1,2. pH: 6,9.
Mez	-	Mezcla de los suelos B y O

En todos los casos, las tierras obtenidas fueron cernidas para separar restos vegetales y piedras y luego tamizadas a través de mallas de 4 y 2 mm para obtener un material homogéneo. Las muestras fueron conservadas en bolsas cerradas a 4 °C hasta su análisis.

III.A.2. Medios de cultivo

Medio Salino Basal (MSB) (Espeche y col., 1994)

Composición final en g/l:

4 g NH_4NO_3

0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,01 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,01 g EDTA

0,01 g MnSO_4

0,03 g CuSO_4

0,01 g ZnCl_2

1,8 g KH_2PO_4

7,9 g Na_2HPO_4

0,2 g Extracto Levadura

pH = 7,5

Buffer Fosfatos

1,8 g de KH_2PO_4

7,9 g de Na_2HPO_4

Soluciones madre

Solución 1

40,0 g NH_4NO_3

0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,1 g ZnCl_2

H₂O csp, 300 ml

Solución 2

2,0 g MgSO₄.7H₂O

0,1 g FeSO₄.7H₂O

0,1 g EDTA

H₂O csp, 300 ml

Solución 3

0,1 g MnSO₄

0,3 g CuSO₄

H₂O csp, 300 ml

Se esterilizan en autoclave las 3 soluciones por separado, se dejan enfriar a 60 °C y se agregan 30 ml de cada una de ellas a 910 ml de buffer fosfatos.

Para preparar MSB agarizado se agregan 1,6 % de agar. En caso de usar cicloheximida para evitar el crecimiento fúngico, se agregan 10 ml/l de una solución 0,5 g/l del compuesto.

Agar gasoil (AGO)

Al MSB, agregar 1-2 % de gasoil previamente esterilizado en autoclave durante 20 min a 121 °C. Se agregan 1,6 % de agar.

Agar CPS (Wynn-Williams, 1992)

Composición en g/l

Solución A

0,5 g Peptona

1 ml Glicerol

0,5 g Extracto de levadura

0,05 g MgSO₄.7H₂O

4 gotas FeCl₃ (0,01 p/v)

H₂O, csp 100 ml

Solución B

0,5 g Caseína

0,5 g Almidón

0,2 g K_2HPO_4 H_2O , csp 100 ml

Se esterilizan las soluciones A y B por separado. Se dejan enfriar a 60 °C y se agregan 10 ml de cada solución a 80 ml de agar al 1,6 %. Se ajusta el pH a 6,9 con NaOH estéril. En caso de usar cicloheximida para evitar el crecimiento fúngico, se agregan 10 ml/l de una solución 0,5 g/l del compuesto.

Caldo R3 (Reasoner y Geldreich, 1985)

Composición en g/l

1 g Extracto de levadura

1 g Proteosa peptona N°3

1 g Casaminoácidos

1 g Glucosa

1 g Almidón soluble

0,5 g Piruvato de sodio

0,6 g K_2HPO_4 0,1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

El pH se ajusta a 7,2 con soluciones de NaOH ó HCl 10 % y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Medio Mineral Líquido (MML) (Vecchioli y col., 1990)

Composición en g/l

5 g NaCl

1 g K_2HPO_4 1 g $(NH_4)H_2PO_4$ 1 g $(NH_4)_2SO_4$

0,2 g MgSO_4

3 g KNO_3

El pH se ajusta a 7,0 con soluciones de NaOH ó HCl 10 % y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Medio Mineral Sólido (MMS)

Se agregan 15 g/l de agar agar (Difco) al medio de cultivo MML.

Caldo Luria (LB)

Composición en g/l

10 g Bacto-peptona

5 g Bacto-extracto de levadura

5 g NaCl

El pH se ajusta a 7,0 con soluciones de NaOH ó HCl 10 % y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min. Para obtener el medio agarizado se agregan 15 g/l de agar. Para obtenerlas placas de LB + Ampicilina agregan 0,1 g/l de ampicilina al medio de cultivo a 50 °C.

Medio SOC

Composición en g/l

20 g Triptona

5 g Extracto de levadura

10 ml de solución de NaCl 1M

2,5 ml de solución de MgCl_2 2 M

10 ml de solución de Glucosa 2 M

El MgCl_2 y la Glucosa se esterilizan por filtración. El resto de los componentes se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min.

III.A.3. Cepas y consorcios bacterianos

Los inóculos degradadores de hidrocarburos fueron agregados al suelo en una concentración inicial de 1×10^6 - 1×10^8 UFC/gr suelo, dependiendo del ensayo. Los mismos fueron:

ADH: *Rhodococcus sp.* Cepa sicrotolerante Gram +, no móvil y aeróbia estricta, aislada previamente del suelo de los alrededores de las cisternas de almacenamiento de gas oil en la Base Jubany, Isla 25 de Mayo, Antártida (Mac Cormack, 1999).

M10: Consorcio bacteriano sicrotolerante degradador de HAPs y gasoil previamente aislado de suelos contaminados de la Base Marambio (Ruberto y col., 2006).

MAD: Mezcla de bacterias preparada mediante la combinación de: *Rhodococcus ADH*, *Pedobacter sp.*, *Stenotrophomonas sp.* y 5 cepas de *Pseudomonas sp.* Excepto ADH, el resto de los componentes de MAD formaban parte de los componentes cultivables del consorcio M10 (Mestre, 2006).

III.A.4. Soportes para inmovilización

Se utilizaron como soportes quitina en copos (carcasa del camarón), turba micronizada, suelo prístino esterilizado por autoclave.

III.A.5. Nutrientes

Los nutrientes utilizados para los distintos ensayos fueron:

-SI: cantidad necesaria de las sales inorgánicas NH_4NO_3 , Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 para equilibrar la relación C:N:P del suelo a un valor cercano a 100:10:1.

-Harina de pescado: fuente compleja de nutrientes orgánicos (provista por la compañía pesquera PESPASA SA, Buenos Aires, Argentina) que ha sido referida como exitosa para mejorar los procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en zonas de clima frío. Esta matriz aporta como componentes principales 62,25 % de proteínas, 7,48 % de lípidos, 1,12 % de fibras, 10 % de agua, 7,57 % de calcio, 9,0 % de nitrógeno total y 4,27 % de fósforo. También posee un nivel alto de minerales como Se, Zn, y Cu. Es un producto rico en vitamina del grupo B, especialmente colina, biotina, riboflavina y B12 además de las vitaminas A y D.

-NPK: fertilizante comercial de liberación lenta, que suministra al suelo 120 g de nitrógeno y 50 g de fósforo y g de potasio por kg de material. Se presenta en forma de pequeñas bolitas recubiertas que permiten la liberación lenta a lo largo del tiempo del nutriente.

-OSE II[®] (Oil Spill Eater International, Corp.): nutriente oleofílico comercial recomendado por la Agencia Nacional de Protección Ambiental, EPA (U.S. EPA, 2002). El mismo es un aditivo que incluye nitrógeno, fósforo, carbono disponible, enzimas y vitaminas que favorecen la biodegradación de contaminantes (Zhu y col., 2004) y son aptos para trabajar a bajas temperaturas.

El surfactante utilizado para los distintos ensayos fue:

-Brij700[®] (Sigma-Aldrich): agente activo superficial no iónico, altamente solubilizador. Es un eter estearil polioxietileno de alto peso molecular (4670 g) el cual posee un balance hidrofílico/lipofílico de 18.8.

III.B. Metodología

III.B.1. Preparación de los inóculos

Para cultivar la cepa ADH, se inocularon 600 µl de suspensión criopreservada en 60 ml de MSB adicionado con n-dodecano 1 % como fuente de carbono y energía. El cultivo fue incubado a 15 °C hasta alcanzar la etapa exponencial tardía (alrededor de 72 hs para esta cepa). Luego se

centrifugó 5 min a 15.000 rpm. El pellet se lavó 3 veces con solución fisiológica y se resuspendió en alícuotas en 1,5 ml.

Para cultivar el consorcio M10, se inocularon 300 µl de suspensión criopreservada en 30 ml de medio MSB suplementado con fenantreno 0,1 % como fuente de carbono y energía. El cultivo fue incubado durante 8 días a 15 °C y 250 rpm. Luego se centrifugó 15 min a 15.000 rpm. El pellet se lavó 3 veces con solución fisiológica y se resuspendió en alícuotas de 1,5 ml.

Para cultivar el consorcio MAD, utilizado en el ensayo de bioaumentación descrito en el apartado VI.C.4 se hicieron crecer cada uno de sus integrantes por separado: *Rhodococcus* sp. (ADH), *Pedobacter* sp. (18A), *Stenotrophomonas* sp. (9), *Pseudomonas* sp. (21, 2, 3B1, 4A, 8A) en 50 ml de MSB suplementado con 1 g/l de extracto de levadura y 0,3 g/l de kerosene. Los cultivos se incubaron por 72-96 h a 16 °C con agitación hasta alcanzar una DO correspondiente a 1×10^9 UFC/ml o superior (se disponía de curvas de calibración de recuento vs DO para cada una de las cepas utilizadas). Los cultivos se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en MSB a una concentración aproximada de 1×10^{10} UFC/ml. Posteriormente, se mezclaron las suspensiones de las 5 cepas de *Pseudomonas* sp. y la solución mixta resultante se mezcló con partes iguales de las suspensiones de los otros 3.

III.B.2. Preparación e inmovilización del inóculo en los distintos soportes

Para preparar el soporte **suelo**, se procedió de la siguiente manera:

- El suelo se esterilizó en autoclave dos veces a 121 °C por 15 min, incubándose a temperatura ambiente entre ambos procesos. Posteriormente el suelo estéril se secó en estufa a 105 °C.
- Se hidrataron 200 g del suelo estéril con 40 ml de la suspensión bacteriana de MAD.
- El suelo inoculado se incubó a 16 °C durante 10 días, mezclando cada dos días y se determinó humedad y recuento de bacterias heterótrofas (BH) en agar CPS y de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) en AGO. El procedimiento se describe más adelante, en la sección III.B.9 de este capítulo. Luego, el suelo se conservó a 4 °C hasta su uso.

Para preparar el soporte **turba micronizada**, se procedió de la siguiente manera:

- Se pre-trató el material con 7 % p/p de CO_3Ca , se hidrató con diez veces su volumen de agua, se agregó una gota de Tween 80 y se ajustó a pH 6,5-7.

-Se hidrató con un 20 % v/v de agua destilada y se esterilizó en autoclave dos veces a 121 °C por 15 min, incubándose a temperatura ambiente entre ambos procesos. Posteriormente el material se secó en estufa a 105 °C.

-Se pesaron 50 g de turba, los cuales se hidrataron con 40 ml de una suspensión bacteriana de MAD y 40 ml de MSB para lograr un material húmedo pero no anegado.

-Se incubaron a 16 °C durante 10 días, mezclando cada dos días y se determinó la humedad y los recuentos de BH en CPS y de BDH en AGO. Luego, el material se conservó a 4 °C hasta su uso.

Para preparar el soporte **quitina en copos**, se procedió de la siguiente manera:

-Los copos de quitina se ubicaron en placas de Petri de vidrio y se esterizaron en autoclave dos veces a 121 °C por 15 min, incubándose a temperatura ambiente entre ambos procesos. Posteriormente el material se secó en estufa a 105 °C.

-Se prepararon dos erlenmeyer de 300 ml conteniendo cada uno: 100 ml de MSB con 0,2 % de kerosene, 0,25 g de copos y 1 ml de la suspensión bacteriana. Los frascos se incubaron durante 7 días a 16 °C y 150 rpm de agitación.

-Se determinó la humedad y los recuentos de BH en CPS y de BDH en AGO. Finalmente, el material se conservó a 4 °C hasta su uso.

III.B.3. Determinación de la capacidad degradadora de hidrocarburos

El crecimiento de la cepa ADH y el consorcio M10 en diferentes hidrocarburos como única fuente de carbono y energía (tantos puros como en mezclas complejas) fue evaluado en placas de 24 pocillos (2 ml cada uno) utilizando 1,5 ml de MSB, 10 µl de hidrocarburo, 25 µl de suspensión microbiana (DO_{580nm}) y 2,6 µl de aceptor final de electrones 2,6 diclorofenol indofenol (2,6 DCPIP). El crecimiento fue detectado por el cambio de color de azul (oxidado) a incoloro (reducido). Las placas se incubaron a 20 °C durante 48 hs (Hanson y col. (1993).

Las curvas de crecimiento y los parámetros cinéticos básicos de la cepa ADH y el consorcio M10 se obtuvieron mediante cultivos (triplicados) en frascos Erlenmeyers de 250 ml agitados a 250 rpm y conteniendo 25 ml de MSB y gasoil (1 % p/v) como única fuente de carbono y energía. Los cultivos se incubaron a 20 °C, temperatura considerada de referencia para el cultivo de microorganismos sicrotolerantes (no sicrófilos estrictos). La utilización de éste combustible

como sustrato se basó en la hipótesis de que para el caso de M10, por tratarse de un consorcio, una mezcla compleja de hidrocarburos podría resultar más adecuada para lograr las mayores velocidades específicas de crecimiento aparente (μ_a) en las condiciones estudiadas. Por su parte, la cepa ADH mostró en gasoil su mayor capacidad de crecimiento (ver Capítulo VI, Tabla VI.1), además de haber sido aislada en una mezcla compleja de hidrocarburos (Ruberto y col., 2005)

Por otro lado, el gasoil es, por lejos, la mayor fuente de contaminación en las bases antárticas que representan el objetivo principal de los estudios desarrollados en esta tesis.

Como inóculo se utilizó una suspensión microbiana obtenida luego de centrifugar, lavar y resuspender en solución fisiológica una fracción de un cultivo de ocho días con gasoil como única fuente de carbono y energía. Este cultivo había sido preparado, a su vez, a partir de las suspensiones stock de los microorganismos criopreservadas en glicerol 40 % a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ arriba mencionadas.

La velocidad específica de crecimiento máxima (μ) se calculó según lo propuesto por Pirt (1975). Para el caso del consorcio M10 se utilizó como parámetro de comparación un valor de μ aparente (μ_a), ya que, al tratarse de una compleja mezcla de microorganismos, cada uno con una capacidad diferente de crecimiento dentro de la mezcla, no puede aplicarse estrictamente la definición del parámetro cinético μ tal como se define para un microorganismo aislado.

III.B.4. Caracterización microscópica

La morfología celular de la cepa ADH y de los componentes del consorcio M10 (Figuras VI.3 y VI.4) fueron analizados mediante microscopía electrónica de transmisión (MET, modelo 301; Philips). Se partió de los inóculos preparados según sección III.B.1.

Las muestras fueron procesadas en el Instituto de Neurobiología –CONICET. Estas fueron primero fijadas utilizando glutaraldehído 2,5 % en buffer fosfato salino (PBS) 0,1 M. Luego de lavar las muestras con PBS 0.1 M y centrifugar se resuspendió el pellet en buffer fosfato (BF) conteniendo tetróxido de osmio 1 %. Luego de 1 h a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ las muestras se lavaron con BF 0,1 M durante 10 min. La deshidratación de la muestra se realizó mediante exposición sucesiva (5 min) a etanol 50 %, 70 %, 96 % y 100 %. El proceso de inclusión comprendió la exposición de la muestra en acetona pura (3 veces durante 5 min), luego acetona + resina spurr en relaciones

volumétricas 3:1 (2 h), 2:2 (3 h) y 1:3 (5 h) y posteriormente resina spurr pura (una primera exposición de 2 h, luego un recambio de resina y exposición “overnight” y finalmente un nuevo cambio y exposición de 2 h) para luego polimerizar a 60 °C durante 8 h. El “taco” conteniendo la muestra se cortó en micrótopo en láminas de 700-900 Å de espesor y se montaron en rejillas de cobre de 3 mm de diámetro. Las muestras ya montadas se tiñeron con acetato de uranilo 2 % y citrato de plomo Reynolds (Reynolds, 1963).

La observación del consorcio M10 o de la mezcla MAD adheridos a la superficie de soportes inertes se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), para lo cual se utilizó el equipo del Servicio de Microscopía Avanzada de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Para ello, alícuotas de la fracción celular de los cultivos, previamente lavadas dos veces con solución fisiológica fueron trasferidas a una solución de fijado conteniendo 1 % de glutaraldehído en buffer cacodilato 0,1 M, pH 7.0. Luego de 10 min las muestras se lavaron con agua destilada durante 5 min. El material fue posteriormente deshidratado mediante una serie de lavados con etanol con la siguiente secuencia: 1°: 2 lavados de 15 min en etanol 50 %; 2°: 2 lavados de 15 min con etanol 70 %; 3°: 2 lavados de 15 min con etanol 90 % y 4°: 2 lavados de 15 min con etanol 100 %. Posteriormente, las muestras se sumergieron 30 min en una solución de etanol: HDMS (1,1,1,3,3,3-hexametildisilano) en relación volumétrica 1:1 y se infiltraron durante 60 min con HDMS 100 %. Luego de 60 min el HDMS fue removido con pipeta, dejando a las muestras secarse durante 12 h. Finalmente las muestras se ubicaron en la grilla para MEB y se recubrieron con oro/paladio para su observación.

III.B.5. Determinación de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana

La hidrofobicidad es una propiedad que expresa la afinidad de un microorganismo por una fase orgánica. Para determinar el grado de hidrofobicidad de la superficie bacteriana se centrifugaron (15 min a 3000 rpm y 4 °C) 45 ml de un cultivo de 24 hs crecido en caldo R3 utilizando una centrífuga refrigerada (Sorvall RC-SB Refrigerated Superspeed Centrifuge). Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en buffer de movilidad (BM: 1,75 g/l de K_2HPO_4 ; 0,037 g/l de EDTA) hasta una $DO_{600\text{ nm}} \sim 1$ (DO_i). En tubos conteniendo 0.3 ml del hidrocarburo n-hexadecano, se agregaron 3 ml de la suspensión celular. Se utilizó como control un tubo conteniendo 0.5 ml de n-hexadecano y 5 ml de BM. Los tubos se dejaron en reposo

durante 10 min, se agitaron en vortex durante un minuto y se dejaron en reposo nuevamente por 35 min para permitir la separación de ambas fases. Se tomó 1 ml de la fase acuosa y se realizó la correspondiente medida de DO a 600 nm (DO_f para los tubos con cultivo y DO_c para los tubos control). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

La cantidad relativa de bacterias en ambos solventes es una medida de su hidrofobicidad y puede ser expresada como porcentaje de hidrofobicidad con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Hidrofobicidad} = \{ [\text{DO}_i - (\text{DO}_f - \text{DO}_c)] / \text{DO}_i \} * 100$$

III.B.6. Determinación de la adhesión de las células bacterianas a partículas de suelo

Para determinar la capacidad de las células bacterianas de adherirse a las partículas de suelo se centrifugaron (15 min a 3000 rpm y 4 °C) 45 ml de un cultivo de 24 hs en caldo R3 utilizando una centrífuga refrigerada (Sorvall RC-SB Refrigerated Superspeed Centrifuge). Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en BM hasta una DO_{600 nm} ~ 0.7 (DO_i). En tubos conteniendo 1 g de tierra estéril, se agregaron 10 ml de la suspensión celular. Se utilizó como control un tubo conteniendo 10 ml de BM y 1 g de tierra estéril. Los tubos se dejaron en reposo durante 10 min, se agitaron en vortex durante un minuto y se dejaron en reposo por 35 min para decantar las partículas de suelo. Se tomó 1 ml de la fase superior (cerca de la superficie) y se realizó la correspondiente medida de DO a 600 nm (DO_f para los tubos con cultivo y DO_c para los tubos control). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

En esta técnica, la adhesión a las partículas de suelo se cuantifica midiendo la caída de turbidez en la fase superior respecto de la suspensión de cultivo inicial. Esta relación puede expresarse como porcentaje de adhesión con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Adhesión} = \{ [\text{DO}_i - (\text{DO}_f - \text{DO}_c)] / \text{DO}_i \} * 100$$

III.B.7. Determinación de la capacidad quimiotáctica

Para determinar la capacidad quimiotáctica de las bacterias, un cultivo de 24 hs en caldo R3 incubado a 30 °C se centrifugó (20 min a 3000 rpm y 4 °C) en centrífuga refrigerada. Luego de descartar el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en BM hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}} \sim 0.8$.

Se puso a punto una técnica (“placa de swarming”) para detectar el fenómeno de quimiotaxis hacia hidrocarburos. Para ello se preparó una placa de MML con agar al 0.2 % suplementando con 600 µl del hidrocarburo previamente disuelto en etanol (8.5 mg del hidrocarburo/ml de etanol).

Se sembraron 10 µl de la suspensión bacteriana en estudio en el centro de cada placa y se incubó durante 12 h o más a 30 °C con observaciones periódicas (Lanfranconi y col., 2003). La formación de anillos de desarrollo concéntricos a partir del punto de siembra fue interpretada como quimiotaxis positiva por movimiento de tipo swarming y la formación de halos difusos como quimiotaxis positiva por movimiento de tipo swimming. Paralelamente, se prepararon placas con MML y agar al 0.2 % suplementando con casaminoácidos (0.05 %) como control positivo de movilidad.

III.B.8. Determinación de la capacidad de formación de biofilm en una superficie inerte

El protocolo de formación de biofilm fue adaptado a partir de la metodología descrita por O’Toole y Kolter (1998). A partir de un cultivo de 24 h en frascos agitados (250 rpm) conteniendo caldo R3 e incubados a 30 °C, se inocularon 2 ml en tubos de poliestireno y se utilizaron como control 3 tubos con 2 ml de caldo R3 sin inóculo. Los tubos se mantuvieron en agitación a 120 rpm y 30 °C. Se tomaron 3 tubos a distintos tiempos, se agregaron 50 µl de cristal violeta 1 % y se mantuvieron 15 min a temperatura ambiente. Luego el líquido teñido de los tubos se descartó y los tubos se lavaron con agua destilada. Por sobre las paredes del tubo se agregaron 500 µl de Etanol 95 % (dos veces) para desprender las células adheridas. Se agregó 1 ml de agua destilada y se midió la $DO_{580\text{ nm}}$ de la fase alcohólica, la cual representó una medida de la concentración de bacterias adheridas al poliestireno.

III.B.9. Preparación de los microcosmos de suelo

A continuación se describe el diseño experimental y la preparación de los distintos ensayos realizados con suelos contaminados con hidrocarburos. Cabe señalar que los t0 de todos los microcosmos fueron procesados el mismo día que se agregan los fertilizantes o los inóculos.

a) Parcelas “on site” en Antártida (CAV 2006-07)

Para la realización del ensayo descrito en el apartado IV.A se utilizaron, como sistemas experimentales, parcelas definidas directamente sobre el terreno, conteniendo suelo CRO1, al cual se le determinó una concentración de hidrocarburos totales por Espectroscopía Infrarroja (IR) de 10336 mg/kg de peso seco. Las parcelas se delimitaron utilizando marcos de madera de 50 x 50 cm y 15 cm de profundidad y fueron rellenas con 20 kg de suelo crónicamente contaminado con gas oil antártico, previamente tamizado (Figura III.6). Las parcelas se distribuyeron en el terreno, al aire libre, expuestas directamente a las condiciones climáticas imperantes en la zona y posteriormente fueron agregados los distintos nutrientes a evaluar.

Diseño de los Microcosmos:

Se plantearon los siguientes sistemas experimentales por triplicado:

CC: Control de comunidad (suelo crónicamente contaminado sin tratamiento alguno)

SI: Suelo crónicamente contaminado suplementado con 400 ml de una solución de nutrientes en forma de sales inorgánicas (100 g/l de NH_4NO_3 , 12,9 g/l de Na_2HPO_4 y 3 g/l de KH_2PO_4 , se adicionó el volumen necesario para alcanzar una relación C:N:P en el suelo de aproximadamente 100:10:1).

SIB: Suelo crónicamente contaminado suplementado con 400 ml de una solución de nutrientes inorgánicos (la misma que en SI) y con el surfactante comercial Brij700[®] al 1,5 % p/p.

HP: Suelo crónicamente contaminado suplementado con harina de pescado 3 % p/p.

HPB: Suelo crónicamente contaminado suplementado con harina de pescado 3 % p/p y Brij700[®] 1,5 % p/p.

OSE: Suelo crónicamente contaminado suplementado con el producto comercial OSE II[®], 15 ml/kg de suelo.

En todas las parcelas se agregaron 400 ml de agua destilada estéril antes de cada muestreo para mantener la humedad en niveles adecuados y la tierra fue vigorosamente mezclada con una pequeña pala metálica. Se siguió la evolución del ensayo durante 45 días, con muestreos de cada parcela por triplicado a los 0, 6, 10, 15, 25, 35 y 45 días de iniciado el ensayo para posterior análisis de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos.

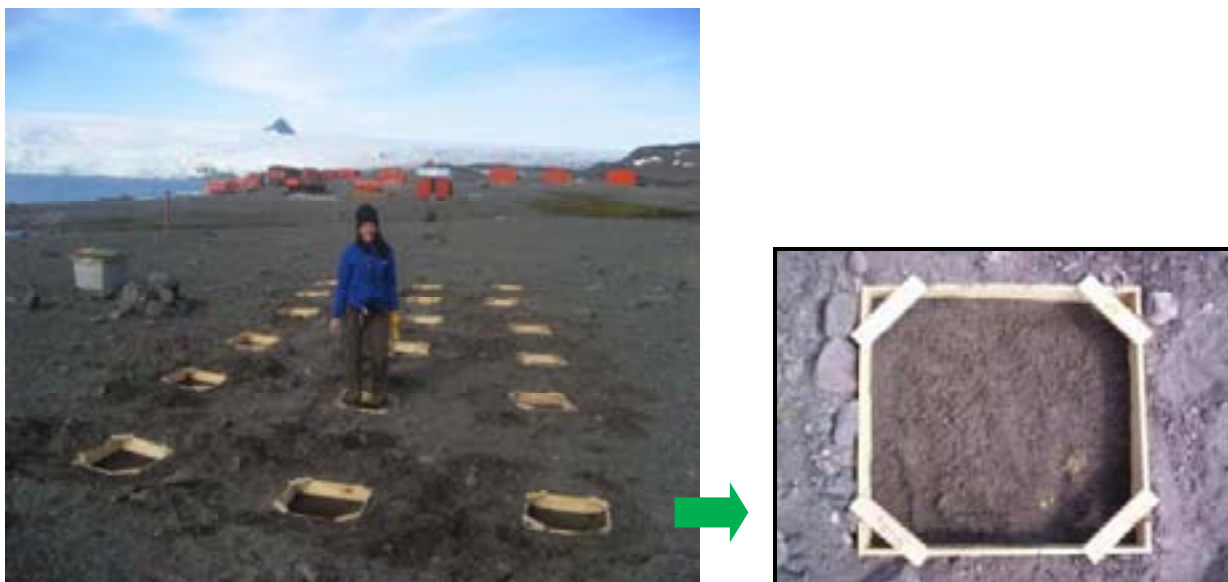


Figura III.6. Diseño y distribución de las parcelas correspondientes al ensayo de biorremediación “*on site*” de suelo crónicamente contaminado en base Jubany, Antártida.

b) Biopilas “on site” en Antártida (CAV 2007-08)

Para la realización del ensayo descrito en el apartado IV.B se utilizaron, como sistemas experimentales, pequeñas biopilas contenidas en recipientes plásticos y preparadas con el suelo CRO1 previamente tamizado, al cual se le determinó una concentración de hidrocarburos totales por IR de 12.572 mg/kg de peso seco.

Las biopilas consistieron en montículos de 30 kg de suelo crónicamente contaminado con gasoil antártico, dispuestos en bateas de plástico de 20 cm de altura para así aminorar los efectos

de erosión por el viento durante las estrictas condiciones antárticas (Figura III.7). Las biopilas fueron ubicadas al aire libre, expuestas directamente a las condiciones climáticas imperantes en la zona. Posteriormente, se agregaron los distintos nutrientes a evaluar.

Diseño de los Microcosmos:

Se plantearon los siguientes sistemas experimentales por triplicado:

CC: Control de comunidad (suelo crónicamente contaminado sin tratamiento alguno).

CCB: Control de comunidad (suelo crónicamente contaminado y adicionado con el surfactante Brij700[®] 0,3 % p/p.

SIB: Suelo crónicamente contaminado suplementado con 960 ml de una solución de nutrientes en forma de sales inorgánicas (63,23 g/l de NH₄NO₃, 8,23 g/l de Na₂HPO₄ y 1,875 g/l de KH₂PO₄) y surfactante comercial Brij700[®] 0,3 % p/p al inicio del ensayo. Las cantidades de sales agregadas fueron las teóricas necesarias para alcanzar la relación 100:10:1 del suelo. A los 10 y 30 días de ensayo, se repitió nuevamente la adición de nutrientes inorgánicos, pero esta vez agregando 25 % de la solución agregada al inicio.

HPB: Suelo crónicamente contaminado suplementado con harina de pescado 3 % p/p y Brij700[®] 0,3 % p/p.

NPKB: Suelo crónicamente contaminado suplementado con fertilizante NPK 0,56 % p/p y Brij700[®] 0,3 % p/p.

SI + M10: Suelo crónicamente contaminado suplementado con la misma cantidad de sales inorgánicas que la biopila SIB y bioaumentado con 700 ml de un cultivo del consorcio M10 (1.3 x 10⁸UFC/ml) lo que determinó una concentración final en el suelo de 3 x 10⁶UFC/g suelo). Esta biopila se realizó con el objetivo de estudiar el efecto del agregado de un inóculo bacteriano (bioaumentación), sobre la flora autóctona del suelo. Y los resultados obtenidos se describen aparte de los del resto de los sistemas, en el Capítulo VI, apartado VI.3.

En todas las biopilas, se agregaron 960 ml de agua destilada estéril antes de cada muestreo para mantener la humedad en niveles adecuados y el suelo fue vigorosamente mezclado con una palita metálica. .

Se siguió la evolución del ensayo durante 39 días, con muestreos de cada biopila por triplicado a los 0, 5, 10, 15, 30 y 39 días de iniciado el ensayo para posterior análisis de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos.



Figura III.7. (a) Preparación, (b) aspecto y (c) localización de las biopilas con suelo crónicamente contaminado en la Base Jubany.

c) **Biopilas “on site” en Antártida (CAV 2009-10)**

Para la realización del ensayo descrito en el apartado IV.C se utilizaron, como sistemas experimentales, pequeñas biopilas contenidas en recipientes plásticos y preparadas con el suelo CRO2 previamente tamizado, al cual se le determinó una concentración de hidrocarburos totales por Cromatografía Gaseosa (GC) de 21.909 mg/kg de peso seco. Este suelo tenía la particularidad de que a pesar de estar crónicamente contaminado, continuaba recibiendo hidrocarburos hasta el momento de realizado el ensayo debido a la pérdida de una tubería cercana que transportaba gasoil.

En este ensayo, se modificó el diseño experimental realizado en las Biopilas “on site” de la CAV 2007-2008. Las biopilas se construyeron en las mismas bateas y con la misma cantidad (30 kg) de suelo contaminado con gasoil antártico y tamizado por malla de 2 mm. Sin embargo, no se mantuvieron al aire libre sino que fueron ubicadas debajo de una de las casas de la base Jubany, donde existe un espacio de 1,20 m de altura (Figura III.8). De esta forma, si bien estaban expuestas a las extremas temperaturas y al efecto del viento, se buscó proteger a los microcosmos de una excesiva anegación producto de las repetidas precipitaciones que se registran en esa época del año en la región producto del cambio climático. Posteriormente, se agregaron los distintos nutrientes a ser evaluados.

Diseño de los microcosmos:

Se plantearon los siguientes sistemas experimentales por triplicado:

CC: Control de comunidad (suelo crónicamente contaminado sin tratamiento alguno).

HP: Suelo crónicamente contaminado suplementado con harina de pescado 3 % p/p.

OSE: Suelo crónicamente contaminado suplementado con el producto comercial OSE II[®], 15 ml/kg de suelo.

En todas las biopilas se agregaron 960 ml de agua destilada estéril antes de cada muestreo para mantener la humedad en niveles adecuados y el suelo fue vigorosamente mezclado con una pala metálica.

Se siguió la evolución del ensayo durante la campaña de verano, con muestreos de cada biopila por triplicado a los 0, 5, 16, 30 y 50 días. Además, se realizaron muestreos adicionales durante el resto del año, con tomas a los 365 días, completando más de 1 año de estudio. Todas las muestras de suelo se sometieron a análisis de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos.

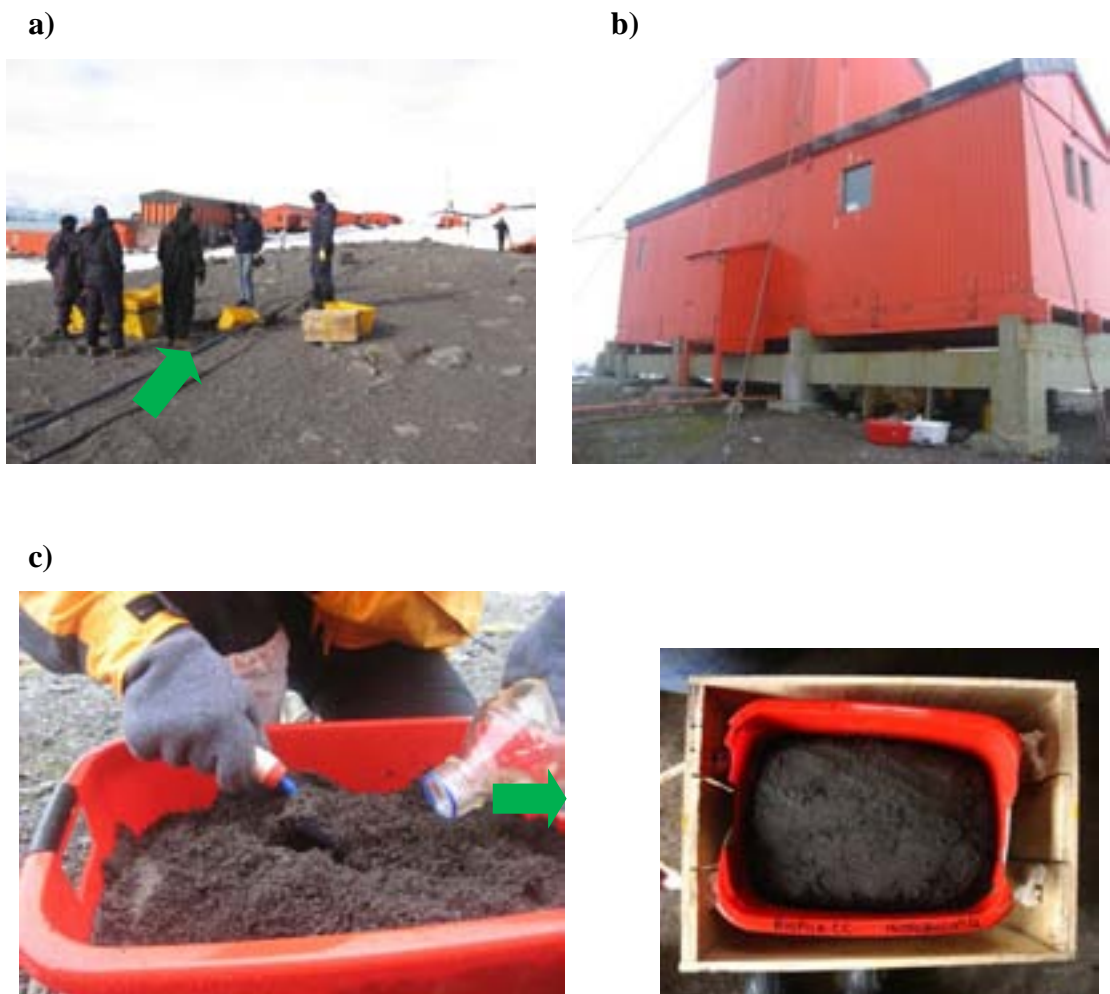


Figura III.8. Microcosmos (biopilas) con suelo crónicamente contaminado en la Base Jubany. **a)** Sitio de la rotura de la cañería que transportaba GOA. **b)** Casa de la base Jubany debajo de la cual fueron ubicadas las bateas conteniendo las biopilas. **c)** Preparación (derecha) y vista superior (izquierda) de una biopila. Para transportar y evitar el congelamiento de la batea (y las posibles roturas) se ubicó la biopila en una caja de madera.

d) **Microcosmos “on site” en Antártida (CAV 2009-10) con inóculos bacterianos inmovilizados**

Para la realización del ensayo descrito en el apartado VI.4. se utilizaron, como sistemas experimentales, microcosmos contruidos con cajas de plástico revestidas en su interior con papel de aluminio, las cuales se llenaron con 5 kg de suelo contaminado en forma aguda con gasoil antártico (Figura III.9). Se utilizó el suelo PRI, el cual fue contaminado con gasoil estéril y al que se le determinó una concentración de hidrocarburos totales por GC de 362,5 mg/kg de peso seco. Los microcosmos fueron ubicados dentro de una de las casas de la base Jubany, donde se mantuvo una temperatura de incubación promedio de 15 °C. Posteriormente, se agregó y mezcló con el suelo, el inóculo inmovilizado en distintos soportes.

Diseño de los microcosmos:

Se plantearon los siguientes sistemas experimentales por triplicado:

CC: Suelo prístino contaminado en forma aguda y sin ningún tratamiento adicional.

MAD: bioaumentado con 75 ml de un cultivo del consorcio MAD (3.5×10^8 UFC/ml) lo que determinó una concentración final en el suelo de 5×10^6 UFC/g suelo.

SU: Suelo contaminado en forma aguda y adicionado con 9,1 g de suelo inoculado con 2.8×10^9 UFC del consorcio MAD por g de suelo seco.

TUR: Suelo contaminado en forma aguda y adicionado con 0,85 g de turba micronizada inoculada con 3×10^{10} UFC del consorcio MAD por g de turba seca.

COP: Suelo contaminado en forma aguda y adicionado con 0,85 g de copos de quitina inoculados con 3×10^{10} UFC del consorcio MAD por g de copos secos.



Figura III.9. Aspecto general y detalle de los microcosmos conteniendo suelo contaminado en forma aguda con gasoil y sometidos a un proceso de bioaumentación con un consorcio bacteriano (MAD) inmovilizado en diferentes matrices inertes.

Cada uno de los microcosmos se bioestimuló con 110 ml de una solución de nutrientes en forma de sales inorgánicas: 122 g/l de NH_4NO_3 ; 15,9 g/l de Na_2HPO_4 y 3,45 g/l de KH_2PO_4 . El agregado de estas sales se realizó en tres etapas: 50 % al inicio y 50 % a los 30 días de ensayo. Luego se agregaron 100 ml de agua destilada estéril para mantener la humedad en valores adecuados. Se siguió la evolución del ensayo durante 40 días, con muestreos de cada microcosmo por triplicado a los 0, 5, 10, 30 y 40 días de iniciado el ensayo para posterior análisis de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos.

e) Microcosmos de suelo antártico en frascos (I)

Para la realización del ensayo descrito en el apartado VI.2.B se utilizaron, como sistemas experimentales microcosmos por triplicado contruidos con frascos de 40 cm³, los cuales se llenaron con 20 g de tierra agudamente contaminada. Se utilizó el suelo PRI, el cual fue contaminado con gas oil, el principal combustible contaminante en las bases antárticas, y al que se determinó una concentración de hidrocarburos totales por IR de 4089 mg/kg de peso seco.

El suelo utilizado fue esterilizado (tres veces a 121 °C durante 15 min) para eliminar la competencia del inóculo con la biota presente,

Diseño de microcosmos:

Se plantearon los siguientes sistemas experimentales:

ADH ó M10: Suelo contaminado en forma aguda sólo bioaumentado con 1 ml (7.2×10^7 UFC/ml) de la cepa ADH lo que determinó una concentración final en el suelo de $3,6 \times 10^6$ UFC/g suelo o con 1 ml (4.07×10^9 UFC/ml) del consorcio bacteriano M10 lo que determinó una concentración final en el suelo de 2×10^8 UFC/g suelo.

ADH ó M10 + NPK: Suelo contaminado en forma aguda bioestimulado con fertilizante comercial (Nitrofoska 0,5 % p/p) y bioaumentado con las mismas concentraciones descriptas en ADH ó M10.

ADH ó M10 + SI: Suelo contaminado en forma aguda bioestimulado con 1 ml de una solución de nutrientes en forma de sales inorgánicas (53 g/l de Na_2HPO_4 y 35 g/l de KH_2PO_4) y bioaumentado con las mismas concentraciones descriptas en ADH ó M10.

ADH ó M10 + HP: Suelo contaminado en forma aguda bioestimulado con harina de pescado 0,7 % p/p y bioaumentado con las mismas concentraciones descriptas en ADH ó M10.

En todos los frascos se agregaron 2 ml de agua destilada estéril para mantener la humedad en valores adecuados. Los microcosmos se incubaron a 15 °C durante 52 días, con muestreos a los 0, 7, 14, 28 y 42 y 56 días. En cada muestreo se sacrificaron 3 frascos (réplicas independientes) de cada diseño experimental para el posterior análisis de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos.

f) **Microcosmos de suelo Antártico en frascos (II)**

Para la realización del ensayo descrito en el apartado VI.2.A se utilizaron, como sistemas experimentales microcosmos por triplicado contruidos con frascos de 40 cm³, los cuales se llenaron con 20 g de suelo CRO1. Luego se agregaron los nutrientes a analizar y el inóculo M10 y los frascos fueron ubicados a la intemperie, donde la media de temperatura ambiental fue de 4,6 °C.

Diseño de los microcosmos:

Se plantearon los siguientes sistemas experimentales:

CC: Control de comunidad (suelo crónicamente contaminado sin tratamiento alguno).

SI: Suelo crónicamente contaminado suplementado con solución de nutrientes en forma de sales inorgánicas (61 g/l de NH_4NO_3 ; 0.005 g/l de Na_2HPO_4 y 0,0012 g/l de KH_2PO_4).

SI + M10: suelo crónicamente contaminado bioaumentado con 0,5 ml de un cultivo del consorcio M10 (8.4×10^7 UFC/ml) lo que determinó una concentración final en el suelo de $2,1 \times 10^6$ UFC/g suelo). El microcosmo fue suplementado con las mismas cantidades de sales inorgánicas que en SI.

En todos los frascos se agregaron 0,5 ml de agua destilada estéril para mantener la humedad en valores adecuados. Los microcosmos se incubaron durante 9 días, con muestreos a los 0, 1, 3, 5, 7 y 9 días. En cada muestreo se sacrificaron 3 frascos (réplicas independientes) de cada diseño experimental para su posterior análisis.

g) Microcosmos en frascos con suelo del Polo petroquímico La Plata-Ensenada (I)

Para la realización del ensayo descrito en el apartado V.B se utilizaron, como sistemas experimentales microcosmos contruidos con frascos de 1000 cm^3 , los cuales se llenaron con 250 gr de tierra (Figura III.10). Se utilizaron los suelos O, B y Mez, a los cuales se les determinó una concentración de hidrocarburos totales (HT) por GC de 395 mg/kg de peso seco, 292,7 mg/kg de peso seco y 245,5 mg/kg de peso seco, respectivamente. Para la tierra O también se determinaron 12 mg/kg de HAPs.

Para Mez, se realizó una mezcla de O y B en una relación 2:1, que determinaría teóricamente una concentración de HT de 295 mg/kg. Este dato teórico se aproximó al determinado analíticamente. Una vez ubicado el suelo en los microcosmos, se agregaron los diferentes nutrientes a analizar.



Figura III.10. Aspecto de los microcosmos conteniendo suelo contaminado proveniente del polo petroquímico La Plata-Ensenada

Diseño de los microcosmos:

Se plantearon los siguientes sistemas experimentales:

B: Tierra crónicamente contaminada del Barrio Mosconi, sin aditivos.

O: Tierra crónicamente contaminada del Canal Oeste, sin aditivos.

Mez: Mezcla de tierras M y O en una relación 2:1, sin aditivos.

BHP: Tierra del Barrio Mosconi bioestimulada con harina de pescado al 3% p/p.

OHP: Tierra de Canal Oeste bioestimulada con harina de pescado al 3 % p/p.

MezHP: Mezcla de tierras B y O en una relación 2:1, bioestimulada con harina de pescado al 3 % p/p.

Los microcosmos se incubaron a 25 °C durante 263 días, con muestreos de cada frasco por triplicado a los 0, 6, 13, 22, 48, 103 y 263 días de incubación. Cada sistema experimental fue preparado por triplicado.

h) Microcosmos en frascos con suelo del Polo petroquímico La Plata-Ensenada (II)

Para la realización del ensayo descrito en el apartado V.C se utilizaron, como sistemas experimentales microcosmos construidos con frascos de 1000 cm³, los cuales se llenaron con 250 gr de tierra, al igual que en el ensayo descrito en el apartado anterior.

Se utilizó el suelo Mez, al cual se le determinó una concentración de hidrocarburos totales por IR de 1607,1 mg/kg de peso seco. Una vez ubicado el suelo en los microcosmos, se agregaron los diferentes nutrientes a analizar.

Diseño de microcosmos:

Se plantearon los siguientes sistemas experimentales:

Mez: Mezcla de tierras B y O en una relación 2:1, sin aditivos.

HP: Mezcla de tierras B y O en una relación 2:1 suplementada con harina de pescado al 3 % p/p.

HPB: Mezcla de tierras B y O en una relación 2:1 suplementada con harina de pescado al 3 % p/p y Brij700[®] 1,5 % p/p.

SI: Mezcla de tierras B y O en una relación 2:1 suplementada con 8 ml de una solución de nutrientes en forma de sales inorgánicas (60g/l de NH₄NO₃; 7,9 g/l de Na₂HPO₄ y 1,8 g/l de K₂HPO₄).

SIB: Mezcla de tierras B y O en una relación 2:1 suplementada con una solución de nutrientes inorgánicos (la misma que en MezSI) y Brij700[®] 1,5 % p/p.

NPK: Mezcla de tierras B y O en una relación 2:1 suplementada con fertilizante comercial 0,5 % p/p.

Los microcosmos se incubaron a 25 °C durante 120 días, con muestreos de cada frasco por triplicado a los 0, 4, 11, 16, 24, 36, 44 y 120 días de incubación. Cada sistema experimental fue preparado por triplicado.

III.B.10. Determinación del contenido de humedad, medida del pH y de la temperatura

El contenido de agua de los suelos estudiados se estimó gravimétricamente, por diferencia de peso antes y después de haber sometido a una muestra (por triplicado) a calentamiento en estufa a 110 °C durante 24 h. La diferencia de peso respecto al suelo húmedo se expresó como porcentaje de humedad.

El pH del suelo se midió (por triplicado) durante los muestreos con un pHmetro marca Hanna a partir de suspensiones del suelo en agua destilada (10 g en 100 ml) previamente agitadas vigorosamente.

La temperatura del suelo durante los ensayos realizados en Antártida fue medida con un termómetro digital (Hanna) dos veces por día por triplicado, introduciendo el sensor de temperatura en el suelo de los microcosmos.

III.B.11. Recuento de microorganismos viables

En todos los casos, los recuentos bacterianos de los suelos de los diferentes ensayos se realizaron a partir de 1 g de suelo colocado en un vial estéril. Se agregaron 10 ml de SF + 1 % Tween 20. Se agitó en vortex por 3 min y se dejó decantar 1 min. Se transfirieron 100 µl a un tubo Eppendorf conteniendo 0,9 ml de SF. Se agitó y se repitió el procedimiento hasta alcanzar la dilución estimada como adecuada. Se sembraron sendas alícuotas de 50 µl de cada dilución en cada una de las dos hemiplacas de una placa de Petri y se distribuyeron homogéneamente con espátula de Drigalsky. Se utilizó esta metodología tanto para bacterias heterótrofas (BH) en CPS como para bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) en AGO (Figura III.11).

Para los ensayos con suelo provenientes de clima frío, las placas se incubaron a 15 °C durante 4 semanas y las lecturas se realizaron a los 15 y 30 días. En cambio, para los ensayos de suelo proveniente de clima templado, las placas se incubaron a 27 °C durante 15 días.

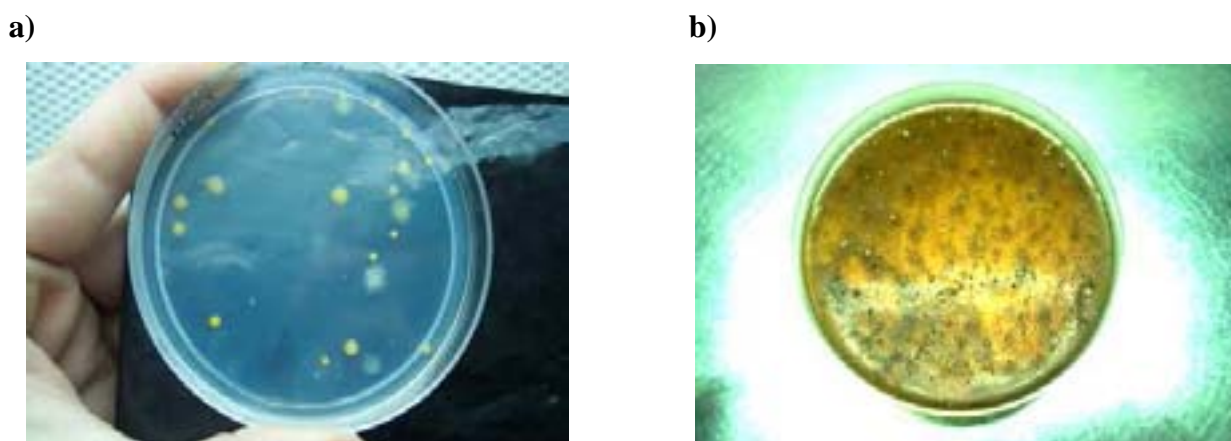


Figura III.11. Aspecto de una placa sembrada para recuento de bacterias heterótrofas (BH) en agar CPS (izquierda) y de una placa para recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos en agar gasoil (derecha).

Para estimar los recuentos de BH y BDH en los soportes con el consorcio MAD inmovilizado, se pesó 1 g del soporte en un tubo Falcon estéril y se agregó una punta de espátula de arena estéril y 9,9 ml de solución de Locke: 1,5 % (p/v) NaCl, 0,04 % (p/v) MgCl₂, 0,01 % (p/v) KCl, pH: 7. Se agitó vigorosamente en vortex por 5 min, se dejó decantar y se realizaron las diluciones correspondientes de la manera descrita en el apartado anterior.

Para los copos de quitina, se pesaron 0,1 g de copos, se lavaron con 10 ml de solución de Locke (para eliminar los microorganismos no adheridos), se transfirieron con pinza estéril a un tubo Eppendorf, se lavaron nuevamente con 1 ml de solución de Locke y luego se resuspendieron en 1 ml de la misma solución conteniendo arena estéril. Se agitó vigorosamente en vortex por 5 min, se dejó decantar y se realizaron las diluciones correspondientes de la manera descrita en el apartado anterior.

III.B.12. Cuantificación de hidrocarburos totales

a) Cuantificación por espectrometría infrarroja (IR)

En la mayoría de los estudios la cuantificación de los hidrocarburos totales del petróleo se realizó por espectrometría infrarroja según una modificación del método EPA 418.1 (US Environmental Protection Agency 1983).

A partir de muestras de suelo, se pesó 1 g de tierra en un vial de vidrio de 20 ml con tapa hermética de metal. Luego se agregaron 10 ml de CCl_4 (grado cromatográfico) y una punta de espátula de Na_2SO_4 anhidro. Las muestras se sonicaron *overnight* (Baño ultrasónico Branson 2210) se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min y una alícuota de las mismas se trasvasó a una celda de cuarzo para ser analizadas en un espectrómetro IR (Buck Model HC404).

Para la cuantificación de hidrocarburos a partir de medios de cultivo se colocaron 25 ml del mismo en un tubo de teflon® de 50 ml de capacidad. Se lavó el Erlenmeyer utilizado para el cultivo con 2 fracciones de 10 ml de CCl_4 grado HPLC. Estas fracciones fueron reunidas con el medio de cultivo en el tubo de teflon®, que se cerró herméticamente. Los tubos y su contenido fueron tratados en un baño ultrasónico (Branson 2210) por 12 h y luego colocados en un shaker por 24 h, para completar la extracción de los hidrocarburos. Los tubos fueron centrifugados a 10.000 rpm (centrifuga Sorvall 5C plus) por 20 min y la fase orgánica transferida a un vial de vidrio conteniendo una punta de espátula de Na_2SO_4 . Una fracción del sobrenadante de estas muestras fue transferido a una celda de cuarzo y analizada en un espectrómetro IR (Buck Model HC404). La calibración del método se llevó a cabo mezclando 15 ml de n-hexadecano, 15 ml de isooctano y 10 ml de clorobenceno (Sigma-Aldrich) en una botella de 50 ml con tapón.

En algunos de los ensayos los hidrocarburos totales se cuantificaron por cromatografía gaseosa (CG). Si bien en algunos casos el análisis se realizó a fin de discernir los diferentes componentes presentes en las mezclas utilizadas en los ensayos, en otros casos, especialmente los últimos llevados a cabo durante este trabajo de tesis, se realizó debido a las restricciones impuestas sobre la importación del solvente utilizado para la extracción (CCl_4). En estos casos se ubicaron 5 g de suelo en un vial de vidrio de 20 ml con una tapa hermética de metal. Luego se agregaron 10 ml de CH_2Cl_2 (grado cromatográfico) y una punta de espátula de Na_2SO_4 anhidro. La muestra se sonicó 1 h, se centrifugó a 2500 rpm por 15 min, se separó el sobrenadante y se trasvasó a un vial para su inyección en el cromatógrafo gaseoso. Se utilizó un equipo Shimadzu

GC-9A GC equipado con un detector FID. El programa de temperatura del horno comprendió 1 min a 100 °C y luego una rampa de 10 °C min⁻¹ hasta 250 °C, temperatura que se mantuvo por 5 min. La temperatura del inyector fue de 280 °C y la columna capilar utilizada (30 m x 0,25 mm-i.d) poseía un recubrimiento de 5 % de PH-ME siloxano (0,25 μm de capa interna). El gas carrier (He₂) se utilizó a un flujo de 31 cm/ s. Los datos fueron adquiridos y analizados empleando el software PC-Chrom.

III.B.13. Actividad microbiana mediante la enzima deshidrogenasa

Para realizar este método, que cuantifica la actividad deshidrogenasa de las células intactas se pesaron 5 g de tierra húmeda en frascos de 50 ml de capacidad y se agregaron 5 ml de una solución de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolium, TTC (sustrato), preparada al 1 % en buffer Tris 100 mM. El pH del buffer utilizado varía según el pH de la muestra. Para suelos ácidos se utiliza buffer pH 7,7; para suelos neutros pH 7,6 y para suelos alcalinos pH 7,4. La determinación se realizó por triplicado. Como blanco de la reacción se incubó la muestra con buffer sin el agregado de la solución de TTC. Los frascos cerrados fueron incubados a 30 °C durante 24 h. Luego de transcurrido el tiempo de incubación se detuvo la reacción con 40 ml de acetona. Los frascos se dejaron en la oscuridad (debido a la sensibilidad frente a la luz de las soluciones de TTC) durante 2 h, agitándose cada 30 min. Posteriormente una porción del extracto de la muestra de tierra fue filtrado y se midió su absorbancia a 546 nm contra el extracto correspondiente al blanco. La reacción tiene como fundamento que el TTC actúa como aceptor alternativo de los electrones cedidos por las deshidrogenas, reduciéndose a Trifenilformazan (TPF) que es detectado colorimétricamente (Thalman, 1968). Los resultados fueron expresados como μg de TPF producido por gramo de suelo seco utilizando una curva de calibración.

Realización de la curva de calibración

Para construir la curva de calibración se preparó una solución estándar de 50 mg de TPF disuelto en 100 ml de acetona. A partir de esta solución se transfirieron 0,5-1,0- 2,0- 3,0 y 4,0 ml a respectivos matraces de 50 ml de capacidad. Se le agregó a todos 8,3 ml de buffer Tris pH 7,6 y

se enrasaron a volumen con acetona. A continuación se midieron los valores de DO_{546nm} , correspondientes a soluciones de 5, 10, 20, 30 y 40 μg de TPF/ml.

III.B.14. Perfiles de Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE) a partir del gen del ARNr 16S

Extracción de ADN

A 1 g de suelo se le agregaron 2,25 ml de buffer TE, 0,25 ml de SDS 10 %, 30 μl de una solución de proteinasa K 10 mg/ml y 35 μl de una solución de lisozima 300 mg/ml. Se incubó la mezcla a 37 °C por 1 h agitando cada 15 min y posteriormente a 70 °C por 30 min agitando cada 15 min. Luego se agregaron 1,5 g de perlas de vidrio, se agitó en vortex 4 veces por periodos de 1 min y manualmente 3 veces por periodos de 1 min. La muestra se centrifugó 10 min a 6000 rpm y luego se guardó el sobrenadante obtenido en freezer de -80 °C. Posteriormente se repitió la extracción de esa misma muestra de suelo pero solo agregando buffer TE y SDS 10 % e incubando a 70 °C por 1 h con agitación manual cada 15 min. Se repitieron los mismos pasos que se describieron anteriormente hasta obtener un sobrenadante que se juntó con el obtenido inicialmente y que se había conservado en freezer. A esta muestra se le agregó 1 volumen equivalente de mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó con vortex, y se separó la fase acuosa superior por centrifugación a 8000 rpm durante 5 min, repitiendo esta extracción dos veces. A continuación se adicionaron 0,1 vol de NaCl 5M y 0,6 vol de Isopropanol y se incubó la muestra durante 10 min a temperatura ambiente, mezclando por inversión durante ese tiempo. Luego se centrifugó por 20 min a 14.000 rpm, se lavó el pellet con 2,5 vol de etanol 70 % y se centrifugó 15 min a 14.000 rpm. Al pellet obtenido, previa evaporación del resto del líquido, se le agregaron 50 μl buffer TE precalentado a 60-80 °C. Se dejó resuspender el ADN extraído a 4 °C.

Amplificación de gen del ARNr 16S

Con el objetivo de correr en un gel de DGGE los productos de la amplificación por PCR del gen del ARNr 16S a partir del ADN total de las muestras, se amplificaron las regiones variables V3-V5 del mencionado gen utilizando los primers GC-341F

(5'CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCCCTCCTACGGGAGGCA GCAG-3') y 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3') (Muyzer G. y col., 1998).

Se realizó la mezcla de reacción con 1 µl del ADN genómico extraído, 5 µM de cada primer, 2,5 µM de DNTPs, 10 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA), 5 U/µl de goTaq en su correspondiente buffer 5 X, en un volumen final de 30 µl. La amplificación se realizó en un termociclador Progene FPROGO5Y (Techne, Burlington, NY, USA). El programa incluyó un paso inicial de desnaturalización de 4 min a 95 °C, una primera etapa (10 ciclos) de 94 °C por 30 s; 62 °C por 45 s; y 1 min a 72 °C seguida por una segunda etapa de 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 57 °C, y 72 °C por 1 min. La extensión final fue realizada a 72 °C por 10 min.

Con el objetivo de identificar las 4 colonias aisladas de algunos de los anillos de swarming, se realizó una amplificación parcial por PCR del gen del ARNr 16S utilizando primers universales para bacterias: RD1 (5'-CTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3') y FD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3').

Se realizó la mezcla de reacción con 1 µl del ADN genómico extraído, 0,4 µM de cada primer, 100 µM de DNTPs, 3 mg/ml de BSA, 1,5 U/µl de goTaq en su correspondiente buffer 1X, en un volumen final de 50 µl. El programa incluyó un paso inicial de 2 min a 94 °C; luego 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 72 °C (35 ciclos). La extensión final fue realizada a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados por medio de una electroforesis con gel de agarosa.

Análisis de los productos de PCR mediante DGGE.

Los productos de PCR purificados obtenidos en el paso anteriormente descrito fueron sembrados en un gel de poliacrilamida (acrilamida:N,N'-metileno-bisacrilamida, 37.5:1) con un gradiente desnaturalizante (DGGE) que fue realizado con un equipo Bio-Rad D GENE (Bio-Rad, Munich, Alemania). Se utilizó un gradiente desnaturalizante con un rango de 45 a 70 % (100 % de desnaturalizante corresponde a una solución de urea 7M y una solución de formamida 40 % (vol/ vol). La técnica utilizando un buffer TAE 1 X que contenía AcNa 10 mM, Na₂EDTA 0,5 mM y Tris acetato 20mM, pH 7,4. El gel se corrió a 100 V y 60 °C durante 16 h. Posteriormente se tiñó durante 1 h con SybrGold (Molecular Probes, Eugene, USA) en buffer TAE 1X y se observó bajo luz UV.

Las bandas individuales representan aquellos fragmentos de ADN que han frenado su migración por el gel al desnaturalizarse por completo (excepto la cola de GC).

Los perfiles de bandas obtenidos fueron analizados con el programa GelComparII (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Luego se construyeron dendrogramas (UPGMA: unweighted pair-group moving average method) a partir de las matrices de distancia obtenidas a partir de los valores de densidad óptica correspondientes al análisis, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (Pearson, 1926).

III.B.15. Clonación y secuenciación

Con el objetivo de identificar los grupos taxonómicos predominantes presentes en los ensayos, se seleccionaron productos de PCR al tiempo inicial y final de los sistemas control y de algunos sistemas bioestimulados. Posteriormente se realizó la purificación (Genomic Blood DNA Purification Kit) de dichos productos y su clonación utilizando el sistema pGEM-t easy Kit.

Para la clonación, se utilizaron bacterias competentes preparadas de la siguiente forma:

- 1-Se realizó un cultivo *overnight* de la cepa de E. coli DH5 α .
- 2-Se inocularon 500 μ l del cultivo *overnight* en un frasco Erlenmeyer conteniendo 10 ml de LB.
- 3-Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de 0,5-0,6, se cosecharon las células centrifugándolas a 4000 g durante 5 min. A partir de este paso todo el procedimiento se realizó manteniendo las muestras en baño de hielo.
- 4-Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células, muy suavemente, en 5 ml de CaCl₂ 0,1 M estéril y frío.
- 5-Se mantuvo el tubo *overnight* en posición vertical en la heladera para permitir que las células sedimenten en el fondo.
- 6-Luego se retiraron 4,5 ml del sobrenadante, resuspendiéndose las células en el volumen remanente y fraccionándolas en alícuotas de 100 μ l en tubos Eppendorf estériles y fríos. Estas alícuotas se utilizaron inmediatamente para la clonación.

Para exponer las mezclas de reacción con las bacterias competentes se siguieron las instrucciones del fabricante y luego se sembraron en placas de LB-Ampicilina-IPTG-X-gal preparadas de la siguiente forma:

- a-Se prepararon placas de LB-Ampicilina y se dejaron solidificar.

b-Se vertieron 20 μ l de X-gal (50 mg/ml) y 50 μ l de IPTG (100 mM) sobre la superficie de la placa.

c-Se distribuyó con espátula Drigalsky.

Las placas sembradas se incubaron a 37 °C *overnight*. Luego se picaron 25 clones blancos por tiempo y sistema. Para verificar si los clones obtenidos pertenecen a la comunidad original se realizó lo siguiente:

-Con la punta de un tip se tomó un clon y se suspendió en 30 μ l de agua destilada estéril contenida en tubos de 200 μ l.

-Los tubos se colocaron en un termociclador 10 min a 95 °C (lisis celular).

-Con el material obtenido, se realizó una PCR con los primers con GC anteriormente descritos.

-Los productos de PCR de los clones levantados se corrieron en un gel de DGGE junto a la comunidad de origen con el objetivo de verificar la posición del clon.

Luego los clones verificados se reaislaron en una nueva placa de LB + Ampicilina. A partir del reaislamiento se inoculó un eppendorf con LB+ampicilina inclinado, se incubó 24 hs a 37 °C y se envió a secuenciar (Macrogen[®] Korea).

III.B.16. Análisis de las secuencias

Cada una de las secuencias obtenidas de los perfiles de DGGE, se analizaron utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tools). Se obtuvieron las secuencias con mayor homología en base al porcentaje de máxima identidad (en el BLAST). Para la edición de las secuencias se utilizó el programa BIOEDIT. El análisis taxonómico se realizó utilizando el clasificador RDP Bayesiano Naive rRNA (versión 2.2, Marzo de 2010), basado en la taxonomía y nomenclatura del Manual Bergey de Bacteriología, Vol II (1994). Se tuvo en cuenta un umbral de confianza del 95 %.

III.B.17. Índices de biodiversidad

Los índices de diversidad, H (Shannon, 1948) y dominancia, D (Simpson, 1949) fueron calculados utilizando el programa Paleontological Statistics, PAST (Hammer y col, 2001). Este

programa se basó en los porcentajes de abundancia relativa de cada banda presente en el gel de DGGE. El índice de Shannon contempla la cantidad de especies presentes en el área de estudio (*riqueza de especies*), y la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies (*abundancia*). Se describe como:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \log_2 p_i$$

donde:

- S – número de especies (la riqueza de especies)
- p_i – proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos (es decir la abundancia relativa de la especie i): $\frac{n_i}{N}$
- n_i – número de individuos de la especie i
- N – número de todos los individuos de todas las especies

III.C. Análisis estadístico

Los datos de recuentos y de concentración de hidrocarburos de los diferentes sistemas se compararon mediante ANOVA de medidas repetidas y post-tests de Tukey y Dunnet de comparación múltiple según el caso. En los casos en los que solo se compararon las medias provenientes de dos sistemas se utilizó el test de Student.

El análisis de componentes principales (ACP) fue realizado con el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo y col., 2011). Este análisis se basó en la matriz de abundancia obtenida a partir de las líneas de bandas marcadas con el programa GelComparII. Una línea de banda incluyó todas las bandas que mostraron la misma posición en dos o más calles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO IV

Bioestimulación en áreas de clima frío. Efecto del agregado de nutrientes sobre la degradación de gas oil en suelo crónicamente contaminado

IV.A. Introducción

Como se mencionó en el Capítulo I, la bioestimulación es una estrategia de biorremediación que tiene como objetivo lograr una mayor velocidad de biodegradación de los contaminantes mediante el balance del contenido de nutrientes (especialmente N y P).

Si bien se han obtenido resultados positivos a través de la combinación de la estrategia de bioestimulación y el agregado de compuestos tensioactivos durante la biorremediación, éstos resultan insuficientes y muchas veces no extrapolables a los ambientes de clima frío.

En el caso particular del continente antártico, las temperaturas bajas constantes limitan fuertemente el metabolismo microbiano. Los mecanismos de adaptación de los microorganismos microtolerantes a las condiciones climáticas polares son diferentes a los expresados por los microorganismos degradadores mesófilos. Así mismo, se ha observado que los sistemas y estrategias de biorremediación son, con mucha frecuencia, de naturaleza “sitio específica” por lo cual la optimización de la biorremediación de suelos en Antártida debe ser realizada mediante ensayos *on site* (Yang Si-Zhong y col, 2009). En algunos casos, esta especificidad de sitio parece ser tan estricta que incluso consorcios bacterianos degradadores aislados de suelos de la base Marambio, no fueron efectivos (e incluso causaron efectos negativos sobre la actividad de la microbiota autóctona) al ser inoculados en un suelo contaminado de otra base antártica (Ruberto y col, 2009).

El objetivo general de los estudios presentados en este capítulo fue analizar *on site*, bajo las estrictas condiciones climáticas antárticas, el efecto que tienen distintas fuentes de nutrientes y la combinación de los mismos con surfactantes, sobre la eficiencia de remoción de hidrocarburos por bacterias presentes en suelos crónicamente contaminados con gasoil. Este análisis comprendió estudios a pequeña escala utilizando dos sistemas experimentales diferentes que frecuentemente son utilizados en procesos de biorremediación a mayor escala en terrenos ubicados en áreas templadas: las parcelas y las biopilas.

IV.B. Ensayo de bioestimulación utilizando Parcelas como sistema experimental

Como se indicó en la sección Materiales y Métodos (Capítulo III), en este estudio se ensayaron una fuente inorgánica de nutrientes usualmente utilizada en ensayos de biorremediación

(Nikolopoulou y Kalogerakis, 2008), una fuente orgánica compleja, harina de pescado, que ha sido citada anteriormente como efectiva para favorecer la degradación de hidrocarburos en suelos subantárticos (Delille y col., 2007) y también un producto comercial, OSEII[®], sugerido por la EPA para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos. Por último, y basados en resultados previos, se utilizó el surfactante comercial Brij700[®]. Este producto combinado con nutrientes, resultó efectivo para aumentar la eficiencia de remoción de fenantreno en un ensayo con suelo de la base Jubany (Ruberto y col., 2006) Así, se plantearon los siguientes microcosmos: CC (control no tratado), SI (bioestimulado con sales inorgánicas), SIB (bioestimulado con sales inorgánicas y con Brij700[®]), HP (bioestimulado con harina de pescado), HPB (bioestimulado con harina de pescado y con Brij700[®]) y OSE (bioestimulado con el fertilizante oleofílico OSEII[®]).

IV.B.1. Evolución de las poblaciones cultivables, el pH y la temperatura

La evolución de las poblaciones cultivables de bacterias heterótrofas (BH) y bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) en los diferentes microcosmos se muestran en las Figuras IV.1 y IV.2 respectivamente, expresada como unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco.

Todos los microcosmos evidenciaron una estimulación de las BH durante los primeros 15 días para luego estabilizarse hasta el final del ensayo (Figura IV.1). Los microcosmos con harina de pescado (HP y HPB) fueron la excepción con respecto a la estabilización del crecimiento, ya que mostraron un incremento en los valores de BH hasta el final del ensayo, incrementando más de tres órdenes de magnitud respecto al microcosmo control (CC). Los valores de UFC/g en estos microcosmos a tiempo final resultaron muy similares entre sí y estadísticamente diferentes a los valores del resto de los microcosmos al mismo tiempo ($p < 0,05$). Estos resultados evidencian que la presencia de esta compleja matriz orgánica representa una buena fuente de materia fácilmente asimilable que favorece significativamente el crecimiento, independientemente de la presencia o no de un surfactante. El microcosmo CC mostró los menores valores de recuento de BH resultando a tiempo final significativamente menor que los microcosmos HP y HPB ($p < 0,01$) pero no mostrando diferencias significativas respecto del resto de los microcosmos (SI, SIB y OSE).

Respecto a las BDH (Figura IV.2), todos las fuentes de nutrientes ensayadas, independientemente de la presencia o ausencia de Brij700[®], favorecieron su crecimiento. Nuevamente, los microcosmos HP y HPB mostraron los mayores incrementos (aproximadamente tres órdenes de magnitud) por sobre el microcosmo CC. El microcosmo OSE mostró una evolución de los recuentos de BDH similar a CC, pero con valores mayores ($p < 0,01$).

El microcosmo OSE también resultó significativamente diferente a los microcosmos con harina de pescado ($p < 0,01$), pero no así cuando se lo comparó con los microcosmos con sales inorgánicas. Al analizar solamente los valores al final del ensayo (45 días) las BDH en todos los microcosmos mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p < 0,01$) pero no evidenciaron diferencias por efecto de los nutrientes.

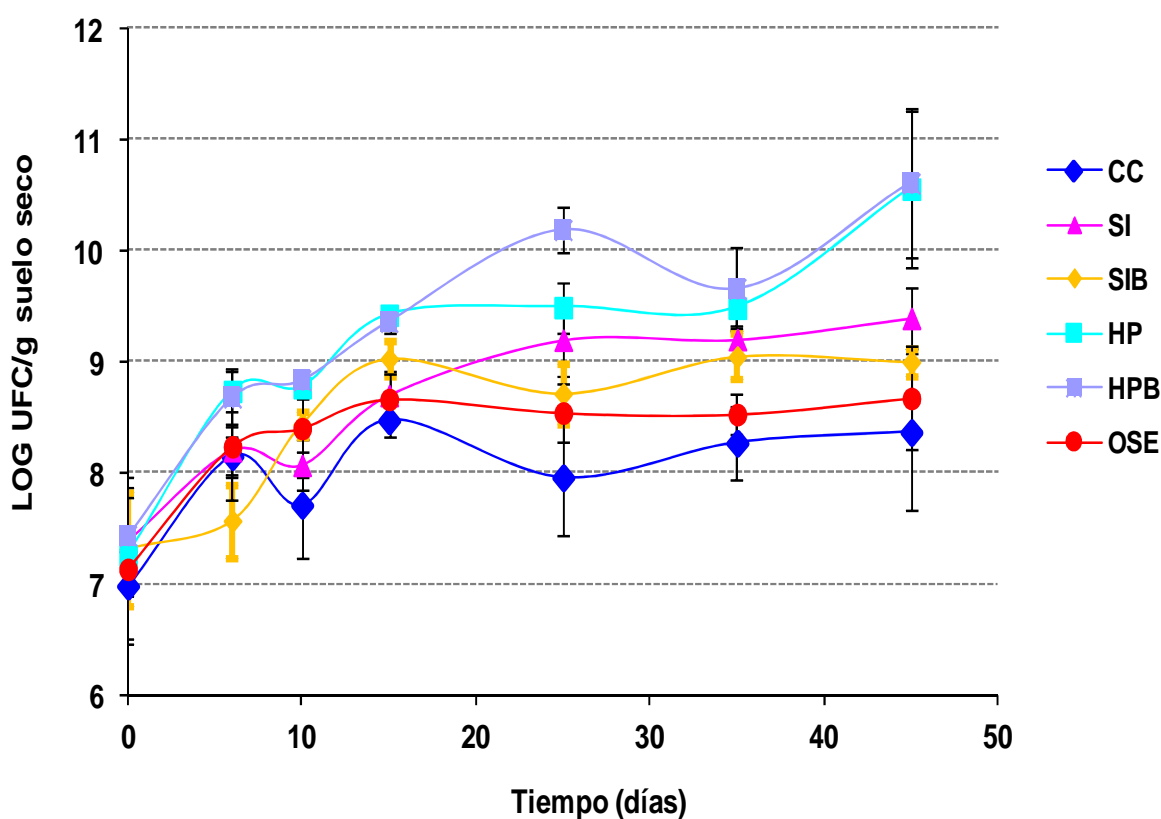


Figura IV.1. Evolución de los recuentos de bacterias heterótrofas (BH) en los microcosmos de parcelas con los distintos tratamientos. Las barras representan la DS de triplicados.

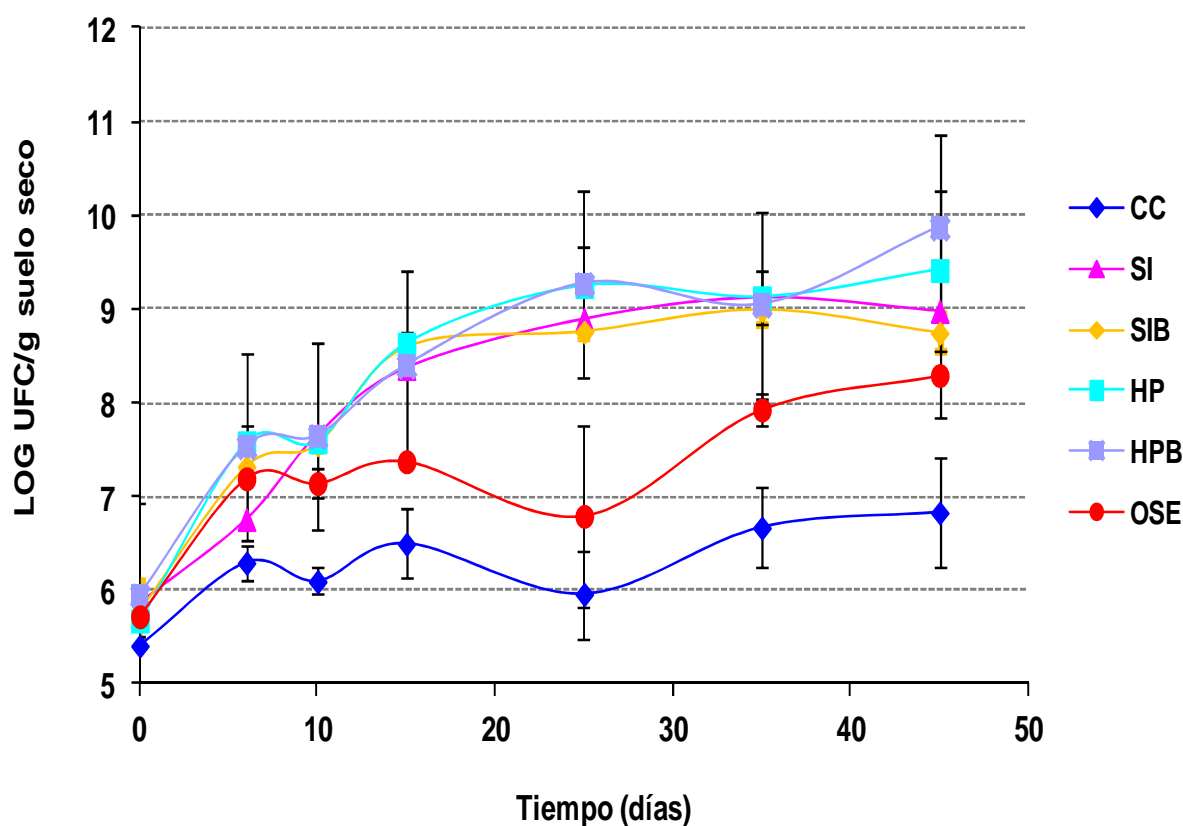


Figura IV.2. Evolución de los recuentos de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) en los microcosmos de parcelas con los distintos tratamientos. Las barras representan la DS de triplicados.

La variación de los valores de pH durante el ensayo en cada uno de los microcosmos se muestra en la Figura IV.3. Puede observarse que el pH al inicio del ensayo resultó ligeramente ácido para todos los microcosmos (pH promedio: 6,12) y luego, durante el ensayo, disminuyó gradualmente hasta un valor promedio de 5,47 a los 35 días. Esta disminución, esperable como consecuencia del aumento de la actividad biológica, no se considera crucial para el desarrollo del proceso de biorremediación en las condiciones ensayadas, ya que no pareció afectar la evolución de los recuentos de BH y BDH.

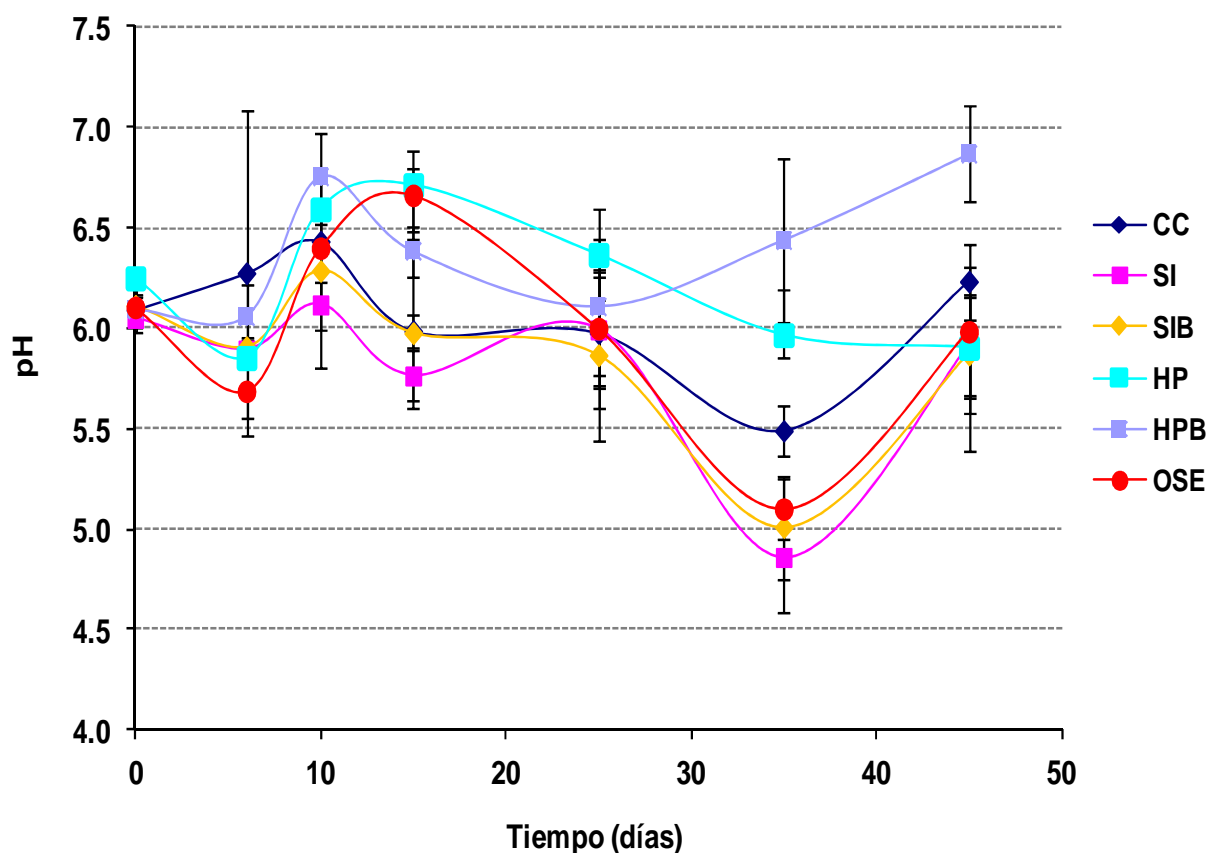


Figura IV.3. Evolución del pH del suelo durante los 45 días de ensayo para cada microcosmos analizado. Las barras representan la DS de la media (triplicados).

Los valores matinales (9 hs) y nocturnos (21 hs) de temperatura del aire en el periodo en el que fue desarrollado el ensayo se muestran en la Figura IV.4. El valor promedio fue de 2,6 °C, la máxima absoluta fue de 7,8 °C y la mínima absoluta fue de -2 °C. Estos resultados evidencian la baja amplitud térmica (sólo 9,8 °C) durante el ensayo. Como es habitual en esta zona de la península antártica, el rango de velocidad del viento fue de 0,2-84 km/h.

La Figura IV.5 exhibe los valores de temperatura del suelo durante la mañana (9 hs) y la noche (21 hs). El valor promedio fue de 4,5 °C. Debe resaltarse la mayor amplitud térmica evidenciada por el sistema suelo (comparada con la del aire) que fue 16,5 °C, con un valor máximo absoluto de 15,1 °C y mínimo absoluto de -1,4 °C. También se observó la presencia de 3 picos de temperaturas nocturnas que superaron los 10 °C. Estos valores reflejan el efecto que tiene la irradiación solar sobre la temperatura del suelo en los días (escasos) en los que la cobertura nubosa es casi nula. Dichos valores evidencian también el hecho que la gran mayoría

de las bacterias aisladas de estos suelos son microtolerantes pero no psicrófilos obligados. El contenido de humedad promedio del suelo fue de 11,7 %.

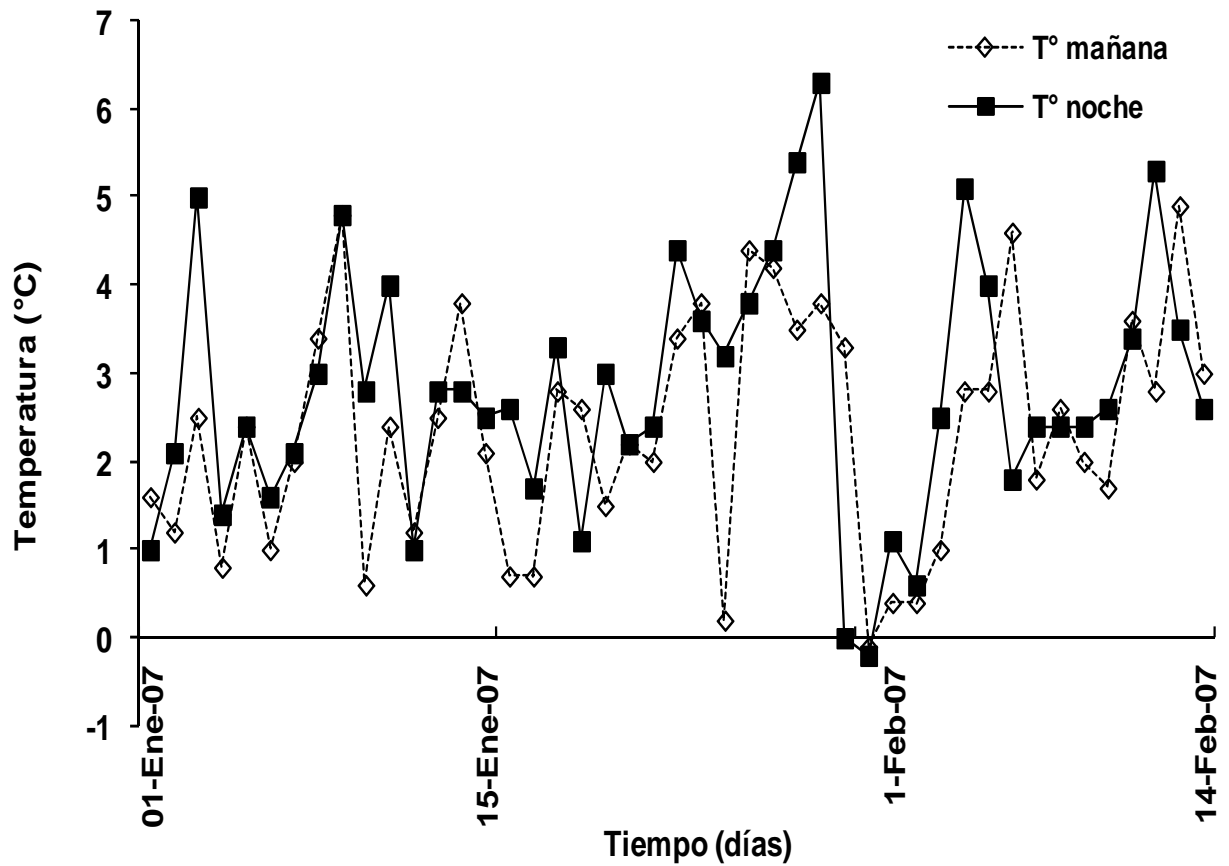


Figura IV.4. Evolución de la temperatura ambiental a la mañana (9 hs, línea azul) y a la noche (21 hs, línea roja) durante los 45 días de ensayo.

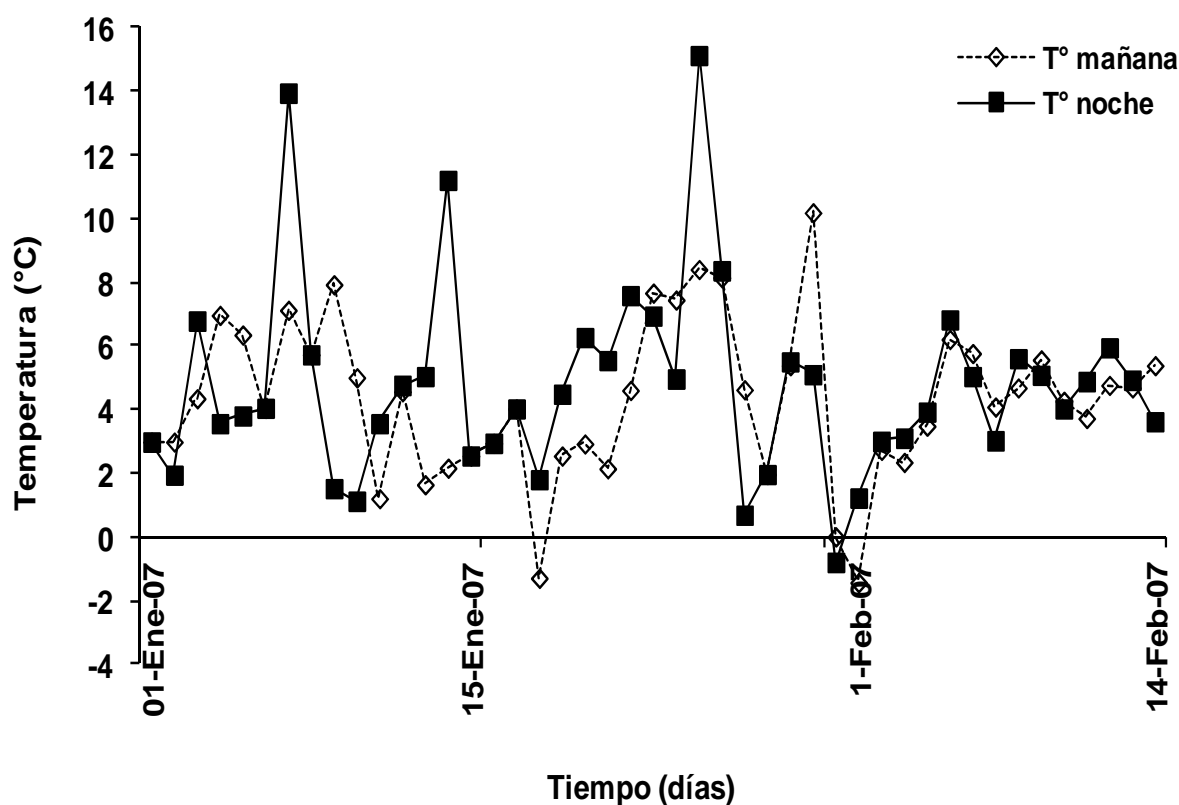


Figura IV.5. Evolución de la temperatura del suelo a la mañana (9 hs, línea verde) y a la noche (21 hs, línea roja) durante los 45 días de ensayo.

IV.B.2. Eliminación de hidrocarburos totales del suelo

En la Figura IV.6 se muestra el valor a tiempo inicial del contenido de hidrocarburos totales (HT) y los valores encontrados en las diferentes parcelas al tiempo final del ensayo (t45).

El microcosmo CC mostró una reducción de los niveles de HT del 42%. Esta eliminación es atribuible a los efectos combinados de biodegradación por la microbiota autóctona (estimulada por la aireación y humedad) y a la pérdida abiótica producida por los diferentes mecanismos físicos y químicos que operan en el suelo durante el proceso.

Al final del ensayo, el microcosmo OSE exhibió una eliminación de hidrocarburos estadísticamente significativa ($p < 0,05$) del 49,4 % en comparación con el sistema control CC al mismo tiempo (t45), lo que representó una disminución del 70,5 % en comparación con el valor registrado a tiempo inicial.

A pesar del importante incremento observado en los recuentos bacterianos (BH y BDH) en las condiciones ensayadas, los microcosmos con harina de pescado no mostraron una reducción significativa de los niveles de HT en comparación con el microcosmo CC (2,9 % y 8,5 % de eliminación para HP y HPB, respectivamente). Si bien los microcosmos estimulados con sales inorgánicas mostraron valores medios de remoción menores a los del microcosmo CC, dicha tendencia tampoco resultó estadísticamente significativa (32,6 % y 18,4 % para SI y SIB respectivamente).

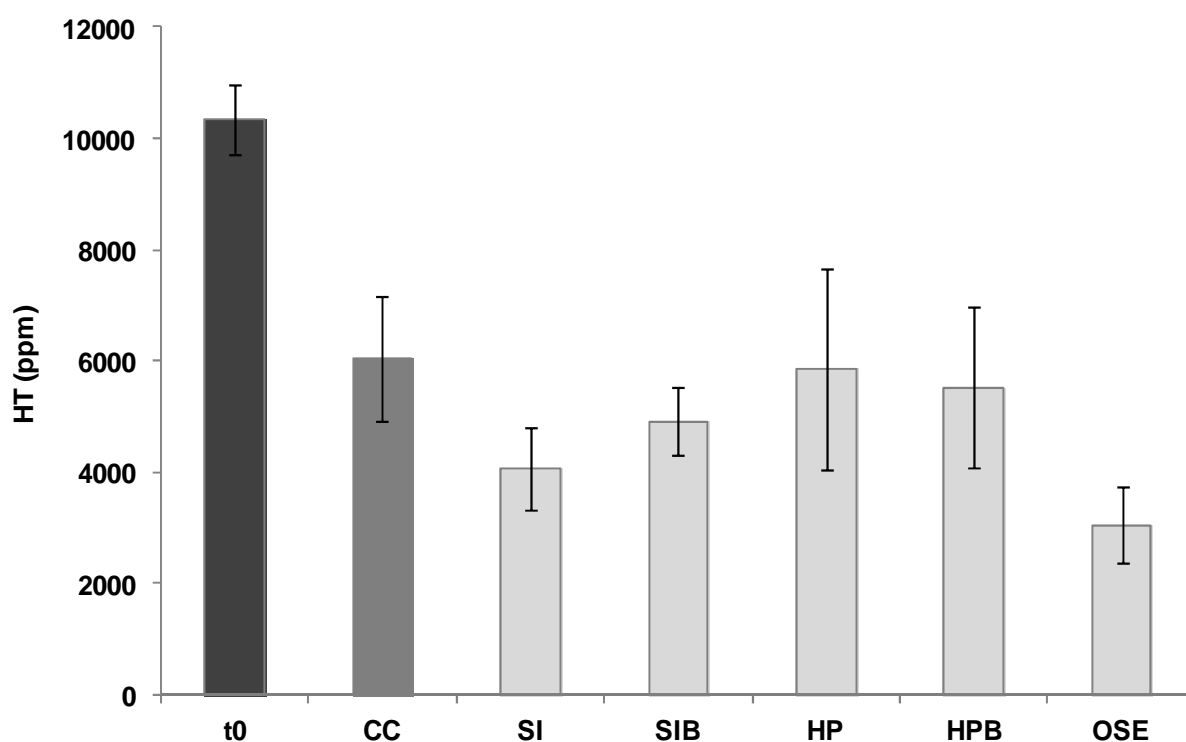


Figura IV.6. Hidrocarburos totales (ppm) a tiempo inicial (t0, barra roja) y 45 días (barras verdes) para cada uno de los microcosmos. Las barras representan la DS de la media (triplicados).

IV.B.3. Dinámica de las comunidades bacterianas

IV.B.3.1. Análisis de la estructura de la comunidad por DGGE

El resultado de la aplicación de la metodología de DGGE para obtener una aproximación de la estructura de las comunidades bacterianas presentes al final del estudio en los diferentes microcosmos ensayados, así como en el suelo control a tiempo inicial, se puede observar en la Figura IV.7.a. El dendrograma obtenido a partir del análisis de los perfiles de bandas del mencionado gel se muestra en la Figura IV.7.b.

En el dendrograma puede observarse claramente que el agregado de nutrientes afecta la composición de la comunidad bacteriana del suelo. El patrón de bandas de los microcosmos bioestimulados con harina de pescado (HP y HPB) formó un cluster menor separándose del resto de los microcosmos agrupados en un cluster mayor, indicando que este nutriente estimula comunidades bacterianas diferentes a las desarrolladas con el resto de los nutrientes estudiados. Dentro del cluster mayor, aquellos bioestimulados con sales inorgánicas (SI y SIB) mostraron un alto porcentaje de similitud entre ellos (94 %). Sin embargo, ambos microcosmos se diferenciaron claramente del resto (CC a t0, CC a t45 y OSE). En estos microcosmos, la presencia del surfactante Brij700[®] no modificó apreciablemente la estructura de la comunidad bacteriana, efecto que si fue observado en los microcosmos con HP.

Las parcelas CC a t45 y OSE mostraron una alta similitud entre sí (74 %), sugiriendo que en ambos microcosmos se seleccionaron poblaciones semejantes y que se mantuvo gran parte de la comunidad original del suelo. Además, la estructura de estas comunidades fue relativamente similar a las presente en el suelo al inicio del estudio. Este resultado evidencia que el producto comercial OSE II[®] fue el que causó los menores cambios en la estructura de la comunidad al ser agregado al suelo antártico contaminado.

El sistema CC a t45 evidenció cambios con respecto al tiempo inicial. Sin embargo, numerosas bandas de dicho sistema permanecieron durante todo el estudio, evidenciando algunas una mayor intensidad que al inicio del mismo. Esto podría deberse al efecto positivo de la aireación y el mezclado sobre algunas poblaciones del suelo utilizado, el cual había permanecido durante varios años almacenado en forma muy compacta en grandes recipientes cerrados.

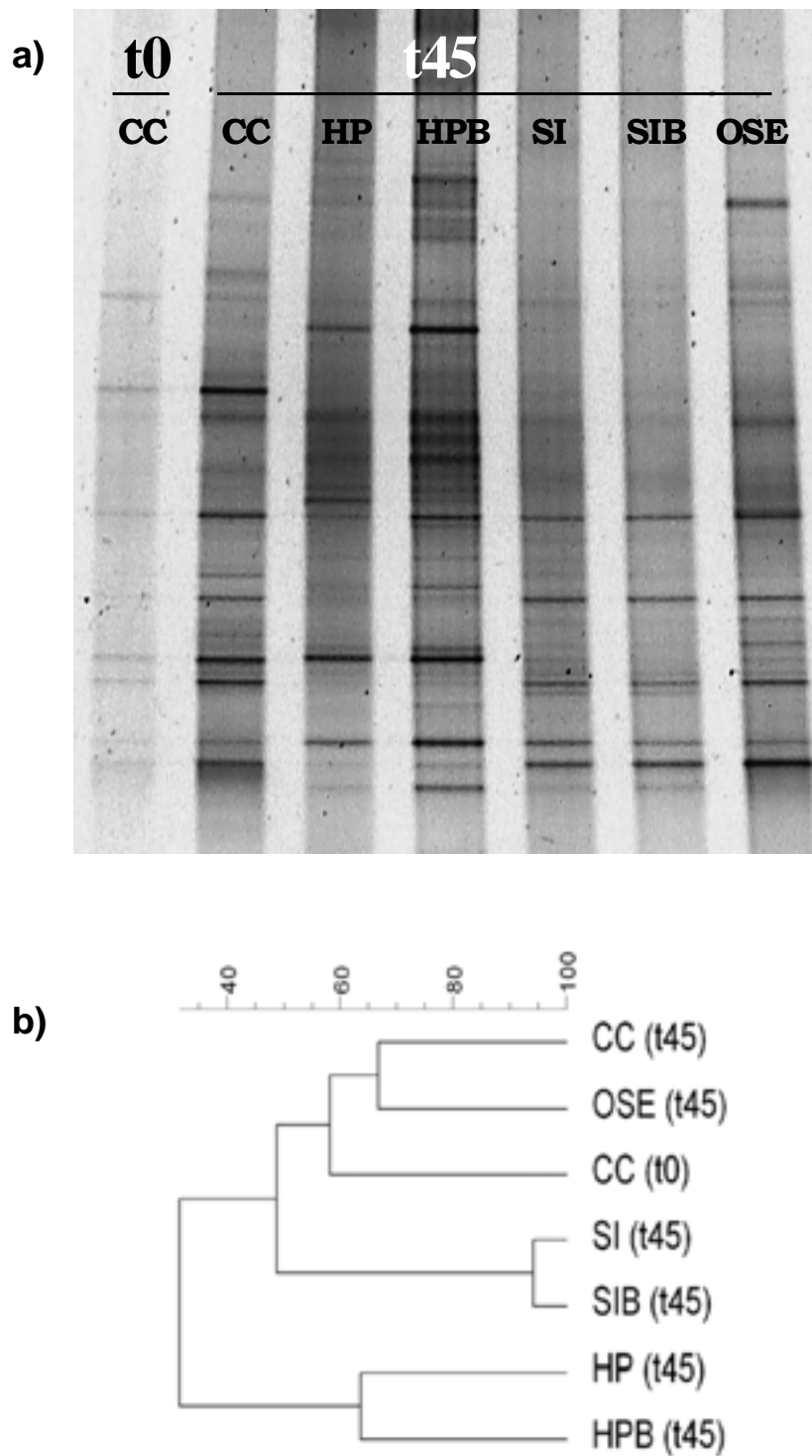


Figura IV.7. Estimación de la estructura de la comunidad bacteriana en los diferentes microcosmos del ensayo de bioestimulación en parcelas. **a)** Imagen del gel de DGGE (urea-formamida: 35-70%). Las calles muestran el perfil de comunidad para el microcosmo control CC a t0 y a t45 junto al resto de los microcosmos. **b)** Dendrograma construido a partir de los perfiles de bandas obtenidos en el gel de DGGE.

IV.B.3.2. Estimación de la biodiversidad bacteriana

La Tabla IV.1 exhibe la riqueza y los índices de dominancia y diversidad bacteriana para el suelo del microcosmo CC a tiempo inicial (t0) y para todos los microcosmos a tiempo final (t45) del ensayo.

Se puede observar que al final del ensayo todos los microcosmos, incluyendo CC, aumentaron su diversidad, principalmente a expensas de un incremento en la riqueza y acompañada también por una disminución en la dominancia al final del ensayo. El único microcosmo que mantuvo un valor de dominancia muy similar al de CC a t0 fue OSE.

Los microcosmos bioestimulados con harina de pescado mostraron los mayores valores de riqueza. Este resultado concuerda con la significativa estimulación de los recuentos de BH y BDH observados en esos microcosmos y las diferencias en el perfil de DGGE. Es probable que la harina de pescado haya favorecido el desarrollo de algunas poblaciones a expensas de una fuente de carbono fácilmente asimilable. El sistema CC mostró al final del estudio un incremento de la riqueza acompañado por una disminución en la dominancia.

El microcosmo OSE a los 45 días fue el que menos se apartó de los valores exhibidos por el control a tiempo inicial. En comparación con el microcosmo CC a t0 sólo mostró un moderado incremento en la diversidad causada casi exclusivamente por un aumento de la riqueza.

Tabla IV.1. Valores de riqueza y de los índices de dominancia y diversidad bacteriana para el microcosmo control a tiempo inicial (t0) y para todos los microcosmos a tiempo final (t45) del ensayo.

Microcosmos	Riqueza (S)	Dominancia (D)	Diversidad (H)
CC (t0)	9	0.147	1.992
CC (t45)	18	0.089	2.609
HP (t45)	20	0.102	2.545
HPB (t45)	26	0.067	2.891
SI (t45)	15	0.087	2.539
SIB (t45)	15	0.116	2.348
OSE (t45)	14	0.140	2.245

IV.B.3.3. Estimación de cambios poblacionales mediante análisis de componentes principales (ACP)

El análisis visual del gel de DGGE mostró diferencias claras entre los microcosmos dependiendo del tipo de bioestimulación. Dichas diferencias se evidenciaron en el dendrograma construido a partir del gel (Figura IV.7.b).

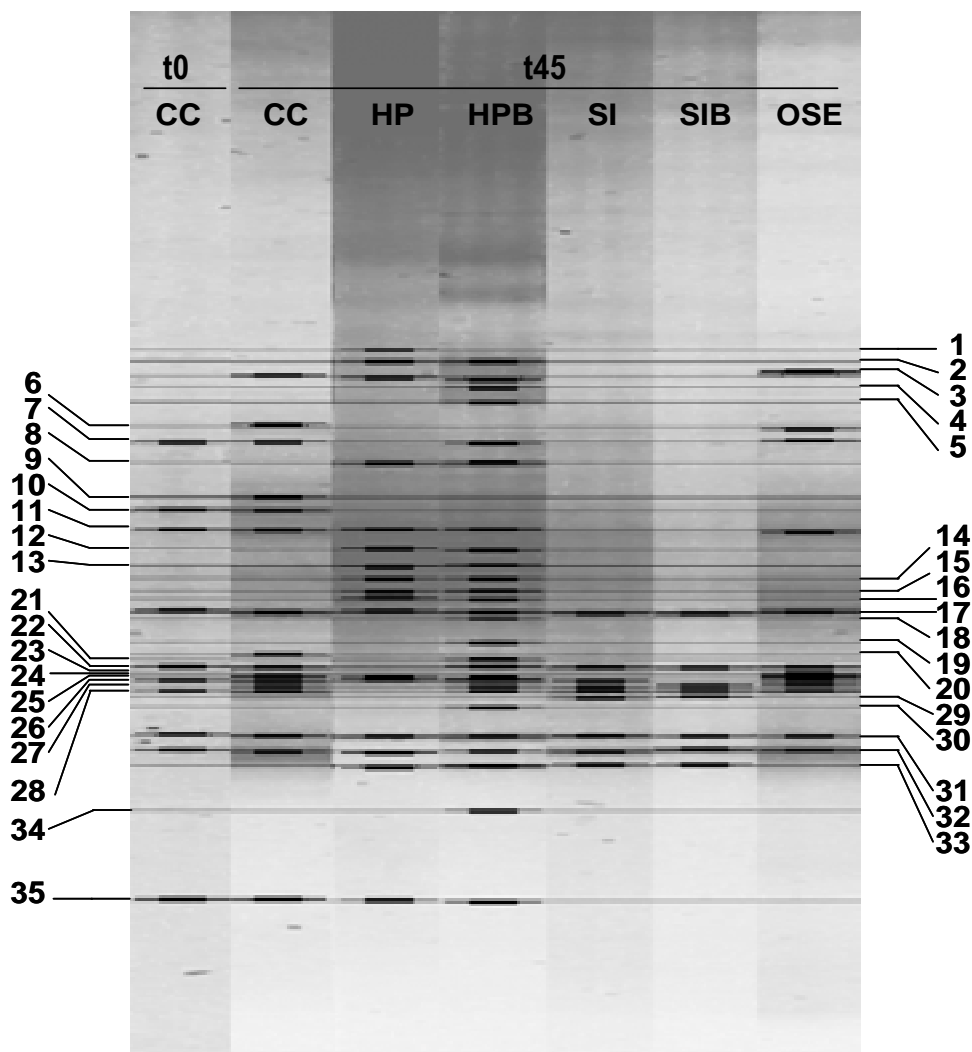


Figura IV.8. Estructura de las comunidades bacterianas de los diferentes microcosmos evidenciada por el gel de DGGE. Las líneas grises marcan la posición de cada banda, las cuales se numeraron correlativamente según su posición en el gel.

Para analizar en mayor detalle los cambios observados en la estructura de la comunidad microbiana del suelo se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP) de tipo no estandarizado, en base a la presencia/ausencia e intensidad relativa de cada banda de DGGE las cuales fueron identificadas con números, según se muestra en la Figura IV.8.

El ACP (Figura IV.9) muestra los ejes del primer (CP1) y segundo componente (CP2) explicando el 60,6 % de la varianza total (CP1: 41,5 % y CP2: 19,1 %). Se observa claramente la diferenciación de los microcosmos HP del resto los sistemas, así como también la diferenciación entre ellos sobre el CP2. Como puede observarse en la Figura IV.8, la harina de pescado favoreció la aparición de bandas nuevas en el gel de DGGE en comparación con el resto de los microcosmos.

Se puede apreciar que el microcosmo HP a t45 está caracterizado por la presencia de las bandas 13, 14, 15 y 16 (entre otras), mientras que el microcosmo HPB a t45 está caracterizado por las bandas 2, 3, 4, 18 y 19.

Por otro lado, los microcosmos CC a t0 y t45 y OSE los cuales se ubican muy cerca en la misma región del gráfico y se encuentran caracterizados principalmente por las bandas 9, 10, 17 y 24. Por último, SI y SIB se caracterizaron por las bandas 22, 29 y 32 los caracterizan.

CP2.

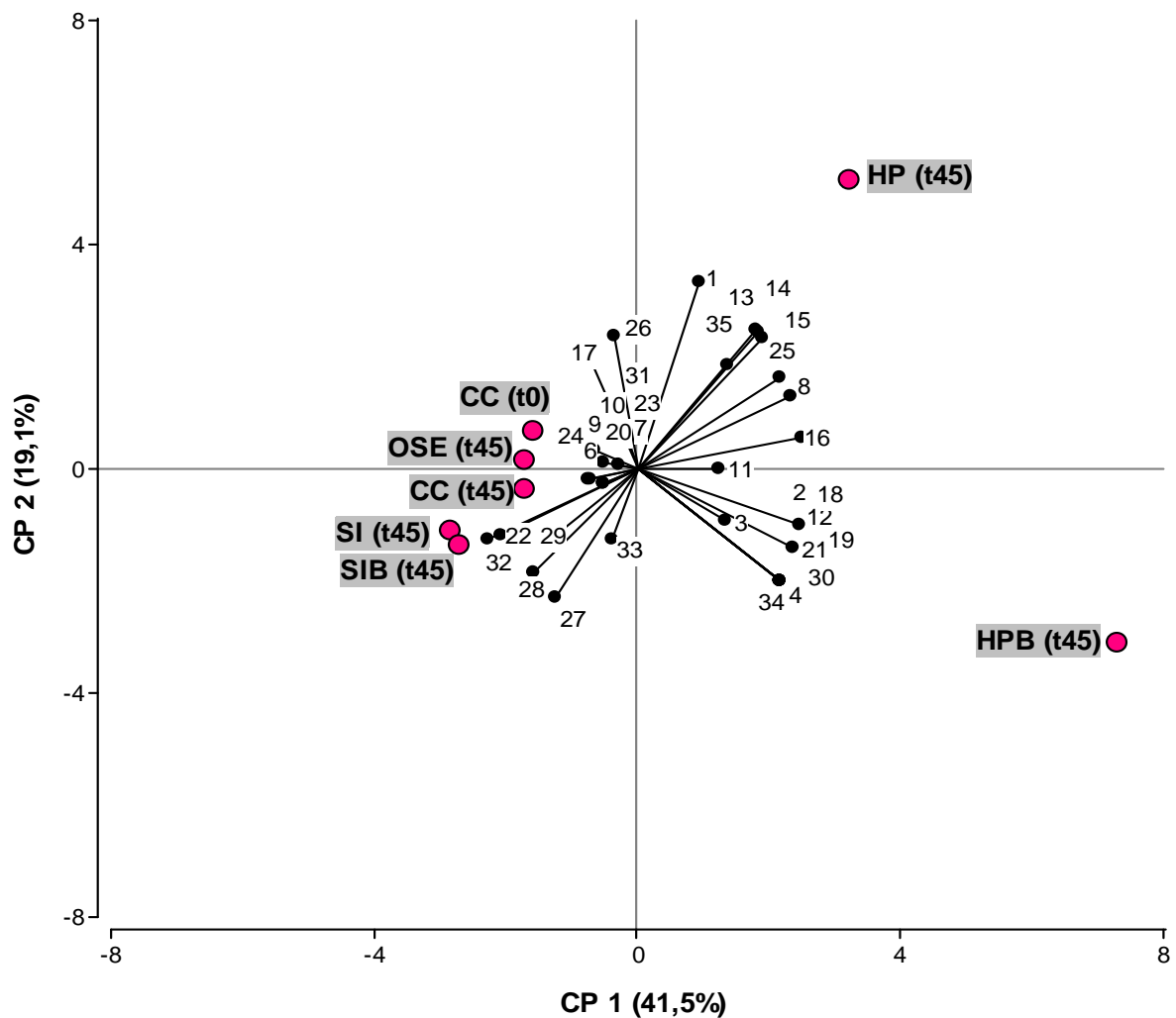


Figura IV.9. Análisis de componentes principales (ACP) de los microcosmos en parcelas. Se observa la distribución de los microcosmos y de las bandas de DGGE, que se muestran por sus respectivos números.

IV.C. Ensayos de bioestimulación utilizando Biopilas como diseño experimental

IV.C.1. Ensayo I

Como se mencionó en la Introducción, una de las tecnologías de biorremediación *ex situ* reportadas como eficientes en el saneamiento de suelos contaminados son las biopilas.

Dado que existen antecedentes de la utilización de biopilas en ambientes fríos para biorremediar suelos contaminados (Jørgensen y col, 2000; Delille y col, 2008; Sanscartier y col,

2009), el objetivo de este ensayo fue analizar *on site* bajo las estrictas condiciones climáticas antárticas, el efecto de la aplicación de distintas fuentes de nutrientes, combinadas con un surfactante, sobre la eficiencia de remoción de hidrocarburos en un suelo antártico crónicamente contaminado con gas oil, utilizando como diseño experimental biopilas de tipo estáticas a escala piloto.

En este ensayo, todos los nutrientes se combinaron con un surfactante debido a que, según bibliografía (Das y col., 2008; Franzetti y col., 2008) y a resultados propios (Ruberto y col., 2006), el mismo resultó efectivo para aumentar la eficiencia de remoción de hidrocarburos en suelos contaminados. En el estudio descrito en la sección anterior, en el cual se utilizaron parcelas como sistema experimental (sección IV.A.), no se observaron diferencias significativas en la eficiencia de degradación por el agregado de sales inorgánicas (SI). Ante la posibilidad de la existencia de un lavado excesivo de los nutrientes agregados en forma de solución salina al suelo (a causa de las crecientes lluvias y el derretimiento de nieve) se utilizó un fertilizante de tipo NPK, el cual había sido utilizado previamente en numerosos estudios de biorremediación y presenta una liberación más lenta de los macronutrientes nitrógeno, fósforo y potasio a lo largo del tiempo (Rosa y Triguís, 2007; Chorom y col., 2010). Para superar el efecto del lavado, las biopilas fertilizadas con sales inorgánicas al inicio del estudio se re-fertilizaron con 25 % de SI a los 10 días y los 30 días de tratamiento. El presente ensayo se realizó durante el verano antártico y luego fue mantenido en el terreno para finalmente ser muestreado nuevamente al año.

Se plantearon los siguientes microcosmos: CC (control no tratado), CCB (control con el agregado de Brij700[®]), SIB (bioestimulado con sales inorgánicas y con Brij700[®]), HPB (bioestimulado con harina de pescado y con Brij700[®]) y NPKB (bioestimulado con el fertilizante agronómico NPK y con Brij700[®]).

IV.C.1.1. Actividad microbiana deshidrogenasa

A fin de estudiar un indicador general de la actividad metabólica presente en el suelo bajo estudio y evaluar el impacto que la biorremediación del contaminante se determinó la actividad de la enzima deshidrogenasa (Xu y Lu, 2010).

En la Figura IV.10 se muestra la evolución de la actividad deshidrogenasa de las comunidades microbianas de las diferentes biopilas durante el experimento. Se puede observar que el sistema

HPB aumentó en forma significativa la actividad, mostrando un máximo a los 30 días de iniciado el experimento, momento en el cual los valores superaron en más de 10 veces los valores iniciales. El resto de los microcosmos no aumentó su actividad deshidrogenasa, manteniéndose invariable a lo largo del ensayo. Los refuerzos en la concentración de nutrientes realizados a los 10 y 30 días en el sistema SIB no causaron cambios estadísticamente significativos en la actividad deshidrogenasa respecto al resto de los microcosmos.

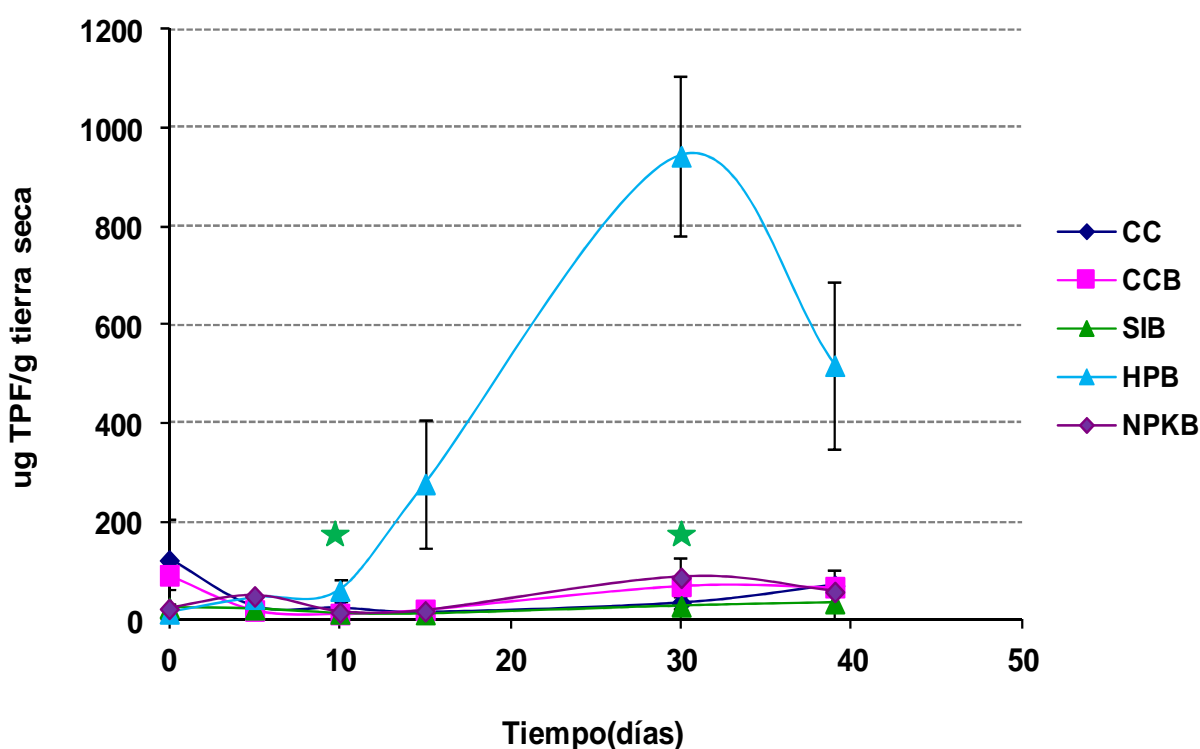


Figura IV.10. Evolución de la actividad deshidrogenasa (μg de TPF/g de tierra seca) para cada biopila durante el proceso de biorremediación. Los refuerzos del nutriente SI se señalan con estrellas verdes. Las barras representan la DS de triplicados.

IV.C.1.2. Evolución de las poblaciones cultivables, el pH y la temperatura

La Figura IV.11 muestra la evolución de las BH en los distintos microcosmos durante todo el ensayo. Se puede apreciar que el microcosmo HPB produjo un rápido incremento (10 días) de los recuentos de más de un orden de magnitud respecto al resto de los microcosmos ($p < 0,05$). Este

incremento se mantuvo hasta el final del ensayo. El resto de los microcosmos evidenciaron un aumento inicial de las BH sólo durante los primeros 5 días, para estabilizarse en valores de recuento similares al inicial hasta el final del ensayo. Los incrementos iniciales mostrados por el microcosmo CC fueron aún menores a los del resto de las biopilas. El análisis estadístico reveló diferencias significativas entre HPB y todos los demás microcosmos ($p < 0,05$) entre los días 10 y 30. Al final del ensayo, un leve descenso en los valores de BH de HP y un leve ascenso en el resto de los microcosmos determinó diferencias estadísticamente significativas de HPB sólo con CCB y NPKB ($p < 0,05$).

La evolución de los recuentos de BDH se pueden observar en la Figura IV.12. Al igual que lo observado en los valores de BH, el microcosmo HPB mostró un significativo incremento de los recuentos al día 10, de más de 3 órdenes de magnitud respecto al resto de los microcosmos ($p < 0,05$), para luego estabilizarse hasta el final del estudio. Ambos microcosmos control (CC y CCB) mostraron valores similares a lo largo de todo el ensayo luego de un leve incremento entre los días 1 y 5. Esto nos muestra que tampoco bajo estas condiciones experimentales la presencia del surfactante mejoró el potencial degradador de la microbiota del suelo, al menos estimada por las poblaciones cultivables BDH. Por otra parte, SIB y NPKB, evidenciaron un moderado incremento en los valores de BDH, el cual fue más acentuado a partir de los 10-15 días. Es posible que en ambos casos, la mayor permanencia de los nutrientes (ya sea por la estrategia de los refuerzos o por la lenta liberación mediada por el fertilizante agronómico), haya permitido este incremento que determinó que ambos microcosmos se diferenciaron significativamente de los microcosmos controles.

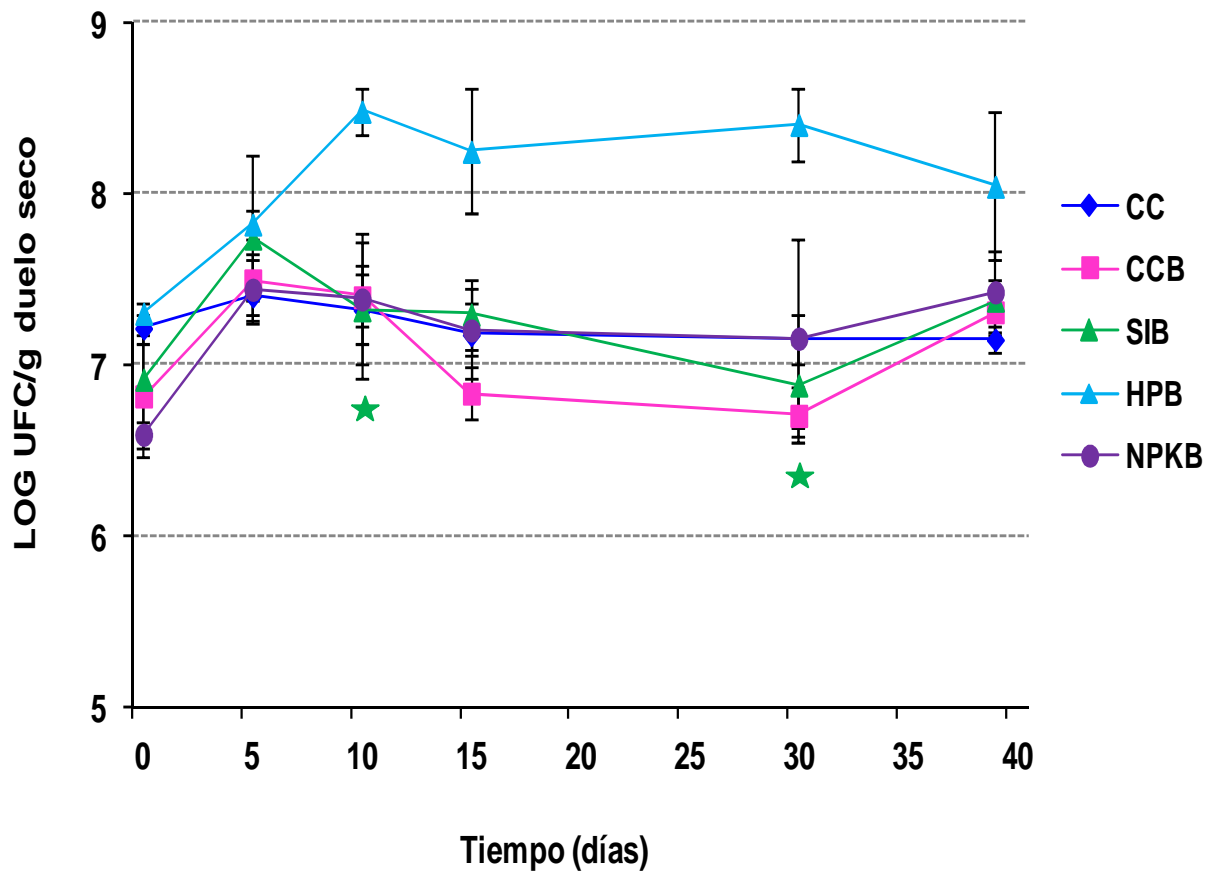


Figura IV.11. Evolución de las BH en las diferentes biopilas con suelo antártico crónicamente contaminado. Las estrellas verdes señalan los refuerzos de nutriente en el microcosmo SIB. Las barras representan la DS de triplicados.

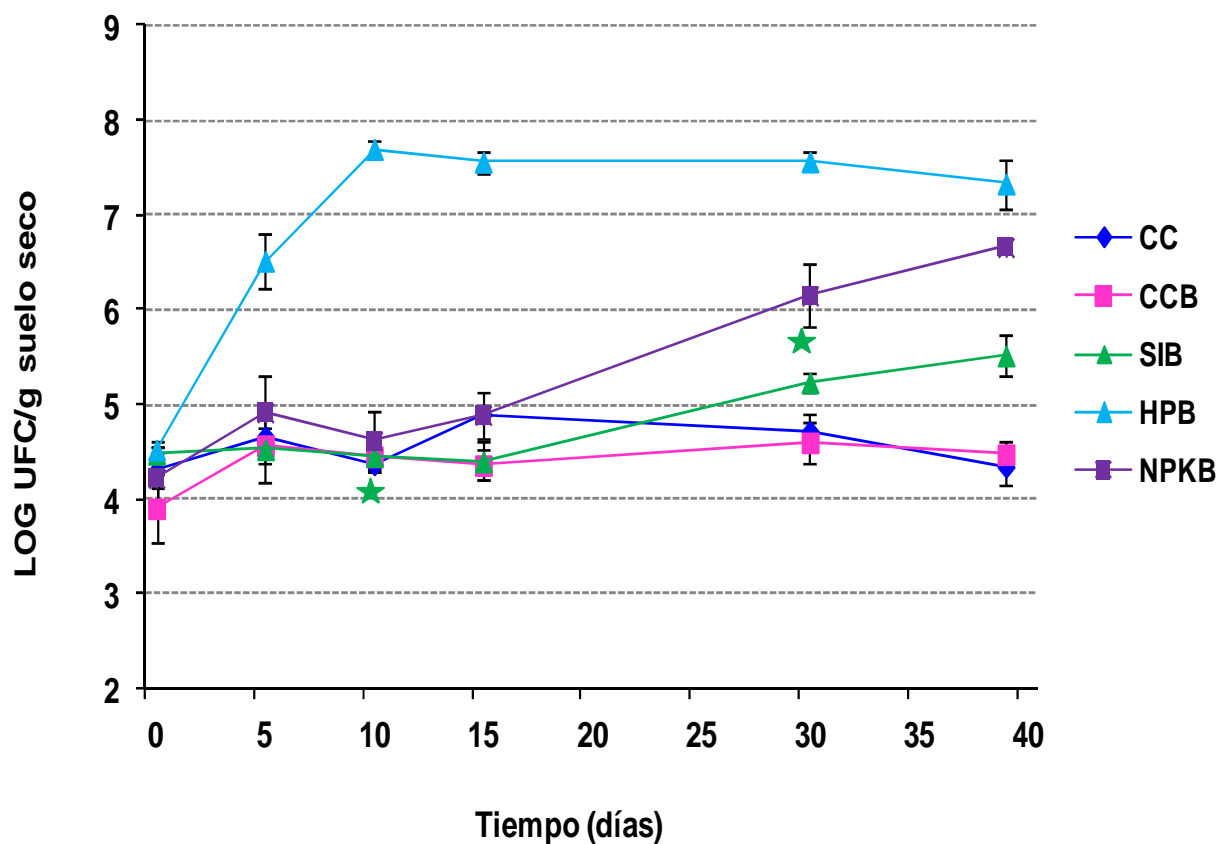


Figura IV.12. Evolución de las BDH en las diferentes biopilas con suelo antártico crónicamente contaminado. Las estrellas verdes señalan los refuerzos de nutriente en el microcosmo SIB. Las barras representan la DS de triplicados.

En relación a los valores de pH del suelo en los diferentes microcosmos (Figura IV.13) se observaron valores cercanos a la neutralidad, con oscilaciones entre valores de 6,0 y 6,5, con una leve tendencia a incrementarse al final del ensayo. No hubo diferencias significativas entre microcosmos durante el tratamiento.

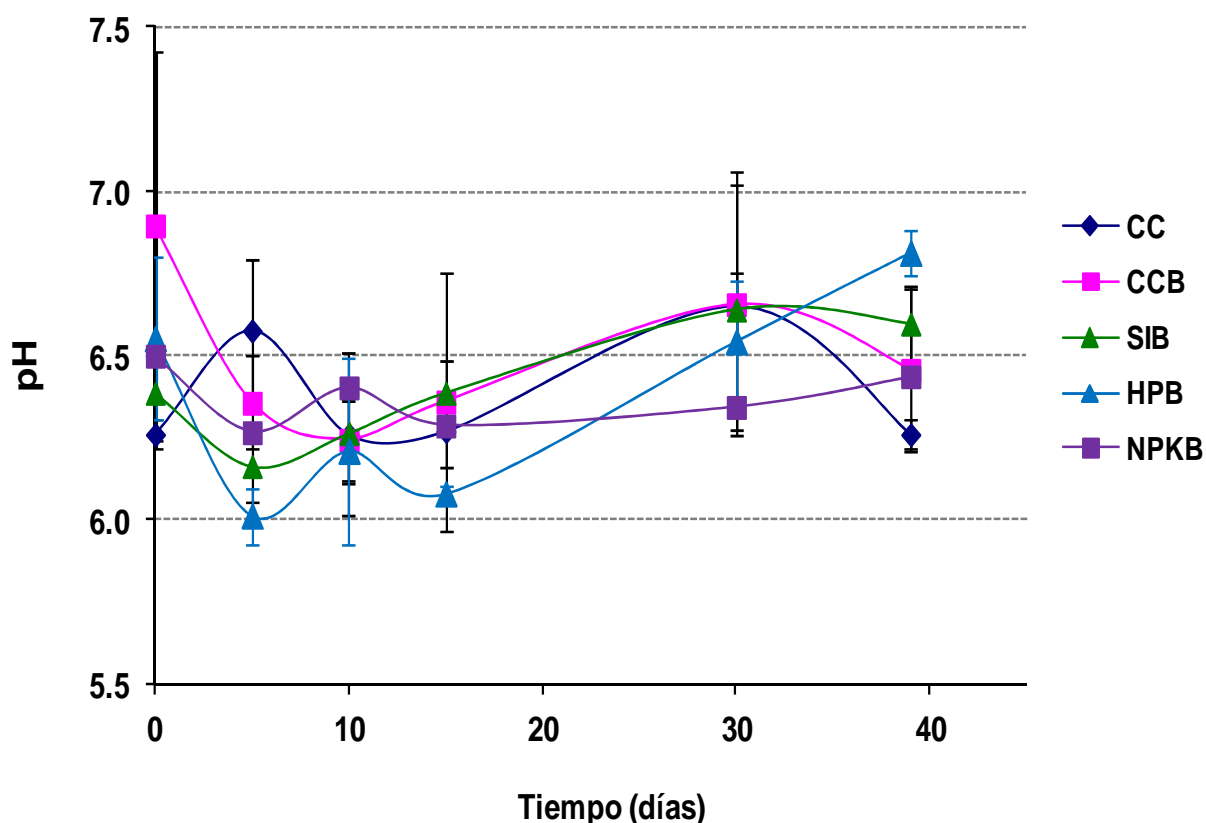


Figura IV.13. Evolución del pH del suelo durante los 39 días de ensayo para cada microcosmo analizado. Las barras representan la DS de triplicados.

En la Figura IV.14, se puede observar la evolución de los valores matinales (9 hs) y nocturnos (21 hs) de temperatura del aire registrados durante el ensayo. Se observó una similitud en el valor medio de temperatura durante el periodo de este ensayo con el registrado durante el periodo de ensayo en parcelas (2,6 °C), aunque los valores extremos fueron “más calidos” durante el ensayo de biopilas. Se obtuvo un promedio de 2,5 °C, un valor máximo absoluto de 6,05 °C y un valor mínimo absoluto de 0,47 °C. La amplitud térmica fue de 5,58 °C durante el ensayo y el rango de velocidad del viento fue de 0,3-62 km/h.

Finalmente, el promedio de temperaturas del suelo de las biopilas durante la mañana (9 hs) y la noche (21 hs) se muestra en la Figura IV.15. Se obtuvo un promedio de temperatura del 3,9 °C dentro de las biopilas con un máximo absoluto de 10,8 °C, un mínimo absoluto de -0,5 °C por la noche y una humedad relativa promedio del 16 %.

Un detalle interesante, que debe considerarse al momento de la elección del diseño de los sistemas de biorremediación, es la menor amplitud térmica registrada en el interior de las biopilas en comparación con los valores registrados en el seno del suelo de las parcelas. Si bien los microcosmos no se realizaron en el mismo periodo de tiempo y deberán realizarse nuevos ensayos a fin de confirmar esta aseveración, es posible que la menor relación superficie/volumen del sistema biopila presente una mayor inercia térmica, siendo menos influenciado, en su interior, por los máximos y los mínimos registrados en el aire exterior. El pequeño espesor del suelo dispuesto en las parcelas, mostró ser más sensible a dichas oscilaciones térmicas.

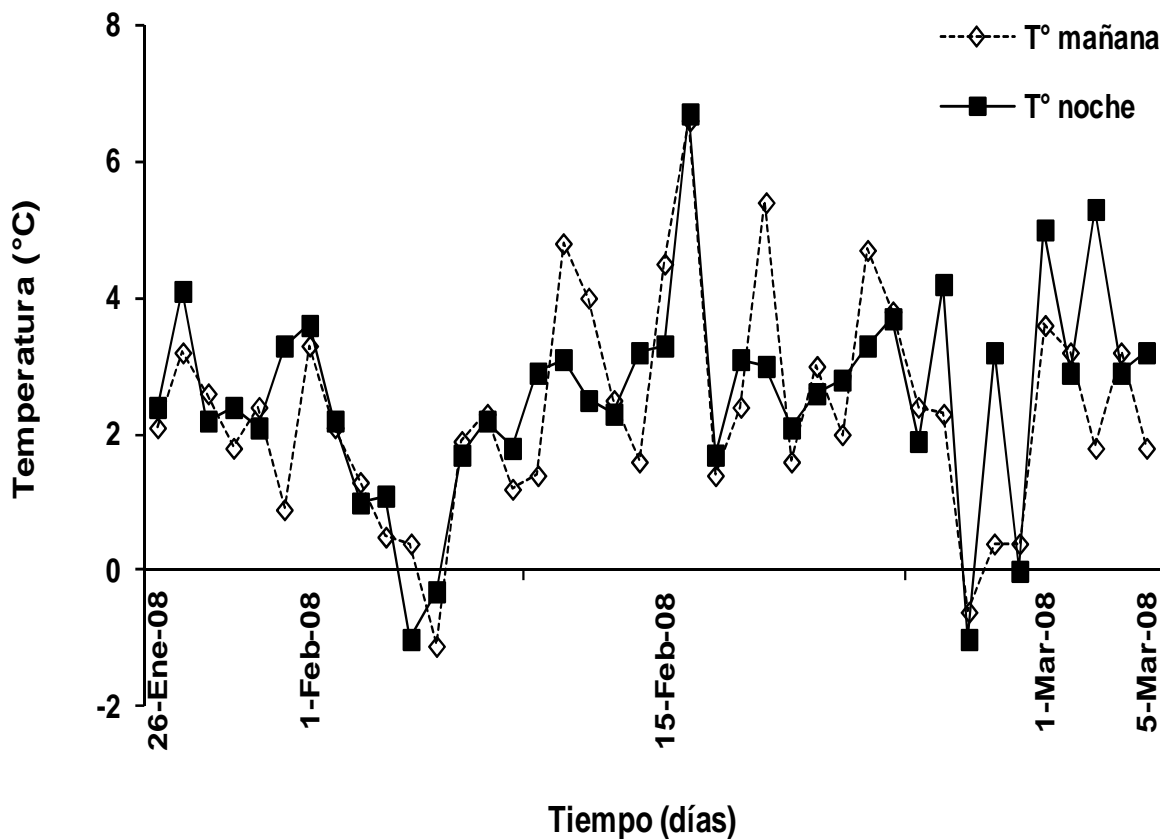


Figura IV.14. Evolución de la temperatura ambiental durante los 39 días de ensayo. La curva azul representa la temperatura registrada a la mañana y la curva roja a la noche.

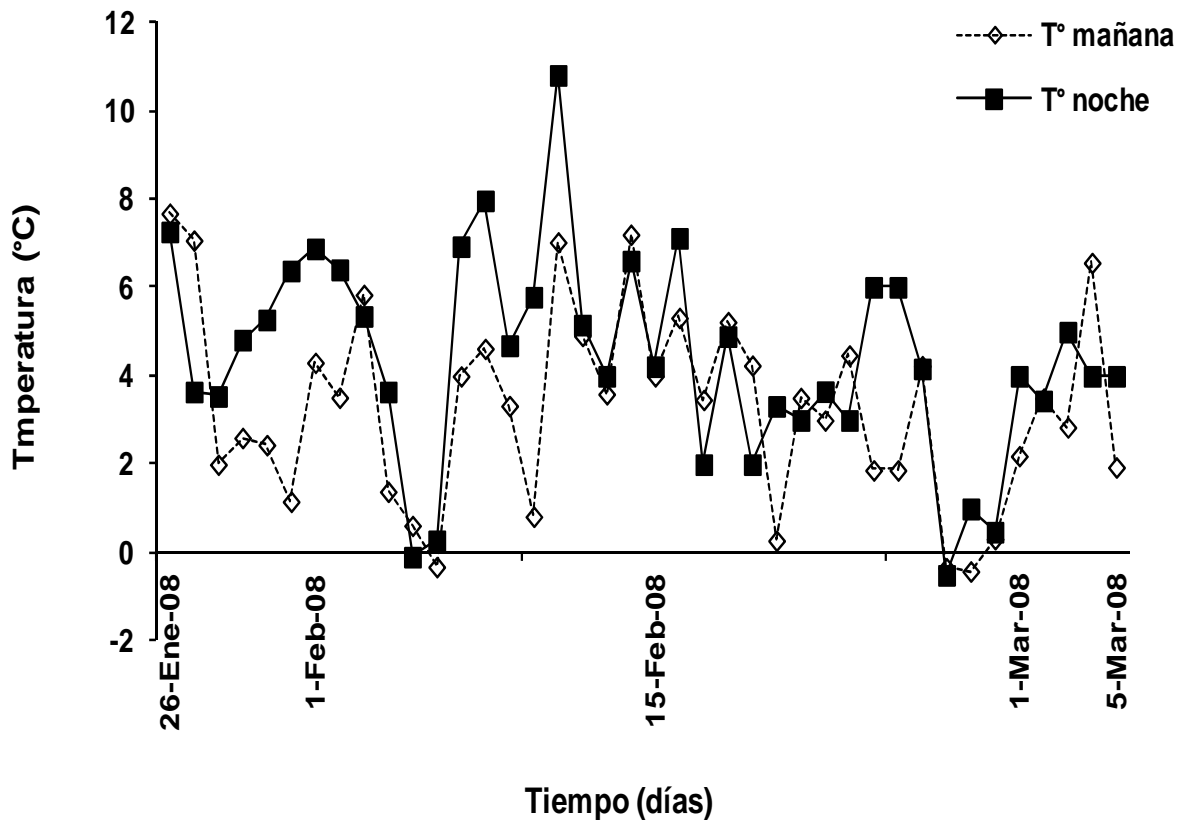


Figura IV.15. Evolución de la temperatura en los microcosmos. La curva verde representa la temperatura registrada a la mañana y la curva roja a la noche.

IV.C.1.3. Eliminación de hidrocarburos totales del suelo

En la Figura IV.16 se muestra la concentración de hidrocarburos totales (HT) en el suelo de las biopilas al tiempo inicial (t_0) así como los valores finales (t_{45}) de todos los microcosmos. También se determinaron las concentraciones al año de iniciado el estudio (t_{365}) las cuales no se muestran en la Figura IV.15.

El sistema control (CC) exhibió a tiempo final un porcentaje de eliminación del 19,3 %. Este porcentaje resultó mucho menor a lo observado en el sistema control del ensayo de parcelas (42 %) el cual se realizó utilizando el mismo suelo. Todas las biopilas bioestimuladas (SIB, HPB y NPKB) mostraron un descenso significativo en los valores de HT con respecto al CC a tiempo final ($p < 0,05$). Los porcentajes obtenidos oscilaron entre el 11,8, 16,8 % y 16 %,

respectivamente. El agregado de Brij700[®] no mostró diferencias significativas en comparación al control.

Finalmente, los valores de HT medidos a los 365 días de iniciado el ensayo no evidenciaron una significativa mejora en la remoción de los contaminantes (resultados no mostrados).

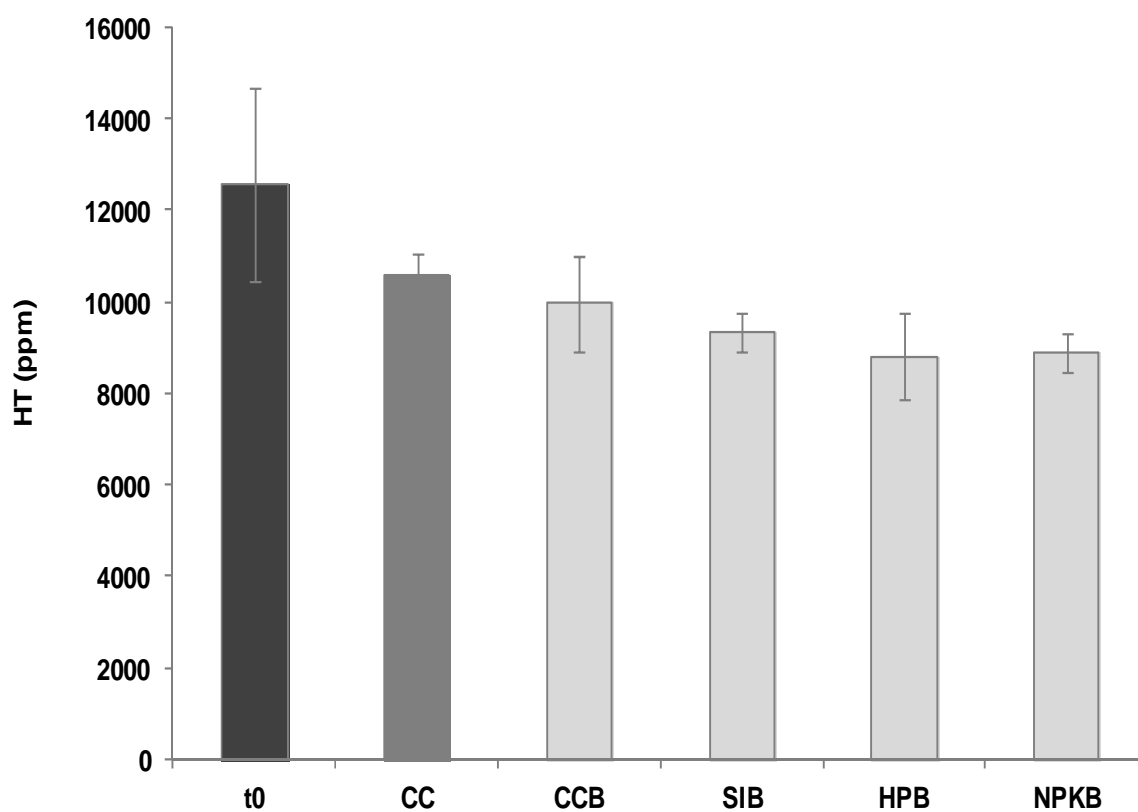


Figura IV.16. Hidrocarburos totales (ppm) a tiempo inicial (t0, barra roja) y 39 días (barras verdes) para cada uno de los microcosmos. Las barras representan la DS de la media (triplicados)

IV.C.1.4. Dinámica de las comunidades bacterianas

IV.C.1.4.a. Análisis de la estructura de la comunidad por DGGE

Los geles de DGGE obtenidos a partir del análisis de los diferentes microcosmos y los diferentes tiempos de muestreo, incluyendo el t365 (a un año del inicio del estudio) se ilustran en las Figuras IV.17 a, b y c. Se utilizó la muestra HPB39 como patrón de corrida.

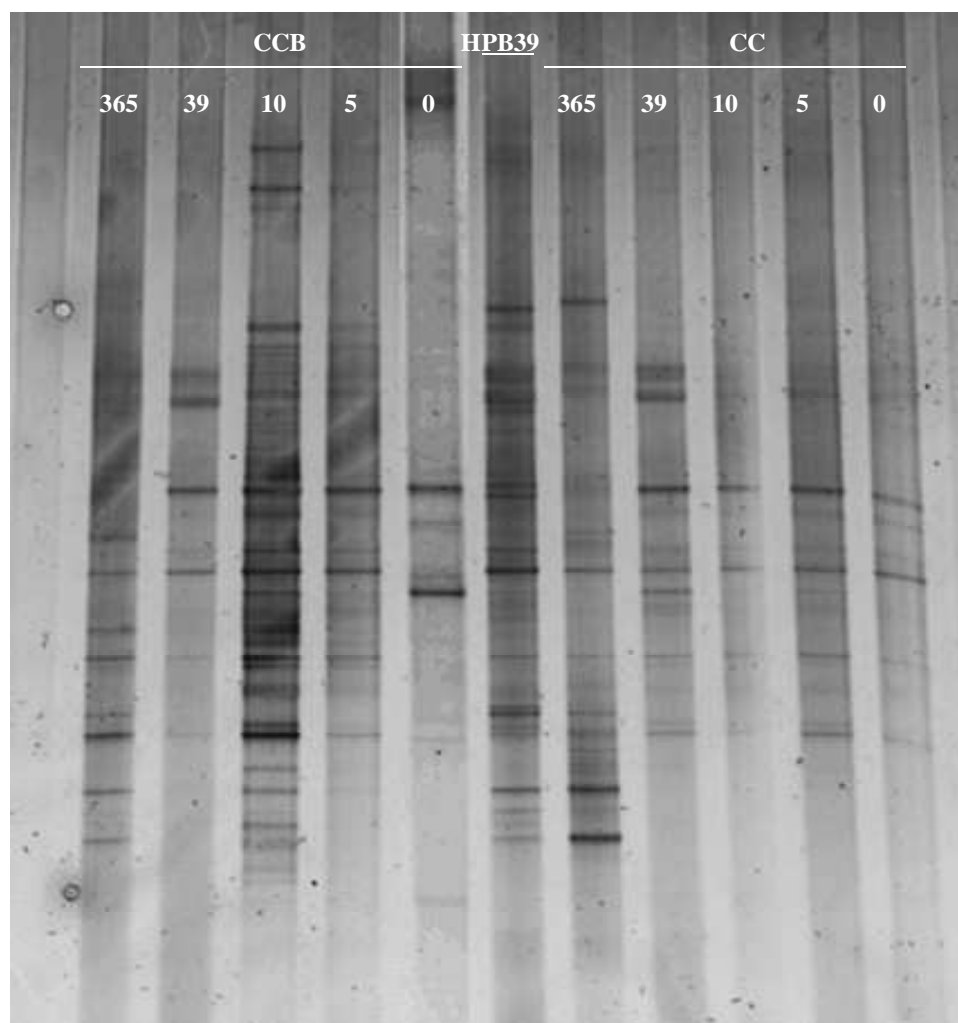


Figura IV.17.a. Gel de DGGE (urea-formamida del 35-65%) correspondiente a los microcosmos CC y CCB al inicio y a los 5, 10, 39 y 365 días de estudio.

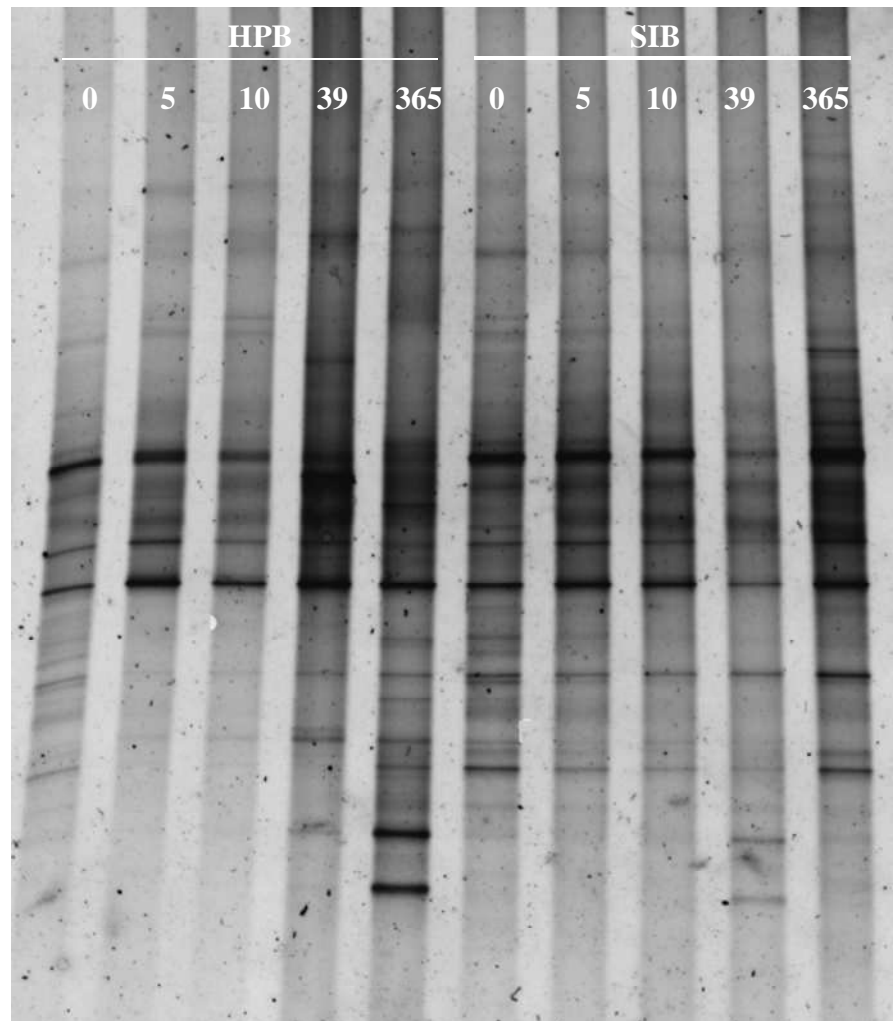


Figura IV.17.b. Gel de DGGE (urea-formamida del 35-65%) correspondiente a los microcosmos HPB y SIB al inicio y a los 5, 10, 39 y 365 días de estudio.

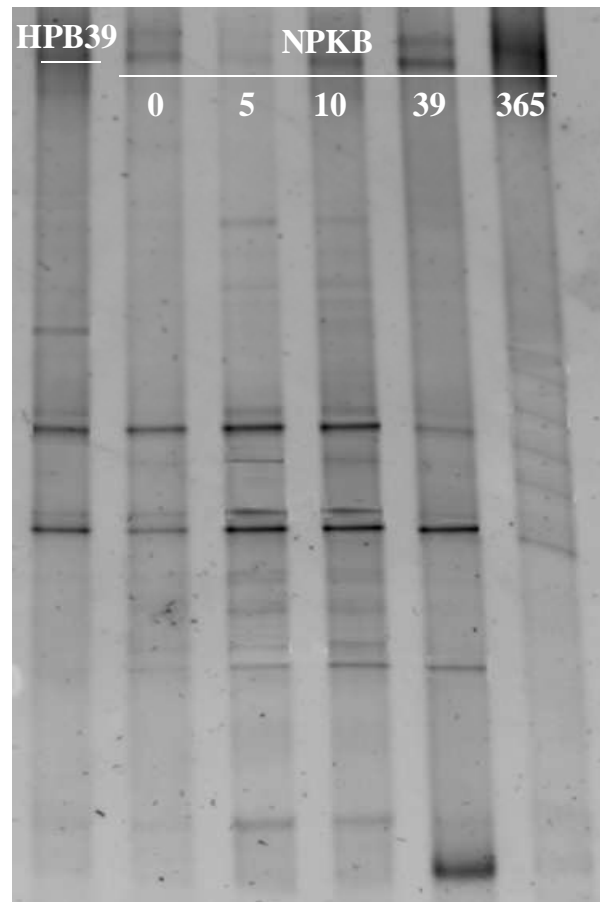


Figura IV.17.c. Gel de DGGE (urea-formamida del 35-65%) correspondiente al sistema NPKB al inicio y a los 5, 10, 39 y 365 días de estudio.

A partir de los geles de DGGE obtenidos se construyó una única imagen (Figura IV.18.a) a partir de la cual se obtuvo el dendrograma mostrado en la Figura IV.18.b.

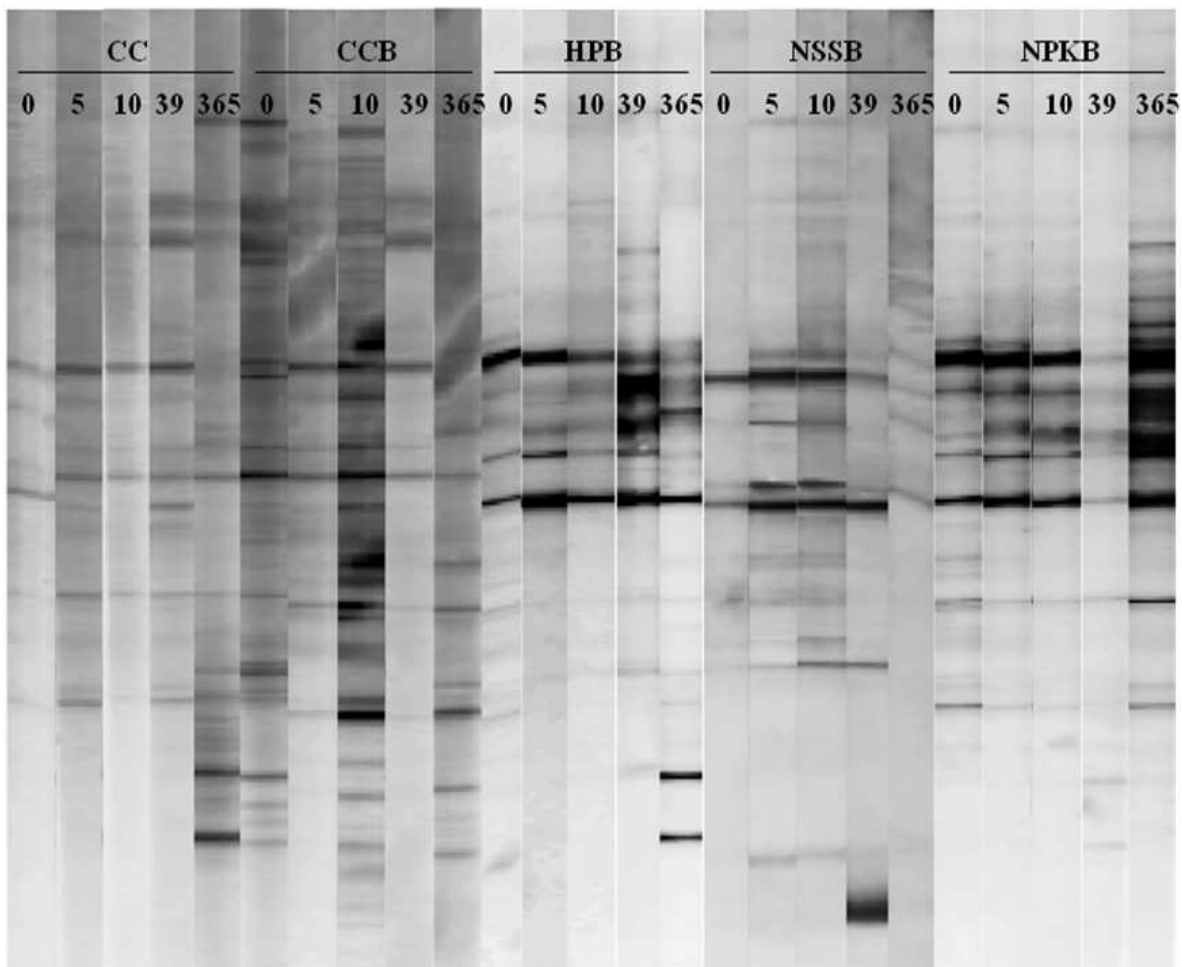


Figura IV.18. a. Imagen construida con todos los geles de DGGE (normalizada por el programa GelComparII) obtenidos para los diferentes microcosmos al inicio y a los 5, 10, 39 y 365 días de estudio.

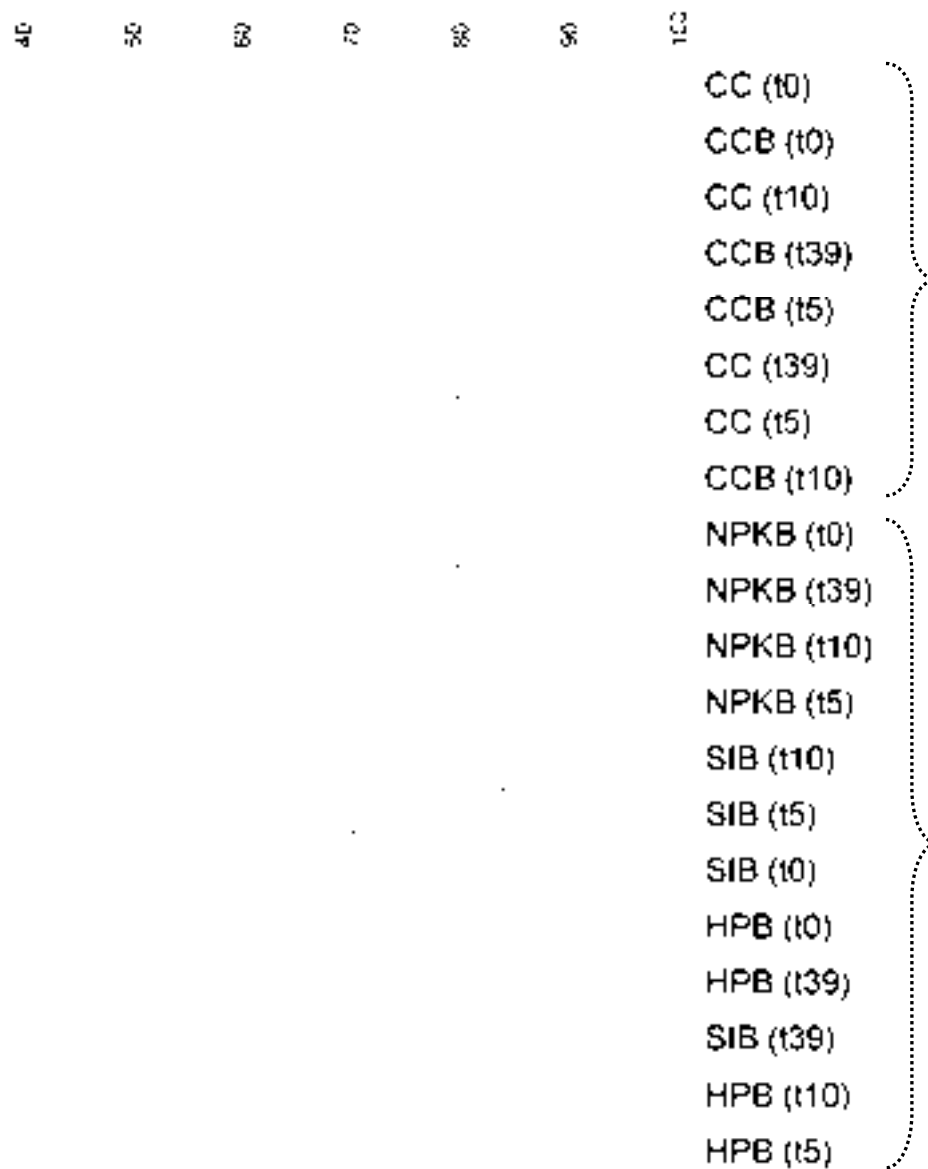


Figura IV.18.b. Dendrograma construido a partir de los datos de todos los microcosmos a los diferentes tiempos de muestreo: 0, 5, 10 y 39 días. Las llaves punteadas muestran los clusters más representativos.

Se pueden observar claramente dos clusters (señalados con llaves de línea punteada): uno formado por las muestras provenientes de los microcosmos control, independientemente de la presencia o no del surfactante (CC y CCB) y otro formado por los microcosmos bioestimulados. Del análisis del dendrograma puede mencionarse que:

- Las comunidades bacterianas de CC y CCB a tiempo inicial no mostraron diferencias relevantes. No obstante, luego de los 5-10 días de iniciado el ensayo, tanto el sistema tratado con el surfactante Brij700[®] como el que no recibió tratamiento alguno mostraron comunidades con un alto % de similitud (68 %), ubicando a los microcosmos CC y CCB en el mismo cluster. Cabe señalar que CCB a t10 se ubicó en un sub-cluster distinto, lo que sugiere que la comunidad estimulada en este tiempo de muestreo se diferenció de las del resto de los tiempos.

- El agregado de nutrientes produjo cambios considerables en las comunidades bacterianas presentes en el suelo en estudio. Tanto el agregado de sales como de harina de pescado determinaron cambios similares en las comunidades, por lo que SIB y HPB se agruparon en un mismo sub-cluster. El fertilizante NPK seleccionó comunidades bacterianas lo suficientemente distintas como para formar un sub-cluster separado del resto de los microcosmos.

En la Figura IV.19 se muestra el dendrograma construido solamente con los datos del inicio y final del ensayo de verano (t0 y t39) y los obtenidos al año (t365). Se puede observar que aún al año de iniciado el ensayo se mantienen las diferencias entre las estructuras de las comunidades de los microcosmos control (CC y CCB) y de todos los microcosmos bioestimulados. También se mantiene la relativa similitud entre las comunidades seleccionadas en los microcosmos HPB y SIB. Finalmente, si bien se observa la separación de las comunidades del microcosmo NPKB a 0 y 39 días, la comunidad a los 365 días es más parecida a las presentes en el subcluster SIB-HPB lo que estaría sugiriendo una tendencia de las comunidades de los microcosmos estimulados con nutrientes a estabilizarse en una estructura similar luego de un año.

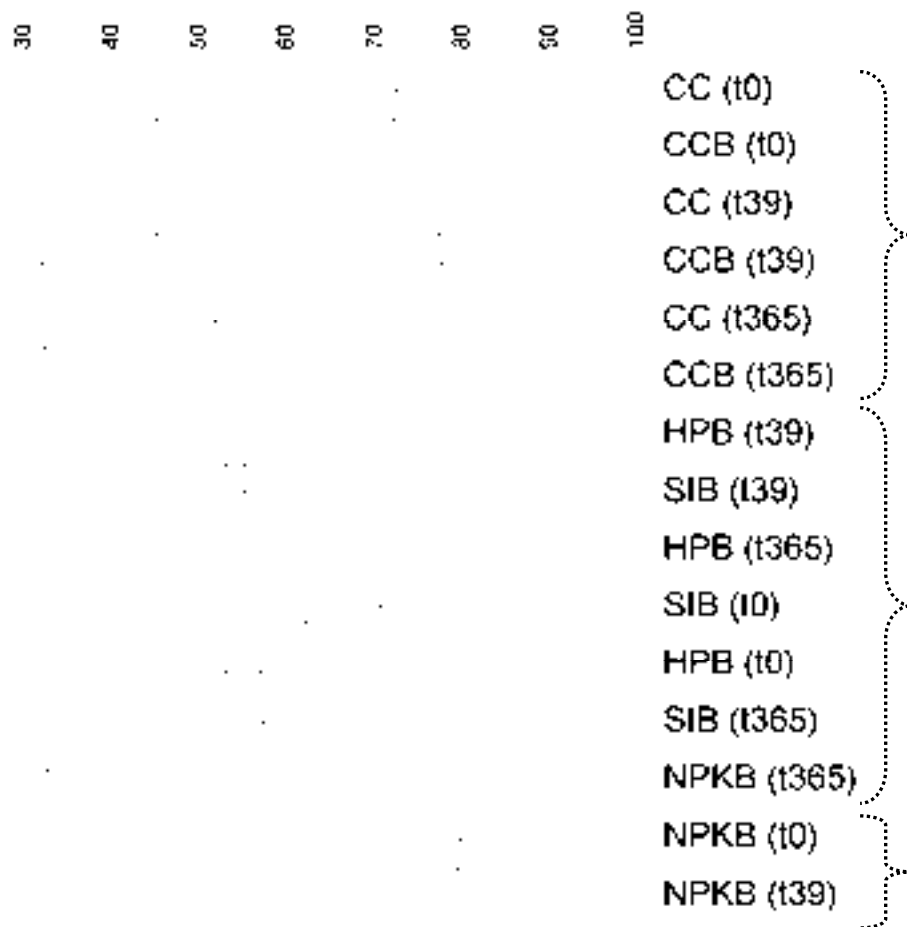


Figura IV.19. Dendrograma construido a partir de los datos de todos los microcosmos a los tiempos de muestreo: 0, 39 y 365 días. Las llaves punteadas muestran los clusters más representativos.

IV.C.1.4.b. Estimación de la biodiversidad bacteriana

La Tabla IV.2 muestra los valores de riqueza y los índices de dominancia y diversidad para cada uno de los microcosmos a tiempo inicial y final (día 39) del ensayo de verano y también incluye los valores encontrados al año de estudio (día 365).

Se puede observar que durante el verano, el sistema control CC mostró una tendencia al aumento de la diversidad, acompañada principalmente por un incremento en la riqueza y una disminución de la dominancia, hacia el final del ensayo. El sistema CCB mostró un

comportamiento similar, aunque el incremento en la diversidad fue menor, debido principalmente a un menor incremento en la riqueza.

Respecto a los microcosmos bioestimulados, HPB, SIB y NPKB, todos mostraron una leve tendencia a disminuir la diversidad al final del estudio, aunque mientras HPB y NPKB lo hicieron principalmente a expensas de un incremento en la dominancia (lo que estaría sugiriendo que estos tratamientos estimularon el crecimiento de algunos grupos bacterianos inicialmente presentes en proporciones menores), el sistema SIB lo hizo principalmente a expensas de una disminución en la riqueza. El análisis de estos índices en los microcosmos CC y CCB no evidenció un efecto diferencial de la presencia del surfactante.

El análisis de los índices al año de estudio (t365), mostró que todos los microcosmos evidenciaron un incremento en los índices de diversidad en comparación con los valores calculados al final del verano (t39). Mientras que el mencionado incremento fue pequeño para los microcosmos CC, CCB y SIB, fue mayor para los microcosmos HPB y NPKB.

Tabla 4. Valores de riqueza y de los índices de dominancia y diversidad bacteriana en las biopilas a tiempo inicial (t0), tiempo final de verano (t39) y al año de ensayo (t365).

Microcosmo	Riqueza (S)	Dominancia (D)	Diversidad (H)
CC (t0)	6	0.231	1.587
CC (t39)	11	0.121	2.235
CC (365)	15	0.098	2.489
CCB(t0)	5	0.256	1.444
CCB (t39)	7	0.211	1.704
CCB (365)	8	0.174	1.919
HPB (t0)	10	0.248	1.726
HPB (t39)	9	0.300	1.497
HPB (365)	15	0.119	2.337
SIB (t0)	16	0.155	2.303
SIB (t39)	9	0.141	2.051
SIB (365)	15	0.138	2.298
NPKB (t0)	5	0.280	1.412
NPKB (t39)	5	0.382	1.21
NPKB (365)	6	0.182	1.749

IV.C.1.4.c. Análisis filogenético

A partir del gel de DGGE mostrado en la Figura IV.18.a se construyó una nueva imagen (Figura IV.20) que muestra las bandas presentes en los diferentes microcosmos. Aquellas señaladas con números indican las bandas que fueron clonadas y secuenciadas según la metodología descrita en el capítulo Materiales y Métodos. Para el análisis de la dinámica de las poblaciones (bandas) en las diferentes comunidades (calles) se consideró que, bandas ubicadas en igual posición en el gel de DGGE (pertenecientes a un mismo microcosmo) pertenecen a la misma OTU (Unidad Taxonómica operacional) o filotipo.

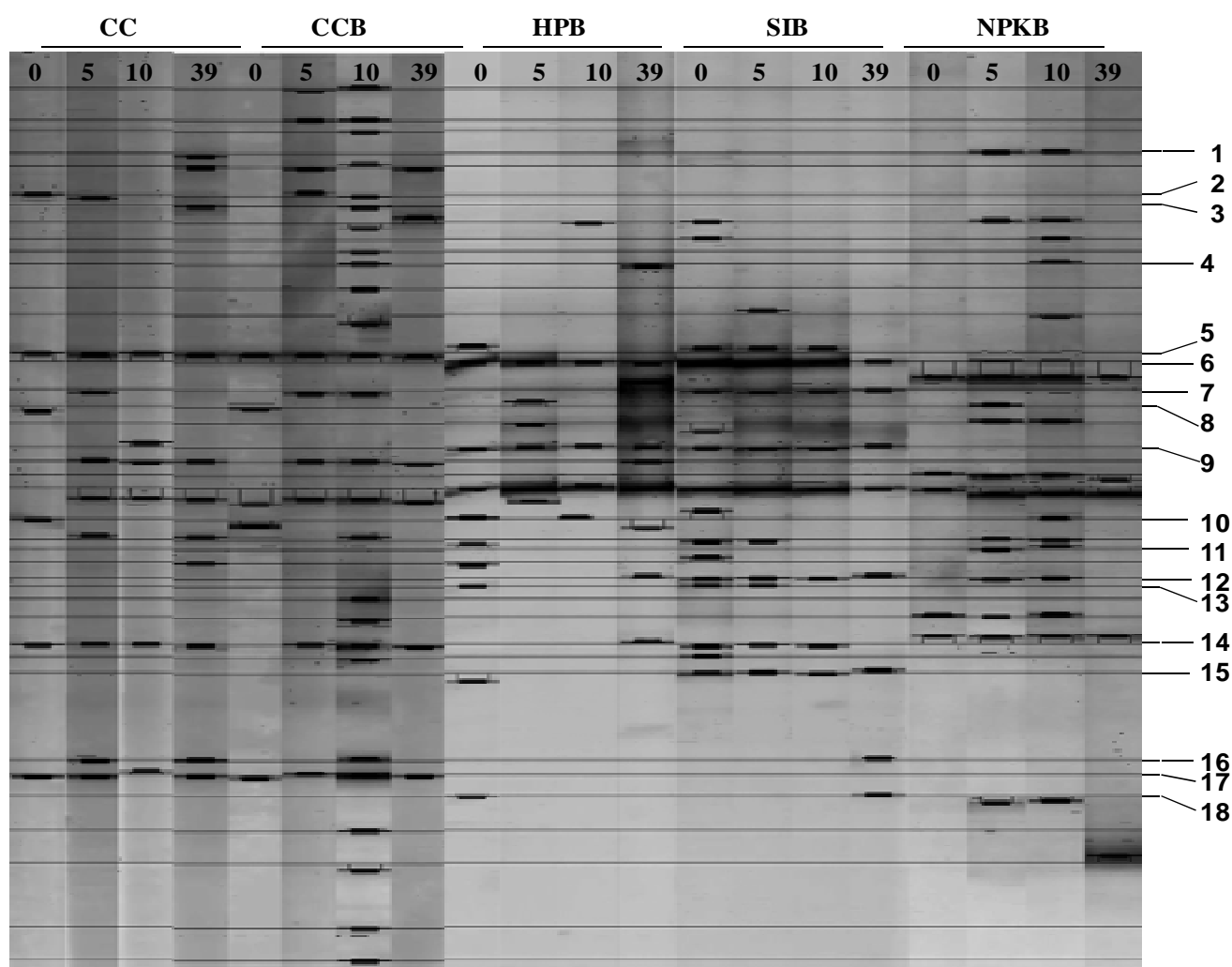


Figura IV.20. Imagen construida con todos los gels de DGGE (normalizada por el programa GelComparII) obtenida para los diferentes microcosmos al inicio y a los 5, 10, y 39 días de estudio. Las líneas marcan la posición de todas las bandas. Con números se señalan las líneas de banda que contienen la banda secuenciada.

En la Tabla IV.3 se puede observar, para cada banda secuenciada, la afiliación y el origen de la secuencia relacionada con mayor porcentaje de similitud. También se indican los microcosmos en donde se detectó la banda y el grupo taxonómico al que pudo relacionársela.

Tabla IV.3. Afiliación taxonómica, secuencia más relacionada junto a su código de acceso al Gen Bank, % de similitud y sitio de aislamiento de todas las bandas clonadas y secuenciadas detectadas en el gel de DGGE de las biopilas. Se muestra también el microcosmo donde fue detectada la banda, aquí: en negrita se indica el tiempo de muestreo en que se obtuvo la banda secuenciada y entre paréntesis se indica el tiempo de muestreo donde se infirió la afiliación taxonómica de la banda observada, por comigración con la banda secuenciada en el mismo microcosmo.

Banda	Detección de la banda	Secuencia relacionada (N° de acceso)	% similitud	Origen de aislamiento	Afiliación Taxonómica
1	CC t39 NPKB (t5 y 10)	Bacteroidetes bacterium CH6i (FJ164054.1)	99	agua subterránea (Cabo Hallet, Antártida)	Flavobacteriaceae, Chryseobacterium
2	CC t0 y (t5); CCB (t5 y 10)	Cellulomonas sp. KAR88 (EF034582.1)	99	Permafrost (Ártico)	Cellulomonadaceae, Cellulomonas sp.
3	CC t39 CCB (t10)	Uncultured Actinobacteria bacterium clone (AJ229243.1)	99	suelo de granja	Propionibacteriaceae
4	CCB (t10) HPB t39 y NPKB (t10)	Brevundimonas sp. 44/11 (AY571823.1)	99	suelo contaminado con hidrocarburos (Antártida)	Caulobacteraceae, Brevundimonas sp.
5	HPB t0 ; SIB (t0, 5 y 10)	uncultured Sphingomonadaceae bacterium (HM205112.1)	99	lodos activos	Sphingomonadaceae
6	HPB0 t39 Y en todos	Sandarakinorhabdus sp. JC2488 (EU642848.1)	99	–	Sphingomonadaceae, Sandarakinorhabdus sp.
7	CC (t5); CCB (t5 y 10); HPB t39 ; SIB (todos)	uncultured Rhodiferax sp. (GQ366604.1)	99	suelo del Glaciar Roopkund (Himalaya, India)	Comamonadaceae Rhodiferax sp.
8	CC t0 ; CCB (t0); HPB (t5) NPKB (t5)	Sphingomonadaceae bacterium VUG-A51b (GQ454850.1)	99	hielo del glaciar Victoria (Antártida)	Sphingomonadaceae
9	CC (t0), HPB t39 (todos) SIB (todos)	Janthinobacterium lividum (HQ003440.1)	100	lago Gurudongmar (India)	Oxalobacteriaceae, Janthinobacterium lividum
10	CC (t0); CCB (t0); HPB t0 y (t10 y 39) SIB (t0), NPKB (10)	Frigoribacterium sp. FS-YC6710 (EU734668.1)	99	lodo	Microbacteriaceae

Banda	Detección de la banda	Secuencia relacionada (N° de acceso)	% similitud	Origen de aislamiento	Grupo Taxonómico
11	HPB t0 NPKB (t5 y 10)	uncultured Williamsia sp. (EU375219.1)	94	arena contaminada con hidrocarburos (derrame barco Prestige, Antártida)	Nocardioideaceae, Williamsia sp.
12	HPB t39 ; SIB (todos), NPKB (t5 y 10)	Dokdonella sp. LM 2-5 (FJ455531.1)	97	biorreactor de tratamiento de trifenilmetano	Xanthomonadaceae, Dokdonella sp.
13	HPB t0 ; SIB (t0 y 5)	Dokdonella sp. CC-YHH031 (GQ281768.1)	98	suelo agrícola	Xanthomonadaceae, Dokdonella sp.
14	CC 39 y (todos) CCB (t5, 10 y 39) HPB (t39) SIB (t0, 5 y 10) NPK (todos)	Nocardioides sp. OS-23 (EF612318)	96	mina semiárida abandonada de plomo-zinc	Nocardioideaceae, Nocardioides sp.
15	HPB t0 ; SIB (todos)	Microbacterium sp. BZ43 (HQ588855.1)	100	suelo contaminado con hidrocarburos y metales pesados	Mycobacteriaceae, Microbacterium sp.
16	CC (t5) y t39 , CCB (t10) SIB (t39)	Cellulomonas sp. NP4 (EU196315)	99	zonas sulfídricas (Ártico)	Cellulomonadaceae, Cellulomonas sp.
17	CC t0 y (todos), CCB (todos)	Agromyces sp. IY07-34 (AB546309.1)	100	Suelo (zona subtropical de Japón)	Microbacteriaceae, Agromyces sp.
18	HPB t0 ; NPKB (t5 y 10)	Nocardioides terrae (FJ423762.1)	96	Suelo de bosque (zona montañosa)	Nocardioideaceae, Nocardioides

La mayoría de las bandas secuenciadas mostraron un alto porcentaje de similitud (94-100%) respecto de alguna secuencia disponible en las bases de datos Genbank. Como puede observarse, muchas de las secuencias relacionadas se aislaron de ambientes contaminados, tanto suelo como agua, y de zonas de clima frío.

Del análisis de las afiliaciones taxonómicas de las bandas secuenciadas puede resaltarse la presencia, en todos los microcosmos y en todos los tiempos, de miembros de la familia *Sphingomonadaceae*. Esto refleja la capacidad de los miembros de este género para tolerar y proliferar en ambientes con alto grado de contaminación por hidrocarburos así como la gran versatilidad y adaptación a los cambios ambientales. Otro punto a resaltar en el presente análisis es la gran proporción de miembros del Phylum Actinobacteria (50%) como las familias *Cellulomonadaceae*, *Propionibacteriaceae*; *Microbacteriaceae*, *Nocardioideaceae* y *Mycobacteriaceae*, Además debe mencionarse los siguientes puntos:

La familia *Flavobacteriaceae*, género *Chryseobacterium* sólo fue hallada en el microcosmo CC y en NPKB.

La familia *Xanthomonadaceae*, género *Dokdonella* fue hallada en los microcosmos bioestimulados y no así en los microcosmos control CC y CCB.

La familia *Caulobacteraceae*, género *Brevundimonas* sólo fue hallada en los microcosmos CCB, HPB al t39 y NPKB.

Las familias *Microbacteriaceae* y *Comandaceae* (*Rhodoferrax sp.*) fueron halladas en todos los microcosmos excepto aquellos con el nutriente NPKB.

La familia *Oxalobacteriaceae*, género *Janthinobacterium* fue hallada durante todo el ensayo en los microcosmos CC, HPB y SIB. La familia *Cellulomonadaceae*, género *Cellulomonas* se halló en los microcosmos CC, CCB y SIB y no así en HPB y NPKB.

Por último, la familia *Microbacteriaceae*, género *Agromyces* fue hallada sólo en los microcosmos control (CC y CCB) y no así en los microcosmos bioestimulados.

IV.C.2. Ensayo II

El objetivo de este ensayo fue centrar la atención en el efecto del agregado de los nutrientes harina de pescado y OSE II[®] sobre la eficiencia de degradación de hidrocarburos en un suelo contaminado utilizando nuevamente el diseño experimental biopilas. Cabe aclarar que, a diferencia del suelo utilizado en el ensayo anterior, el cual había experimentado un largo periodo de envejecimiento dentro de barriles metálicos, el suelo utilizado en este segundo estudio fue un suelo superficial que, si bien presentaba historia previa de contaminación, continuaba recibiendo hidrocarburos debido a la pérdida de una tubería que transportaba gas oil cercana a la usina de la base antártica Jubany.

Por otro lado, a diferencia del ensayo anterior, las biopilas fueron ubicadas debajo de una de las casas que conforman la base antártica. Esto no protegió a los microcosmos de las bajas temperaturas ni de los fuertes vientos, pero sí redujo los problemas de anegamiento de la tierra por las constantes precipitaciones que, como producto del cambio climático, azotan desde hace algunos años la región norte y centro de la península antártica. El ensayo se monitoreó durante el verano (enero-marzo) al igual que los ensayos de las secciones IV.B y IV.C y luego se ubicó en una habitación cerrada, aunque expuesta a las temperaturas ambientales del invierno antártico durante el resto del año a fin de realizar un análisis final. Se plantearon los siguientes

microcosmos: CC (control no tratado), HP (bioestimulado con harina de pescado) y OSE (bioestimulado con el fertilizante oleofílico OSEII®).

IV.C.2.1. Evolución de las poblaciones cultivables

La evolución de las BH durante el ensayo para cada biopila se muestra en la Figura IV.21. La harina de pescado (HP) produjo un incremento inicial en los valores de los recuentos que al día 5 resultó estadísticamente mayor al valor inicial ($p < 0,05$). A partir del día 5 los valores se mantuvieron aproximadamente constantes hasta el final del estudio (día 50). Si bien el sistema CC también mostró un incremento inicial en los valores, luego de ese momento mostró una tendencia a la disminución, registrándose los menores valores al final del ensayo. El sistema OSE, a diferencia de los otros dos microcosmos evaluados, mostró una disminución en los valores desde el inicio del ensayo alcanzando un valor similar a CC al final del ensayo.

La Figura IV.22 muestra la evolución de las BDH durante el ensayo para cada biopila. El sistema HP mostró un incremento inicial hasta el día 5, para luego disminuir al día 16 y mantenerse con variaciones menores hasta el final del ensayo (día 50). Si bien de menor magnitud, el incremento inicial representa un comportamiento similar al observado para los microcosmos HP en el sistema de biopilas descrito previamente y difiere del comportamiento observado en los sistemas de parcelas. Por su parte, el producto comercial OSE también mostró un importante incremento los primeros 16 días, para mantenerse aproximadamente constante hasta el día 30 y declinar al final del estudio. Este sistema mostró valores de relación BDH/BH iguales e incluso superiores a 1 durante el lapso de 15-30 días. Finalmente, el sistema CC se mantuvo en valores bajos y constantes durante todo el estudio luego de una significativa caída inicial. Al final del estudio de verano (día 50) los valores de BDH del sistema CC fueron significativamente menores que los del sistema OSE ($p < 0,01$) y los de este sistema, a su vez, fueron menores a los mostrados por el sistema HP ($p < 0,01$).

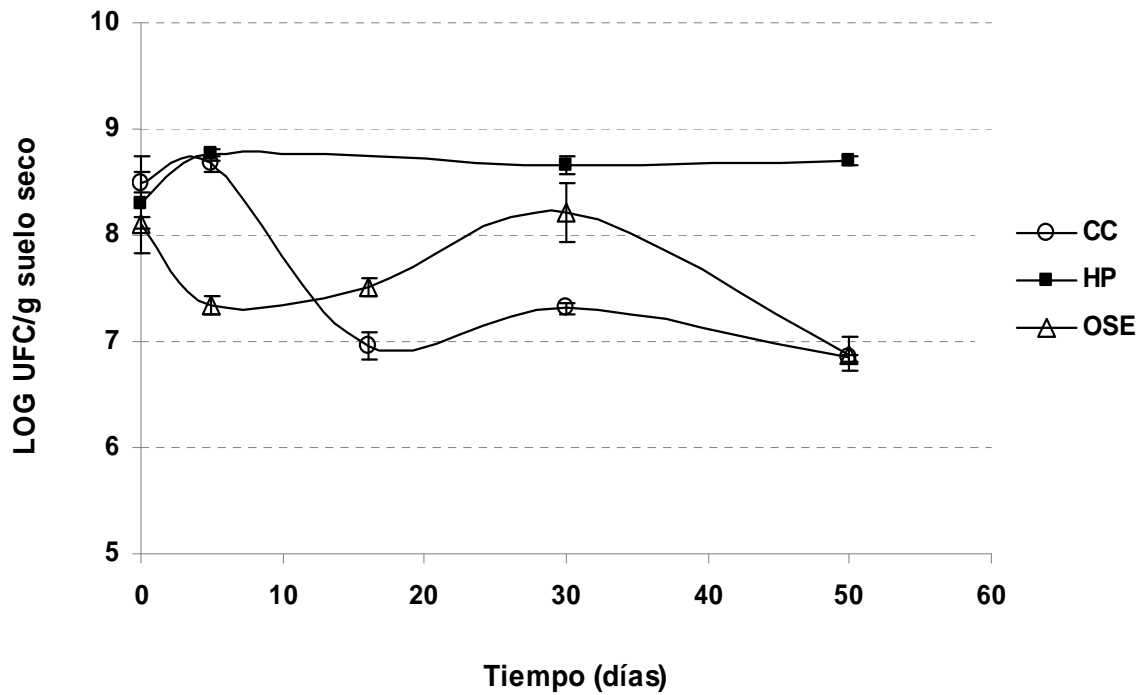


Figura IV.21. Evolución de las BH en las diferentes biopilas con suelo antártico crónicamente contaminado. Las barras representan la DS de triplicados.

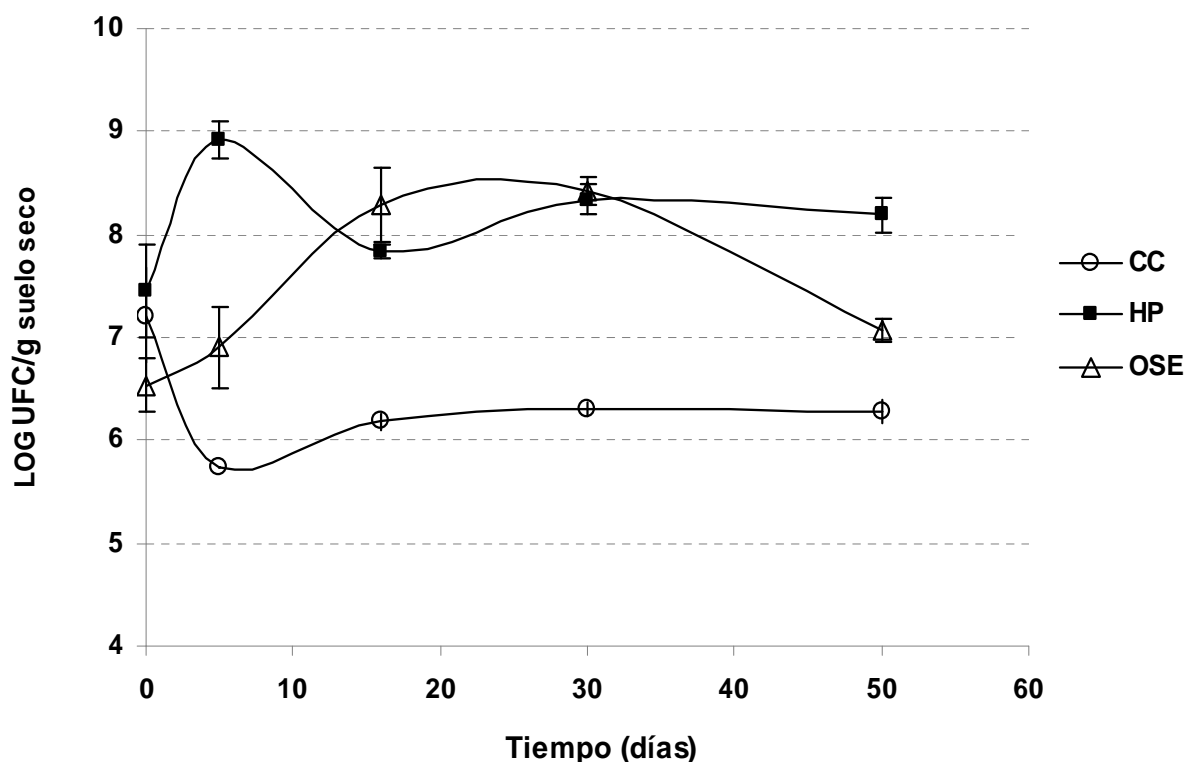


Figura IV.22. Evolución de los recuentos de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) en los microcosmos de biopilas con los distintos tratamientos. Las barras representan la DS de triplicados.

IV.C.2.1. Eliminación de hidrocarburos totales del suelo

Los valores de hidrocarburos totales en el suelo a tiempo inicial (t_0) y en los diferentes microcosmos a tiempo final (verano) se muestran en la Figura IV.23. También se muestran los valores observados al año (t_{365}) de iniciado el ensayo.

Al final del verano, debe resaltarse el alto valor de remoción (62 %) observado en el CC a tiempo 50 días. Esta eliminación resultó mucho mayor que la observada en el sistema control en el Ensayo I (19,3 %) utilizando el mismo diseño experimental. Comparado con el sistema control, el sistema OSE mostró una disminución en el contenido de HT del 19 %, la cual no llegó a ser significativa. Por el contrario, el sistema HP mostró una disminución significativa ($p < 0,01$) del 71 % con respecto a CC.

A un año de iniciado el ensayo, el valor de remoción de hidrocarburos en el sistema CC fue del 98,3 % y tanto HP con OSE mostraron un 98,8 % y 98,1 % de remoción, respectivamente.

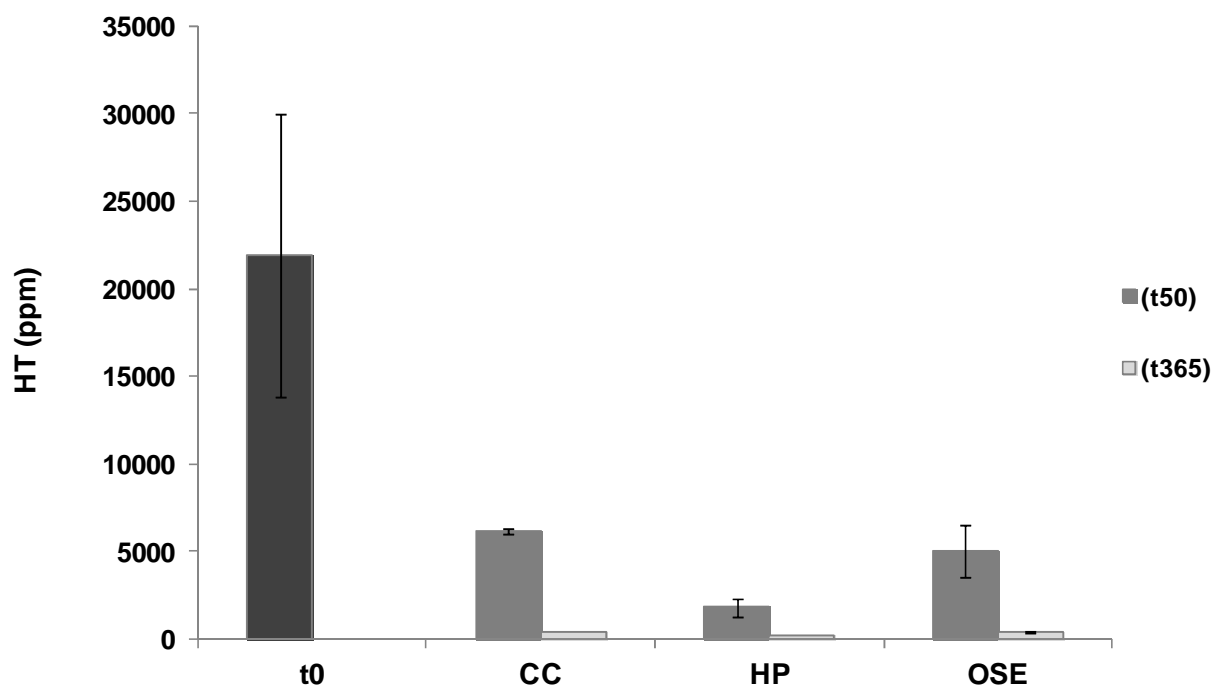


Figura IV.23. Hidrocarburos totales a tiempo inicial (t0, barra roja), tiempo final del ensayo de verano (t50,) y tiempo final del ensayo (t365), para cada una de las biopilas. Las barras representan la DS de la media (triplicados).

IV.C.2.3. Dinámica de las comunidades bacterianas

IV.D.2.3.a. Análisis de la estructura de la comunidad por DGGE

La Figura IV.24.a muestra el gel de DGGE obtenido a partir de los microcosmos bioestimulados con los distintos nutrientes y a los distintos tiempos de muestreo del ensayo (0, 5 y 50 días). A partir del análisis UPGMA de los perfiles de DGGE obtenidos, se construyó el dendrograma que se muestran en la Figura IV.24.b.

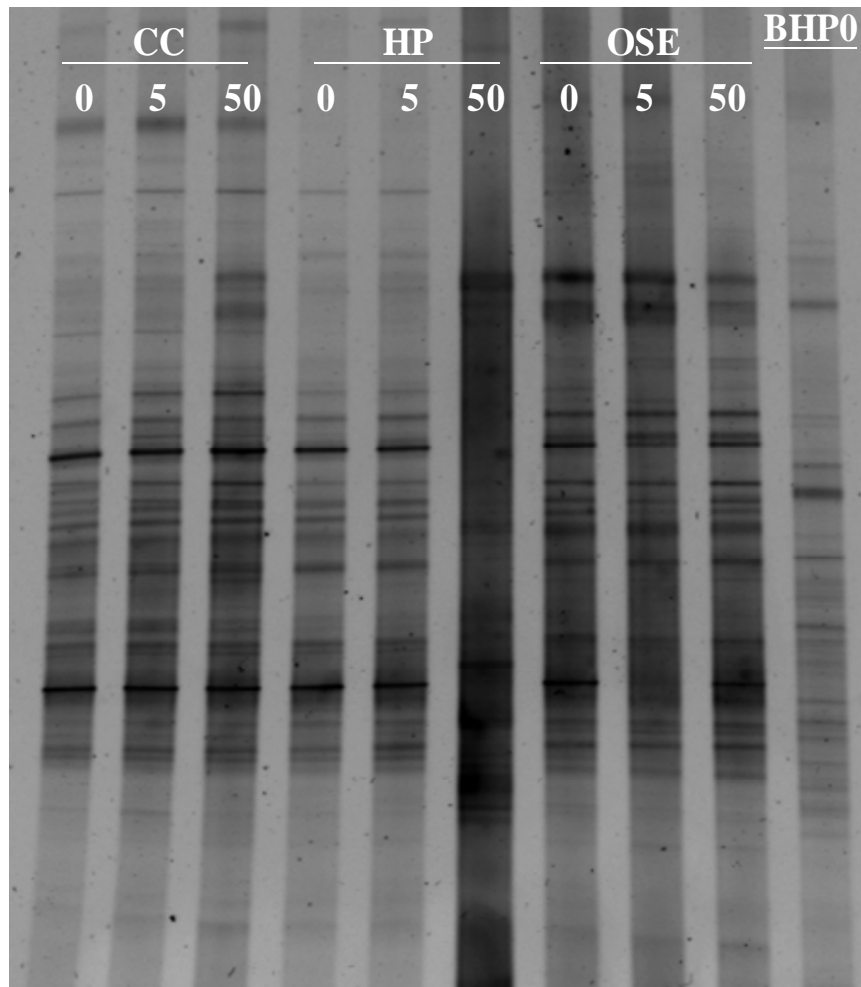


Figura IV.24.a. Gel de DGGE (urea-formamida del 35-65%) correspondiente a las diferentes biopilas y a los tiempos de muestreo 0,5 y 50 días. Se utilizó la muestra HPB0 como control de corrida.

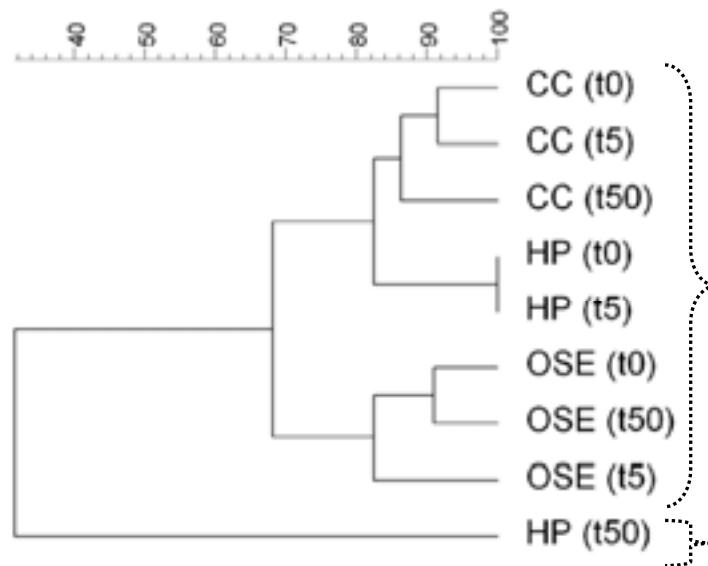


Figura IV.24.b. Dendrograma construido a partir de los datos de todos los microcosmos a los diferentes tiempos de muestreo (0, 5 y 50 días). Las llaves color rojo muestran los clusters más representativos.

Se observan un unico gran cluster, al que se le asocia el microcosmo HP al día 50. Esto muestra que el microcosmo con harina de pescado (HP) al final del ensayo promovió el desarrollo de una comunidad muy diferente a la presente en el resto de los microcosmos.

El gran cluster puede considerarse formado por dos subclusters. Uno de ellos incluye a los microcosmos CC y HP (0 y 5 días). El microcosmo CC evidenció pocos cambios en la dinamica de su comunidad durante los 50 días. La estimulación con HP no produjo cambios en la comunidad del suelo durante los primeros 5 días. El microcosmo OSE se ubicó en el segundo subcluster , mostrando la selección de comunidades diferentes a las presentes en el microcosmo CC desde el inicio del ensayo.

IV.C.2.3.b. Estimación de la biodiversidad bacteriana

Los valores de riqueza, así como los índices de dominancia y diversidad correspondientes a los diferentes microcosmos y para los tiempos de muestreo 0, 5 y 50 días se muestran en la Tabla IV.4.

Nuevamente, como se observó en los 2 ensayos anteriores, ya sea en los microcosmos parcelas como biopilas, el microcosmo control mostró un incremento en la diversidad, acompañado principalmente por un incremento en la riqueza y un moderado descenso de la dominancia. Estos valores apoyan lo comentado anteriormente acerca del efecto positivo de la aireación y el mantenimiento de un contenido de agua aproximadamente constante sobre la flora autóctona del suelo de los microcosmos control. El sistema HP no mostró cambios relevantes en la riqueza o dominancia al igual que OSE.

Tabla IV.4. Valores de riqueza y de los índices de dominancia y diversidad bacteriana observados en las biopilas control y en las bioestimuladas (HP y OSE) a tiempo 0, 5 y 50 días.

Microcosmos	Riqueza (S)	Dominancia (D)	Diversidad (H)
CC (t0)	16	0.081	2.628
CC (t5)	19	0.063	2.846
CC (t50)	23	0.051	3.052
HP (t0)	14	0.095	2.483
HP (t5)	14	0.089	2.519
HP (t50)	15	0.072	2.665
OSE (t0)	15	0.079	2.624
OSE (t5)	15	0.080	2.597
OSE (t50)	18	0.068	2.773

IV.C.2.3.c. Análisis filogenético

La Figura IV.25 muestra la imagen del gel de DGGE con las diferentes bandas marcadas con números. Algunas de las líneas señaladas con números contienen las muestras que fueron clonadas y secuenciadas. Cada clon secuenciado corresponde a una banda en el gel de DGGE.

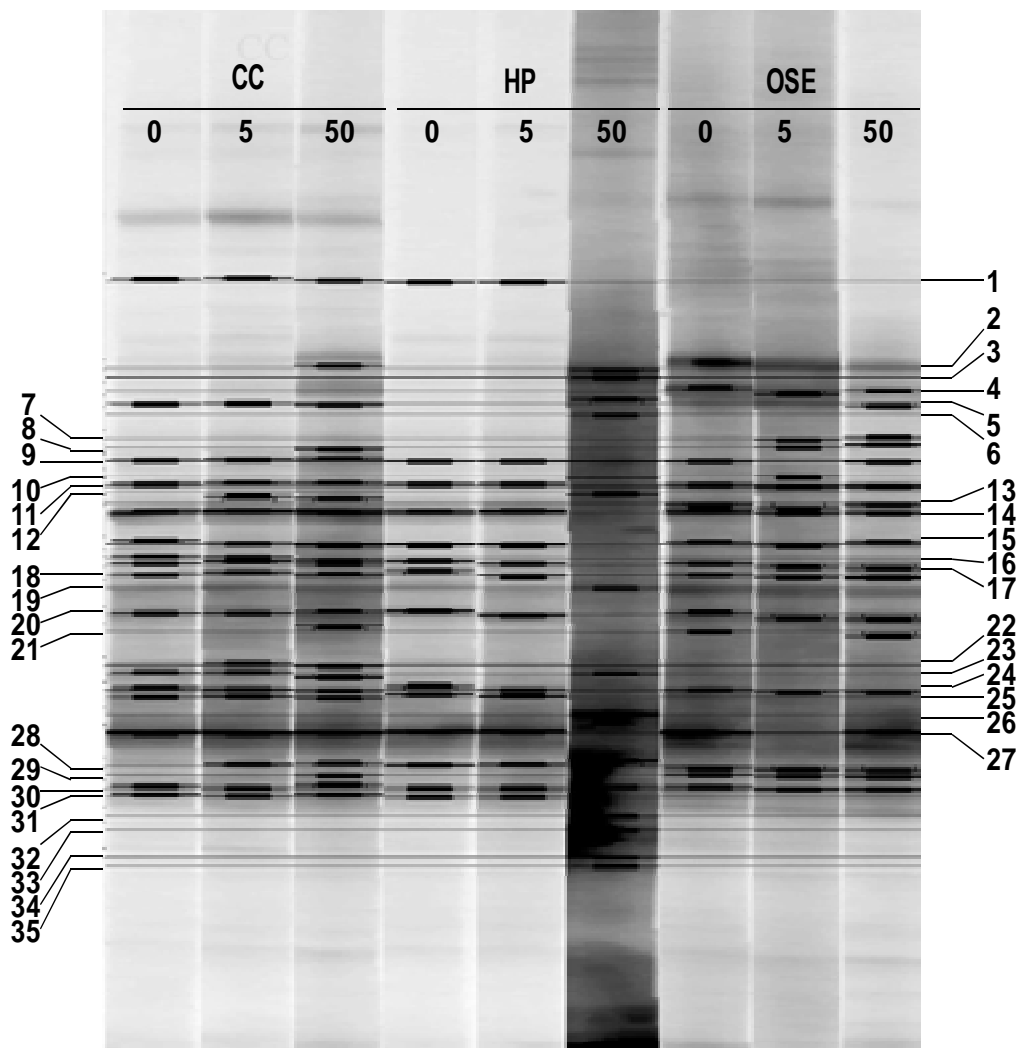


Figura IV.25. Imagen del gel de DGGE (normalizada por el programa GelComparII) obtenidos para los diferentes microcosmos al inicio y a los 5 y 50 días de estudio. Las líneas grises marcan la posición de las bandas secuenciadas, las cuales se numeraron correlativamente según su posición en el gel.

En la Tabla IV.5 se puede observar, para cada una de las bandas secuenciadas, la afiliación y el origen de la secuencia relacionada con mayor porcentaje de similitud. También se indican los microcosmos en donde se detectó la banda y el grupo taxonómico al que pudo relacionársela. Se observa también que muchas de las secuencias relacionadas se aislaron de ambientes contaminados, tanto suelo como agua de ambientes fríos.

Tabla IV.5. Afiliación taxonómica, secuencia más relacionada junto a su código de acceso al Gen Bank, % de similitud y sitio de aislamiento de todas las bandas clonadas y secuenciadas detectadas en el gel de DGGE de las biopilas. Se muestra también el microcosmo donde fue detectada la banda, aquí: en negrita se indica el tiempo de muestreo en que se obtuvo la banda secuenciada y entre paréntesis se indica el tiempo de muestreo donde se infirió la afiliación taxonómica de la banda observada, por comigración con la banda secuenciada en el mismo microcosmo.

Banda	Detección de la banda	Secuencia relacionada (N° de acceso)	% de similitud	Origen de aislamiento	Afiliación taxonómica
12	Todas y CC t50 , excepto HP (t50)	<i>Brevundimonas</i> sp. TP-Snow-C32 (HQ327141.1)	99	nieve del Tibet	<i>Caulobacteraceae</i> <i>Brevundimonas</i> sp.
15	Todas y CC t0 excepto HP (t50)	Uncultured bacterium clone (GU183588.1)	97	aquífero de 85 mts de profundidad contaminado con arsénico	<i>Acetobacteraceae</i>
16	Todas y CC t50 , excepto HP (t50)	<i>Sphingomonas</i> sp. FG03 (EU784670.1)	99	suelo contaminado con fenol	<i>Sphingomonadaceae</i> <i>Sphingomonas</i> sp.
17	CC t50 (t0, 5)	Uncultured <i>Sphingomonadaceae</i> bacterium (GU300207.1)	98	suelo de Canadá	<i>Sphingomonadaceae</i>
20	HP t50	Uncultured alpha proteobacterium (DQ316817.1)	99	sedimento contaminado con uranio	<i>Sphingomonadaceae</i>
21	Todas y CC t50 , excepto HP (t50)	<i>Caulobacter</i> sp. ECN-2008 (AM940947.1)	99	contaminación en un cultivo de <i>Paulinella</i> cromatófora	<i>Caulobacteraceae</i> <i>Caulobacter</i> sp.
24	CC (t0, 5 y 50) HP t50	<i>Carnobacterium</i> sp. G4a-1 (FN397989.1)	100	sedimentos con hidrato de gas (fondo marino)	<i>Carnobacteriaceae</i> , <i>Carnobacterium</i> sp.
25	Todas y CC t0 excepto HP (t50)	Uncultured bacterium clone (GU453471.1)	99	sedimento de aquífero contaminado con hidrocarburos	<i>Comamonadaceae</i> <i>Polaromonas</i>
27	HP t50	Uncultured bacterium (JF357615.1)	100	compost de paja	<i>Carnobacteriaceae</i> <i>Carnobacterium</i>
28	Todas y CC t0 excepto HP (t50)	Uncultured <i>Rhodiferax</i> sp. (GQ366604.1)	99	suelo del glaciar Roopkund, India	<i>Comamonadaceae</i>
29	Todas y CC t50 , excepto CC (t0)	<i>Bacillus</i> sp. G2(2006) (DQ667102.1)	91	Mar Ross (Antártida)	<i>Planococcaceae</i>
31	Todas y HP t50	<i>Planococcus</i> sp. ZD22 (DQ177334.1)	99	suelo contaminado por un efluente industrial de refinería petrolífera	<i>Planococcaceae</i> <i>Planococcus</i> sp.

Banda	Detección de la banda	Secuencia relacionada (N° de acceso)	% de similitud	Origen de aislamiento	Afiliación taxonómica
33	HP t50	<i>Arthrobacter</i> sp. 4-20 (GU213306.1)	99	suelo de glaciario de los Alpes Centrales	<i>Micrococcaceae</i> <i>Arthrobacter</i> sp.
34	HP t50	<i>Arthrobacter</i> sp. KOPRI 25422 (GU062491.1)	100	–	<i>Micrococcaceae</i> <i>Arthrobacter</i> sp.
35	HP t50	<i>Cryobacterium</i> sp. Hh31 (JF267311.1)	100	muestras de suelo de glaciario	<i>Micrococcaceae</i> <i>Cryobacterium</i> sp.

De las observaciones que surgen del análisis de la Tabla IV.5, es resaltable el hecho de que las bandas adscritas a las familias *Carnobacteriaceae* (género *Carnobacterium*) y *Micrococcaceae* (géneros *Arthrobacter* y *Cryobacterium*) sólo se detectaron en el microcosmo harina de pescado a t50. Estos resultados evidencian las diferencias anteriormente halladas en el gel de DGGE y en el dendrograma entre éste microcosmo a t50 en comparación con el resto. Los géneros pertenecientes al filum Actinobacteria representaron un 20 % de las bandas secuenciadas.

En este ensayo, los miembros del filum Proteobacteria representaron un 53 % de las OTUs identificadas, sin embargo la mayoría de las bandas adscritas a este grupo dejaron de observarse en el microcosmo HP a tiempo 50 (bandas 12, 15, 16, 21 y 28). Ejemplo de esto son las familias *Caulobacteraceae* (género *Brevundimonas*), *Acetobacteraceae* y *Comamonadaceae* (género *Polaromonas*).

Además, miembros de las familias *Planococcaceae* (género *Planococcus*, filum Firmicutes) y *Sphingomonadaceae* se encontraron en todos los microcosmos durante todos los tiempos de muestreo.

IV.C.2.3.d. Estimación de cambios poblacionales mediante análisis de componentes principales (ACP)

El análisis de componentes principales (ACP) que muestra la Figura IV.26 fue realizado en base a todas las líneas de bandas marcadas en la Figura IV.24. Los dos componentes principales explican el 71,8 % de la varianza (CP1: 49,9 % y CP2: 21,9%). El análisis muestra claramente que el microcosmo HP al t50 se separa notoriamente del resto de los tratamientos, sobre el CP1.

Es interesante resaltar que, de las bandas que pudieron ser asignadas a un grupo taxonómico, las 3 correspondientes a Actinobacterias (33, 34 y 35), claramente son responsables principales de la diferenciación del sistema HP t50 del resto de los microcosmos. El análisis también muestra que todas las muestras del microcosmo OSE forman un subgrupo definido, que se diferencia del resto de los microcosmos principalmente sobre el CP2. Lamentablemente, las bandas que más contribuyen a esa diferenciación no pudieron ser asignadas a sus respectivos grupos taxonómicos. Los microcosmos CC también forman un grupo separado, aunque cercano a los t0 y t5 bioestimulados con harina de pescado. Estos resultados también fueron evidenciados por el dendrograma mostrado en la Figura IV.23.b.

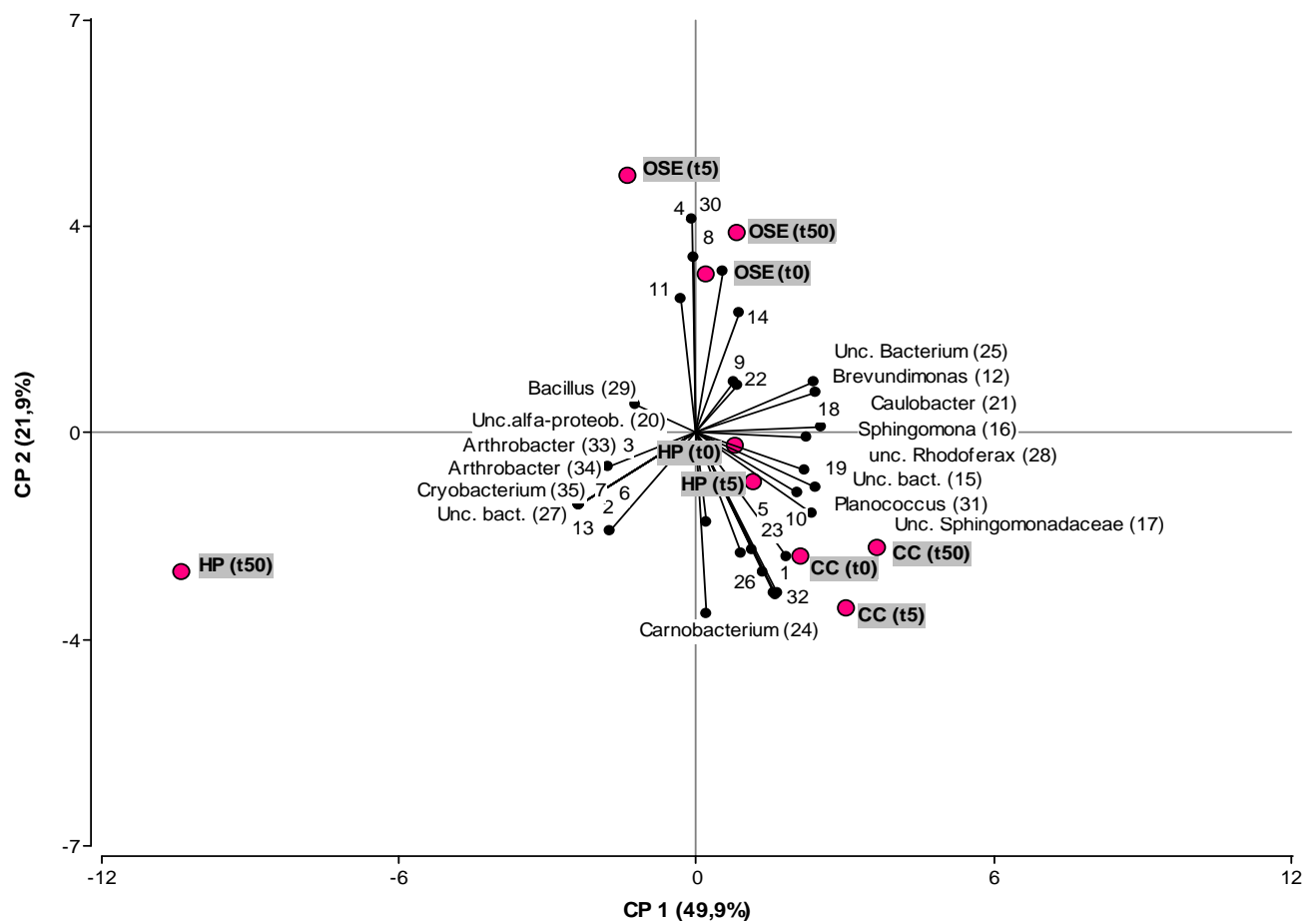


Figura IV.26. Gráfico del CPA de todos los microcosmos y las líneas de banda.

IV.D. Discusión

Debido a la presencia de bases antárticas y al creciente tráfico de buques en sus aguas, el continente antártico no es ajeno a la contaminación con hidrocarburos. Aunque en general los eventos de contaminación derivado de la actividad humana en las bases están restringidos a pequeñas áreas centradas en dichos asentamientos, producen un impacto ambiental mayor que en los ambientes templados o tropicales, ya que las comunidades biológicas son menos complejas y diversas y por ende mucho más sensibles a los efectos negativos causados sobre algunos de los escasos miembros de un determinado nivel trófico. Además, la complejidad y la variabilidad del clima hacen menos efectivo los mecanismos naturales de recuperación. Por ello, en los últimos años la biorremediación de hidrocarburos en zonas de clima frío ha adquirido un gran desarrollo ya que es una tecnología económica, eficaz y prometedora en comparación con los métodos físicos y químicos disponibles (Yang y col. 2009), los cuales además, son casi impracticables bajo las severas condiciones climáticas antárticas. Diversos estudios han utilizado la estrategia de bioestimulación en ambientes fríos para tratar suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos, mostrando resultados positivos en la biodegradación de estos contaminantes (Delille y col., 2004, Van Stempvoort y Biggar, 2007; Delille y Coulon, 2008).

En este capítulo se describieron ensayos de bioestimulación utilizando como sistemas experimentales las parcelas en el terreno y las biopilas, evaluándose diferentes fuentes de nutrientes, tanto orgánicas como inorgánicas. Cabe señalar que todos los ensayos fueron realizados en verano, con el objetivo de aprovechar la mayor actividad metabólica de la flora autóctona presente en los suelos, ya que la misma disminuye apreciablemente durante el resto del año, periodo durante el cual el suelo permanece congelado hasta la superficie (Aislabie y col., 2004). En relación a esto, en algunos de los ensayos se realizaron muestreos también al año de iniciados los mismos, a fin de comprobar el grado de actividad degradadora del sistema durante el periodo ambientalmente más desfavorable.

Cuando se utilizó el sistema experimental parcelas, se observó una eliminación de hidrocarburos del 42 % en el microcosmo control. Esta reducción puede atribuirse a los efectos combinados de biodegradación por la microbiota autóctona, estimulada por la aireación y humedad, y a la pérdida abiótica producida por los diferentes mecanismos físicos y químicos (evaporación, lavado, fotooxidación, etc). En este sentido, Ruberto y col (2003), observaron un

61 % de eliminación de hidrocarburos, atribuible a una pérdida abiótica y un 35 % a la eliminación biológica en un suelo agudamente contaminado con gas oil en la Antártida. Es importante tener en cuenta que en el mencionado ensayo, se trabajó con un suelo contaminado en forma aguda con gasoil, y el suelo contaminado no había sufrido ningún tipo de almacenaje previo por lo que se pudo haber favorecido la pérdida abiótica de los hidrocarburos por evaporación de la fracción más ligera del combustible fresco recién vertido.

En cambio, en el presente ensayo se utilizó tierra crónicamente contaminada que había sido quitada de su lugar original y almacenada por años en tambores de metal. Al sacar la tierra de los tambores, tamizarla y disponerla en una delgada capa en las parcelas, la aireación y el acondicionamiento pudo haber permitido la pérdida del 42 %. Dicha pérdida es elevada para un suelo crónicamente contaminado, que se encuentra normalmente envejecido, con un alto grado de adsorción de los contaminantes y una baja proporción de componentes volátiles. Vázquez y col. (2009) citó una eliminación abiótica y biológica mucho menor, del 10 %, en suelos antárticos crónicamente contaminados con gas oil.

La harina de pescado, combinada o no con el surfactante, resultó el nutriente que estimuló en mayor medida el crecimiento de las poblaciones bacterianas cultivables en las parcelas. Sin embargo, no favoreció la eliminación de hidrocarburos en el suelo tratado, así como tampoco lo hicieron los nutrientes SI y SIB. Como se mencionó anteriormente, la estimulación pudo deberse, por un lado, al aporte de nutrientes fácilmente asimilables por parte de la harina de pescado y, por otro lado al hecho de que con éste nutriente se obtuvieron tierras de textura más esponjosa y por ende mejor aireadas que el resto de los microcosmos estudiados. La ausencia de remoción con harina de pescado difiere de lo observado por Delille y col. (2008). Estos autores realizaron ensayos de bioestimulación con harina de pescado utilizando biopilas como sistemas experimentales, obteniendo como resultado un aumento de más de 1 orden de magnitud en las poblaciones cultivables y una eliminación significativa de HT respecto de las biopilas no bioestimuladas con ese nutriente.

El nutriente OSEII[®] fue el único que mostró niveles de poblaciones bacterianas cultivables cercanas al microcosmo control. Sin embargo, aunque se podría esperar que este nutriente corresponda estos resultados con una eliminación poco eficiente de hidrocarburos, se observó lo contrario, ya que logró favorecer y mejorar la eliminación de hidrocarburos en un 49,4 % respecto al microcosmo control. Es probable que el carbono, el nitrógeno, el fósforo, las vitaminas, las enzimas y los surfactantes que aportan este nutriente hayan favorecido la selección

y colonización de una comunidad especialmente adaptada a desarrollar a expensas de los hidrocarburos contaminantes de este suelo. También es posible que éste nutriente oleofílico haya incrementado la utilización de O_2 de manera más eficiente que los otros nutrientes, como fue citado por Zhu y col. (2004). Cabe señalar que el éxito de la biorremediación de un suelo depende de las características del suelo y la contaminación, entre otros factores, y parece que en este caso, dicho nutriente oleofílico resultó eficiente en el tratamiento del suelo antártico contaminado al ser utilizado en sistemas de parcelas con una alta relación superficie/volumen.

Cuando se realizó el análisis de la estructura de la comunidad bacteriana presente en el suelo tratado de las parcelas, se observó claramente que el agregado de nutrientes afectó la composición de la comunidad, resultado también observado por Vázquez, y col., (2009). Particularmente la harina de pescado generó fuertes cambios en la comunidad, reflejados en la formación de un cluster separado del resto de los nutrientes, y también mostró un fuerte aumento en la diversidad bacteriana. Este resultado puede ser la consecuencia de que la harina haya permitido el crecimiento de algunas poblaciones de la comunidad, inicialmente presentes en niveles bajos en este suelo antártico, caracterizado por un bajo contenido en carbono orgánico. A pesar que, hasta donde tenemos conocimiento, no se han realizado estudios con el fin de analizar los cambios generados por la harina de pescado en la comunidad bacteriana del suelo, Delille y col (2008) informaron un efecto positivo en la biorremediación de un combustible diesel en un suelo sub-antártico contaminado, como había sido mencionado anteriormente en esta sección. Aunque este efecto positivo se observó luego de un año de tratamiento y utilizando como diseño experimental biopilas con un suelo prístino contaminado en forma aguda, resulta interesante evaluar nuevos experimentos de biorremediación utilizando este nutriente.

Es interesante resaltar que a diferencia de lo observado con el agregado del resto de los nutrientes, el nutriente OSEII[®] mostró cambios mínimos en relación a la comunidad original y una diversidad bacteriana cercana a la obtenida en el microcosmo control al final del ensayo. Este resultado resulta interesante debido a que con este nutriente se podría obtener una buena eficiencia de eliminación (como es el caso del ensayo en parcelas) sin una gran alteración en la estructura de la comunidad bacteriana autóctona.

La utilización del surfactante Brij700[®] no produjo modificaciones apreciables en la estructura de la comunidad bacteriana de los microcosmos bioestimulados con sales inorgánicas, efecto que si parece haber ocurrido en los microcosmos con HP. Ha sido demostrado que la utilización

de los surfactantes puede provocar tanto efectos positivos como negativos en la biodegradación bacteriana de los hidrocarburos. Los efectos positivos (Atagana y col., 2002) son generalmente atribuibles al aumento de la solubilidad/disolución de los hidrocarburos, resultando finalmente en un aumento de su biodisponibilidad. Los efectos negativos han sido relacionados con su toxicidad y con la degradación preferencial de los mismos por parte de las bacterias (Jing-Liang y Bing-Hung, 2009). En este trabajo, si bien el surfactante Brij700[®] no resultó tóxico para el crecimiento bacteriano, ya que no produjo inhibición del mismo, tampoco favoreció la eliminación de HT, ni combinado con las sales inorgánicas ni en presencia de harina de pescado, a pesar de haber sido aplicado en una proporción similar a la recomendada por Atagana y col. (2004). Esta falta de efecto fue observada también en el ensayo en biopilas realizado con el mismo tipo de suelo. Aparentemente, el tiempo transcurrido desde su contaminación y el largo tiempo de almacenamiento en condiciones adversas envejeció a este suelo, reduciendo la biodisponibilidad de los hidrocarburos remanentes de una forma que no pudo ser revertida en forma significativa por la presencia de Brij700[®]

Como se mencionó arriba, la biorremediación de los mismos suelos utilizados en el ensayo de parcelas, también se estudió mediante el diseño experimental biopilas. Este diseño experimental resultó eficiente para remover contaminantes de suelos en numerosos reportes previos (Genovese y col., 2008; Sanscartier y col., 2009). En el primero de los ensayos con biopilas, se observó una disminución de los niveles de HT atribuible a la pérdida abiótica y la remoción biológica mucho más baja (alrededor del 16 %) que la obtenida en las parcelas. Es posible que la geometría del sistema biopila, con una relación superficie/volumen menor que la de las parcelas, haga más lentos todos aquellos procesos abióticos cuya magnitud dependen cerradamente del área superficial del sistema, como la evaporación y la fotooxidación entre otros. Respecto a la bioestimulación con los nutrientes testeados en este ensayo, nuevamente se volvió a observar (al igual que en el ensayo parcelas), que la harina de pescado parece favorecer en mayor medida el crecimiento de las poblaciones bacterianas cultivables y de la actividad deshidrogenasa a expensas de fuentes de carbono accesibles. Sin embargo, la eliminación de HT obtenida con los nutrientes evaluados (sales inorgánicas, fertilizante NPK e incluso HP) si bien fue significativa con respecto al control (test de Dunnet) fue baja (entre el 11 y el 17 % aproximadamente). Es probable que la disponibilidad de oxígeno en este diseño experimental sea más reducida que en las parcelas y por ello la biodegradación por parte de la flora autóctona haya

sido menos eficiente. Puede inferirse que el agregado en etapas de las sales inorgánicas y la liberación lenta de nutrientes que proporciona el NPK hayan favorecido dicha leve eliminación. Las cantidades de sales inorgánicas fueron agregadas en etapas durante el experimento para evitar la inhibición causada por un drástico cambio osmótico como ha sido descripto anteriormente (Viñas y col., 2004) y para reducir el efecto del lavado. También es preciso tener en cuenta que durante el ensayo, las biopilas sufrieron anegamiento provocado por las constantes precipitaciones, evento que pudo haber disminuido también la disponibilidad del oxígeno, debido a la saturación de los microporos del suelo. Respecto a la harina de pescado, se debe tener en cuenta que favorece la porosidad y por ende la entrada de oxígeno al suelo, evento que pudo haber permitido una mayor eliminación de hidrocarburos, en comparación con las parcelas. Un detalle interesante, que debe considerarse al momento de la elección del diseño de los sistemas de biorremediación, es la menor amplitud térmica registrada en el interior de los sistemas biopilas en comparación con los valores registrados en el seno del suelo de las parcelas. Si bien los sistemas no se realizaron en el mismo periodo de tiempo y deberán realizarse nuevos ensayos a fin de confirmar esta aseveración, es posible que la menor relación superficie/volumen del sistema biopila presente una mayor inercia térmica, siendo menos influenciada, en su interior, por los máximos y los mínimos registrados en el aire exterior. El pequeño espesor del suelo dispuesto en las parcelas, mostró ser más sensible a dichas oscilaciones térmicas.

En cuanto al análisis de la dinámica de las comunidades presentes en este ensayo, los dendrogramas mostraron que sólo los t0 de CC y CCB se agruparon en un cluster, el resto de los t0 no se agruparon juntos por lo que es probable que los cambios en las comunidades se hayan producido muy rápidamente después de agregar los nutrientes. Esta rápida respuesta de las comunidades a la bioestimulación ya había sido observada anteriormente por el grupo de trabajo en un estudio en parcelas conteniendo suelos crónicamente contaminados, los cuales fueron estudiados mediante perfiles de T-RFLP (Vázquez y col., 2009). También Rölling y col. (2004) observaron cambios significativos en la estructura de las comunidades bacterianas de suelos agudamente contaminados un día después de su fertilización con nutrientes inorgánicos. Estos resultados revelan la capacidad de las comunidades naturales para expresar una rápida respuesta al balance de nutrientes y a la aireación. Los microcosmos CC y CCB se ubicaron en el mismo subcluster hasta los 5-10 días de ensayo, periodo a partir del cual se ubicaron en subclusters distintos pero dentro del mismo cluster. El resto de los nutrientes se ubicaron y mantuvieron a lo

largo del ensayo en subclusters distintos dentro de otro cluster. Estos resultados muestran la estricta selección de comunidades bacterianas diferentes generadas por el agregado de nutrientes, resultado también observado por Ros y col., (2010).

Cuando se realizó una estimación de la biodiversidad bacteriana presente en cada microcosmo durante el ensayo, se observaron los mayores aumentos de diversidad para CC (y más leves para CCB) al final del verano (39 días de ensayo), mientras que el resto de los nutrientes no mostraron cambios importantes. Esta diferencia entre CC y CCB y el resto de los nutrientes también había sido evidenciada por el dendrograma. Es posible que el aumento observado en CC se deba a un efecto positivo generado por el mezclado y el mantenimiento de un valor de humedad adecuado y aproximadamente constante. Estas condiciones pueden haber favorecido el crecimiento de poblaciones que se encontraban muy restringidas en las condiciones en las que el suelo había sido mantenido durante su almacenamiento. También es posible que al proliferar estas poblaciones, se haya reducido la proporción de las poblaciones dominantes durante el almacenamiento. Esta combinación de efectos puede haber llevado al observado incremento en la diversidad de los microcosmos CC. Por otro lado, el menor aumento de diversidad observado en CCB podría deberse al efecto provocado por la presencia del surfactante Brij700[®]. La tendencia a la disminución en los valores de diversidad bacteriana observada en los sistemas bioestimulados durante los 39 días de ensayo es probable que sea la consecuencia de la acción combinada del Brij700[®] y los nutrientes, o bien a expensas de una reducción en el número de poblaciones detectables (sales inorgánicas) o bien disminuyendo la proporción de las poblaciones inicialmente muy dominantes (HP y NPK). Al año de ensayo los microcosmos HPB y NPKB mostraron una tendencia al aumento de la diversidad que sí fue lo suficientemente relevante como para ser detectada. Aunque no es posible confirmarlo sin ensayos adicionales, es posible que la liberación más lenta de los nutrientes en el microcosmo NPKB, sea responsable de generar condiciones más favorables para el aumento y mantenimiento a largo plazo de una mayor diversidad microbiana. Este posible efecto no fue observado para el nutriente SIB, a pesar de su agregado en etapas.

Del análisis de las afiliaciones taxonómicas de las bandas secuenciadas a partir de los geles de DGGE puede resaltarse la presencia, en todos los microcosmos y en todos los tiempos, de miembros de la familia *Sphingomonadaceae*. Dicha familia posee una gran versatilidad y adaptación, como lo evidencia su presencia tanto en suelos de clima frío (Margesin y col., 2011; Bell y col., 2011) como en clima templado (Coppotelli y col., 2009).

Otro punto a resaltar en el presente análisis es la gran proporción de miembros del Filum *Actinobacteria* (50 % de las bandas secuenciadas), los cuales no habían sido frecuentemente reportados como dominantes en suelos antárticos superficiales afectados por hidrocarburos, aunque sí habían sido detectados en suelos antárticos prístinos (Saul y col., 2005). El género *Dokdonella*, de la familia *Xanthomonadaceae*, fue hallado en los microcosmos bioestimulados y no así en los microcosmos control CC y CCB. Esta observación sugiere que, miembros del género estaban presentes en la tierra sin bioestimar por debajo del límite de detección y que luego aumentó su número con el agregado de nutrientes. Miembros de género *Brevundimonas* (familia *Caulobacteraceae*) fueron hallados en los microcosmos CCB, NPKB y HPB. Cabe señalar que el organismo más relacionado según el banco de datos, fue aislado de suelos contaminados con hidrocarburos de la Antártida.

A pesar de la presencia de grupos bacterianos con conocida capacidad degradadora, en las biopilas bioestimuladas las eficiencias de degradación fueron baja. Es importante tener en cuenta que este suelo, como se comentó más arriba, permaneció, luego de ser contaminado, durante al menos 2 años almacenado en barriles metálicos, en donde se lo mantuvo muy compactado y con muy poco contacto con el aire atmosférico, lo que de alguna manera representa una situación más parecida a la de un suelo contaminado sub-superficial que la de un suelo de superficie. Es posible que durante su almacenamiento en las condiciones mencionadas arriba, en estos suelos se haya generado una condición de baja tensión de oxígeno y de transferencia de masa muy limitada. Se ha reportado que, bajo estas condiciones las poblaciones bacterianas se encuentran principalmente en un estado de muy baja tasa de crecimiento (Johnsen y col 2005, Björklöf y col 2008). Esas condiciones claramente favorecen el establecimiento de microorganismos con bajas tasas de crecimiento y alta capacidad de supervivencia a largo plazo, caracterizándose por una baja demanda energética, la cual es utilizada fundamentalmente como energía de mantenimiento bajo las adversas condiciones ambientales (estrategas k). Este podría ser el caso de las actinobacterias, las cuales se detectaron en una muy importante proporción en este estudio.

El segundo ensayo utilizando el diseño experimental biopilas también mostró varios puntos que merecen ser resaltados. Por un lado, la pérdida abiótica observada en el microcosmo control fue alta (62 %) en comparación con los ensayos anteriores. Es importante recordar que el suelo superficial utilizado en este estudio, a diferencia del utilizado en las parcelas y en el ensayo I de biopilas, no había permanecido compactado y almacenado. Además, a pesar de registrar una larga historia de exposición a los contaminantes, una significativa fracción de los hidrocarburos había sido vertida recientemente, producto de la pérdida de una tubería. Por esta razón, muchos de los hidrocarburos presentes en el suelo eran altamente volátiles, y por ende fácilmente eliminables por evaporación y otros procesos abióticos. Es importante resaltar la historia previa de exposición del suelo, que seguramente habría seleccionado una microbiota adaptada a la degradación de estos contaminantes. Sin embargo, como el microcosmo CC no sostuvo su valor inicial de poblaciones bacterianas cultivables hasta el final del ensayo, es probable que la mayor pérdida haya sido por factores abióticos.

Los resultados fueron favorables con la aplicación del nutriente HP en cuanto a la población degradadora de hidrocarburos. Este nutriente produjo una estimulación rápida de las BDH que fue prácticamente sostenida durante todo el tratamiento. En cambio, el producto oleofílico OSEII[®] produjo un incremento paulatino durante 15 días, alcanzando el valor de BDH del microcosmo HP. Este valor fue mantenido aproximadamente 15 días y se observó un descenso al valor de CC. Aparentemente HP y OSE producen un efecto estimulador de las BDH similar (cuantitativamente), con la diferencia de que con HP es inmediato y sostenido en el tiempo. Respecto a la eliminación de HT, la HP exhibió la mayor eficiencia a los 50 días de ensayo, resultado no observado con OSE. Este producto comercial mostró una tendencia a la disminución en el contenido de HT, sin embargo la misma no llegó a ser estadísticamente significativa. Nuevamente se observa una cerrada dependencia de la efectividad de una estrategia de bioestimulación con el tipo de suelo y el tipo de sistema experimental. Es posible que el sistema comercial sea más eficiente aplicado en otras condiciones, cuando se tratan suelos muy envejecidos, con bajo contenido de componentes volátiles y fácilmente degradables y baja biodisponibilidad, situación en la cual los componentes del producto comercial podrían producir un efecto positivo sobre la degradación. Por el contrario, cuando el suelo presenta alta proporción de componentes “frescos”, con alta biodisponibilidad y más fácilmente degradables, el efecto positivo del OSE es menos acentuado. Por el contrario, aparentemente, la bioestimulación con harina de pescado parece favorecer la biodegradación durante los primeros 50 días de ensayo. A

los 365 días se observó una eliminación casi total en todos los microcosmos respecto al t0 (98,3 % para CC, 98,8 % para HP y 98,1 % para OSE). Esto nos muestra que, bajo las condiciones ensayadas, si bien la harina de pescado aceleró el proceso durante los primeros 50 días (verano antártico), los hidrocarburos remanentes fueron degradados/eliminados durante el resto del año en todos los microcosmos. Esto pudo deberse a que las biopilas fueron mantenidas en un ambiente cerrado en la base antártica, por lo que no ocurrió el congelamiento permanente de las tierras que sí habría ocurrido si las biopilas hubieran permanecido donde estuvieron ubicadas durante el verano. Así, pudieron ocurrir los procesos de pérdida abiótica y biodegradación hasta la eliminación casi total de los contaminantes. De todas maneras, dado que en el ambiente antártico, por cuestiones logísticas, no siempre será posible mantener grandes volúmenes de suelo protegidos de la intemperie, el efecto “acelerador” observado con la harina de pescado puede resultar de gran importancia al momento de planear un proceso de biorremediación durante el verano antártico.

Cuando se analizaron los dendrogramas construidos a partir de los geles de DGGE, se observó que la comunidad estimulada por HP fue similar a la evidenciada en CC y sólo hacia el final (t50) se seleccionó una comunidad claramente diferenciada de CC. En cambio, en contraste con lo sugerido por los resultados en parcelas, el nutriente OSE pareciera haber seleccionando más rápidamente una comunidad “nueva” y “propia”, que se mantuvo dominante durante todo el tratamiento.

Cuando se realizó una estimación de los índices de biodiversidad bacteriana, se volvió a observar un incremento en la biodiversidad en el microcosmo CC. Este resultado apoya lo comentado anteriormente acerca del efecto positivo de la aireación y el mantenimiento de un contenido de agua aproximadamente constante sobre la flora autóctona del suelo de los sistemas control. Los sistemas bioestimulados (HP y OSE) solo mostraron leves variaciones en la riqueza y los índices de biodiversidad y dominancia.

Si bien no fue claramente evidenciado por los índices de diversidad, dominancia y riqueza, la harina de pescado produjo un cambio importante en la estructura de la comunidad bacteriana hacia el final del ensayo, como fue evidenciado por el gel de DGGE y el dendrograma correspondiente. Este cambio redundó en una muy importante actividad degradadora de hidrocarburos. En este ensayo, el análisis de las afiliaciones taxonómicas de las bandas secuenciadas evidenciaron nuevamente la presencia del filum *Actinobacteria*, el cual se hizo

presente estrictamente en el microcosmo HP al t50 (con la excepción de la familia *Carnobacteriaceae* cuyo género *Carnobacterium* también fue hallado en el microcosmo control). Este resultado evidencia las diferencias observadas en este microcosmo a t50 en el gel de DGGE y en el dendrograma. En el ensayo I de Biopilas, las actinobacterias representaron el 50% de las OTUs detectadas y se encontraron presentes desde el inicio del estudio en todos los sistemas. En cambio en este último ensayo, las actinobacterias no formaban parte de la flora bacteriana dominante al inicio del ensayo. Sin embargo, al final del ensayo, el sistema que evidenció la mejor actividad degradadora mostró un 20% de miembros pertenecientes al filum *Acinobacteria*, los cuales no se detectaron en ningún otro sistema a ese mismo tiempo. Este resultado sugiere que este grupo tendría un rol relevante en el proceso de eliminación de los hidrocarburos estimulado por la harina de pescado. Las bacterias Gram positivas del filum *Actinobacteria*, son aerobias, microaerófilas o anaeróbicas y han sido referidas como componentes principales en las etapas tardías de las sucesiones de los suelos (Shrestha y col, 2007) siendo además más abundantes a medida que aumenta la profundidad (Fierer y col. 2003) Además, miembros de este filum han sido reportados como degradadores de hidrocarburos en aerobiosis y microaerofilia en diversos suelos, muchos de ellos de zonas extremadamente frías (Whyte y col 2002; Margesin y col, 2003; Björklöf y col, 2009). Los resultados de este trabajo son coincidentes con lo reportado previamente para las acinobacterias y con su rol de estrategias k mencionado anteriormente. El suelo compactado, seco y envejecido (con baja biodisponibilidad de los hidrocarburos remanentes) utilizado en los dos primeros ensayos, es compatible con el establecimiento de microorganismos que sean estrategias k, adaptados a ambientes estables y pobres en sustratos metabolizables. Probablemente por ello es que este grupo bacteriano se detectó en proporciones elevadas en estos suelos desde el inicio del ensayo, ya que estarían presentes en el suelo como uno de los grupos predominantes. Por el contrario, el suelo con alto contenido de contaminantes frescos del ensayo II de biopilas, no mostró niveles apreciables de este grupo al inicio del ensayo, pero sí se observaron a tiempo final en el sistema con mayor eficiencia degradadora.

Por su parte las familias *Planococcaceae* (género *Planococcus*) y *Sphingomonadaceae* se hallaron en todos los microcosmos durante todo el ensayo. Estas familias, pertenecientes al filum *Firmicutes* y *Proteobacteria*, respectivamente, fueron encontradas como los más abundantes en estudios metagenómicos de suelo en la Antártida por Aislabie y col. (2006), por lo que es probable que la harina de pescado haya estimulado el crecimiento de dichas poblaciones

bacterianas, y por intermedio de un proceso de co-metabolismo, haya favorecido la biodegradación de los contaminantes presentes por parte de estas comunidades.

Ha sido frecuentemente reportado que los miembros del Filum *Proteobacteria* (y especialmente los géneros *Pseudomonas*, y *Sphingomonas*) predominan en los suelos con hidrocarburos, especialmente de Antártida (Mac Cormack y col 2011). Estos grupos parecen dominar en los suelos superficiales contaminados durante las primeras etapas sucesionales, probablemente gracias a su versatilidad metabólica y altas tasas de crecimiento, actuando como estrategias r. En el ensayo en biopilas (ensayo II), la presencia de un porcentaje elevado de bandas adscritas al filum *Proteobacteria* (las cuales estuvieron presentes en el suelo a tiempo inicial y en los tiempos finales de los sistemas CC y OSE, pero mucho menos representadas en el sistema HP a tiempo final), también apoya la hipótesis de que estos microorganismos podrían actuar como estrategias r. Como se menciona en el párrafo anterior, el suelo utilizado, mucho menos envejecido y habiendo recibido aportes recientes de hidrocarburos, presenta una proporción de proteobacterias que fue disminuyendo selectivamente sólo en el sistema que mostró una muy alta reducción de los hidrocarburos. Bajo estas condiciones el sistema pudo haber alcanzado un estado de mayor equilibrio, con baja disponibilidad de hidrocarburos degradables, poco apto para la proliferación de muchos de estos microorganismos de rápido crecimiento, los cuales dejaron de poder ser detectados, en forma paralela a la aparición de grupos mejor adaptados a esas condiciones ambientales, como las actinobacterias. Es interesante mencionar que, en concordancia con lo arriba mencionado, en un estudio previo realizado en el grupo de trabajo (Ruberto, 2009), la identificación de los componentes mayoritarios de un consorcio bacteriano obtenido de suelos antárticos contaminados mediante cultivos de enriquecimiento con HAPs y gasoil como única fuente de C y energía, reveló la presencia mayoritaria de miembros del Filum *Proteobacteria*. La presencia de este Filum se atribuyó, al menos en parte a las condiciones de presión de selección generadas durante el cultivo de enriquecimiento, las cuales favorecían la proliferación de microorganismos con altas velocidades de crecimiento bajo las condiciones de estrés ambiental generadas, actuando como estrategias r.

En conjunto estos resultados y su comparación con los ensayos anteriores evidencian la utilidad de la matriz harina de pescado para aumentar la eficiencia de ciertos procesos de biorremediación y muestran la gran especificidad de sitio que presentan dichos procesos en

suelos antárticos, hecho que deberá ser muy tenido en cuenta al momento de diseñar un proceso de eliminación de hidrocarburos en el continente blanco.

CAPÍTULO V

Bioestimulación de suelos crónicamente contaminados en clima templado

V.A. Introducción

El objetivo general de los ensayos de bioestimulación de suelos en clima templado presentados en este capítulo fue evaluar la eficiencia de la estrategia de bioestimulación sobre la remoción de hidrocarburos de dos sitios crónicamente contaminados del área petroquímica La Plata-Ensenada.

Habitualmente, y con la intención de acondicionar un suelo altamente contaminado para su tratamiento por biorremediación, suele realizarse una mezcla con suelo prístino de forma de “diluir” el alto grado de contaminación del suelo y mejorar su tratabilidad (Karamalidis y col, 2010). Una consecuencia directa de la mezcla de suelos, es la reducción de la concentración del contaminante en el nuevo material, y así mismo un cambio en el hábitat, donde se esperaría el desarrollo de una nueva comunidad propia de la mezcla. Es decir, la mezcla con suelo prístino aportaría una nueva comunidad microbiana, probablemente más diversa y con amplio potencial metabólico. Sin embargo, dicha operación produce una contaminación adicional al utilizar suelo prístino como “diluyente”, resultando éste, un aspecto negativo de la estrategia propuesta.

Con el objetivo de limitar el uso de suelos prístinos durante el acondicionamiento de una tierra a biorremediar, y de alguna manera extender la aplicabilidad de esta práctica a suelos con diferente grado de contaminación, se evaluó la posibilidad de biorremediar suelos crónicos realizando la mezcla de una tierra con alta concentración de hidrocarburos con otra de menor concentración, proveniente de una misma zona. La proximidad de sitios permitiría reducir la variabilidad en la clase de suelos mezclados, tanto desde el punto de vista de la textura, contenido de materia orgánica, como del tipo de contaminación.

Para tal fin, se seleccionó el suelo del Barrio Mosconi (B) como la tierra con menor grado de contaminación, y la tierra de Canal Oeste (O) como la de mayor grado de contaminación. La mezcla estudiada se realizó en una proporción 2:1, Barrio Mosconi vs Canal Oeste.

V.B. Microcosmos de suelo Polo petroquímico La Plata-Ensenada (I)

El objetivo de este ensayo fue evaluar la eficiencia de la biorremediación de las tierras B y O estimulando la comunidad microbiana con el aporte de C/N/P a través del agregado de harina de

pescado como agente bioestimulante. Para ello, se ensayó la biorremediación de la mezcla de ambas tierras en microcosmos (frascos de 1000 cm³).

Se plantea como hipótesis que la harina de pescado, nutriente orgánico fácilmente asimilable, es un estimulante efectivo del desarrollo de las poblaciones microbianas de ambas tierras, favoreciendo el establecimiento de una nueva comunidad en el nuevo hábitat, capaz de degradar los hidrocarburos presentes. Los microcosmos planteados fueron: O, B, Mez (mezcla de O y B), OHP (suelo de Canal Oeste bioestimulado con harina de pescado), BHP (suelo de Barrio Mosconi bioestimulado con harina de pescado) y MezHP (mezcla de O y B bioestimulado con harina de pescado).

V.B.1. Actividad microbiana deshidrogenasa

La Figura V.1 muestra la evolución de la actividad deshidrogenasa de las comunidades bacterianas de los diferentes microcosmos durante el experimento.

Se puede apreciar que la actividad deshidrogenasa aumentó significativamente durante los primeros 6 días de ensayo en los microcosmos bioestimulados con harina de pescado y durante los primeros 13 días en los microcosmos no bioestimulados, siendo mayor la actividad alcanzada para los microcosmos bioestimulados con harina de pescado ($p < 0.001$). Luego, todos los microcosmos mostraron una disminución gradual de su actividad alcanzando valores similares a los iniciales hasta final del ensayo (no mostrado), sin mostrar diferencias significativas. Particularmente el microcosmo OHP se mantuvo por debajo de BHP durante el aumento observado a los 6 días. También, el valor de deshidrogenasa de OHP descendió por debajo del valor inicial a partir del día 50, manteniéndose sin cambios hasta el final del ensayo.

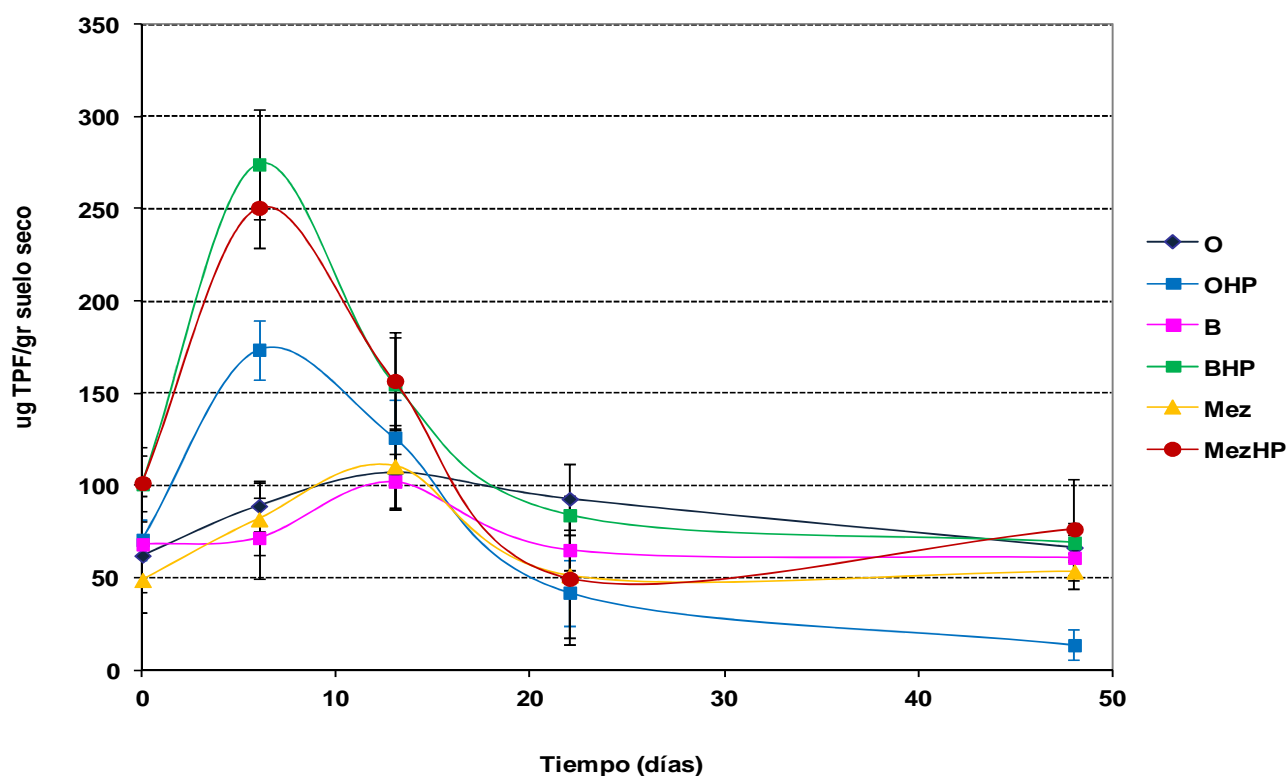


Figura V.1. Actividad deshidrogenasa del suelo durante los 263 días de ensayo para cada uno de los microcosmos en estudio. Las barras representan la DS de triplicados.

V.B.2. Evolución de las poblaciones cultivables

La evolución de las poblaciones cultivables de las BH y BDH en cada microcosmo se muestra en las Figuras V.2 y V.3, respectivamente, y están expresadas como unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco.

Respecto a la evolución de los recuentos de BH hasta el día 48 (Figura V.2), al inicio del ensayo se puede apreciar un aumento en los valores de un orden de magnitud en los microcosmos bioestimulados con harina de pescado (OHP, BHP y MezHP) en comparación a los recuentos obtenidos en los microcosmos sin bioestimar ($p < 0.01$), alcanzando su valor máximo a los 6 días de ensayo. Los microcosmos sin bioestimar mantuvieron un valor de BH aproximadamente constante hasta el día 48. Entre los 48 y los 263 días, el microcosmo BHP mantuvo su valor máximo (no mostrado) mientras que OHP y MezHP mostraron un descenso gradual en la población BH. Respecto a los microcosmos sin bioestimar, O se mantuvo

constante alrededor del valor inicial; en cambio B y Mez mostraron un descenso significativo de las BH.

La evolución de los recuentos de BDH hasta los 48 días se puede observar en la Figura V.3. Todos los microcosmos bioestimulados con harina de pescado aumentaron los valores de BDH hasta dos órdenes de magnitud por sobre los microcosmos sin bioestimar ($p < 0.01$), manteniéndose durante los 50 días. Respecto a los microcosmos no bioestimulados, en el microcosmo Mez se observó un marcado efecto inhibitorio sobre la población BDH durante los primeros 6 días del ensayo ($p < 0.01$). Este efecto fue revertido entre los 13 y 48 días, donde se registra un aumento de la población degradadora. En los microcosmos B y O, se observaron valores de BDH aproximadamente constantes. Entre los 48 y los 263 días, sólo el microcosmo BHP mantuvo los recuentos hasta el final del ensayo, en cambio en OHP y MeHP se observó un paulatino descenso en los recuentos. En los microcosmos no bioestimulados se apreció un descenso de los recuentos de BDH.

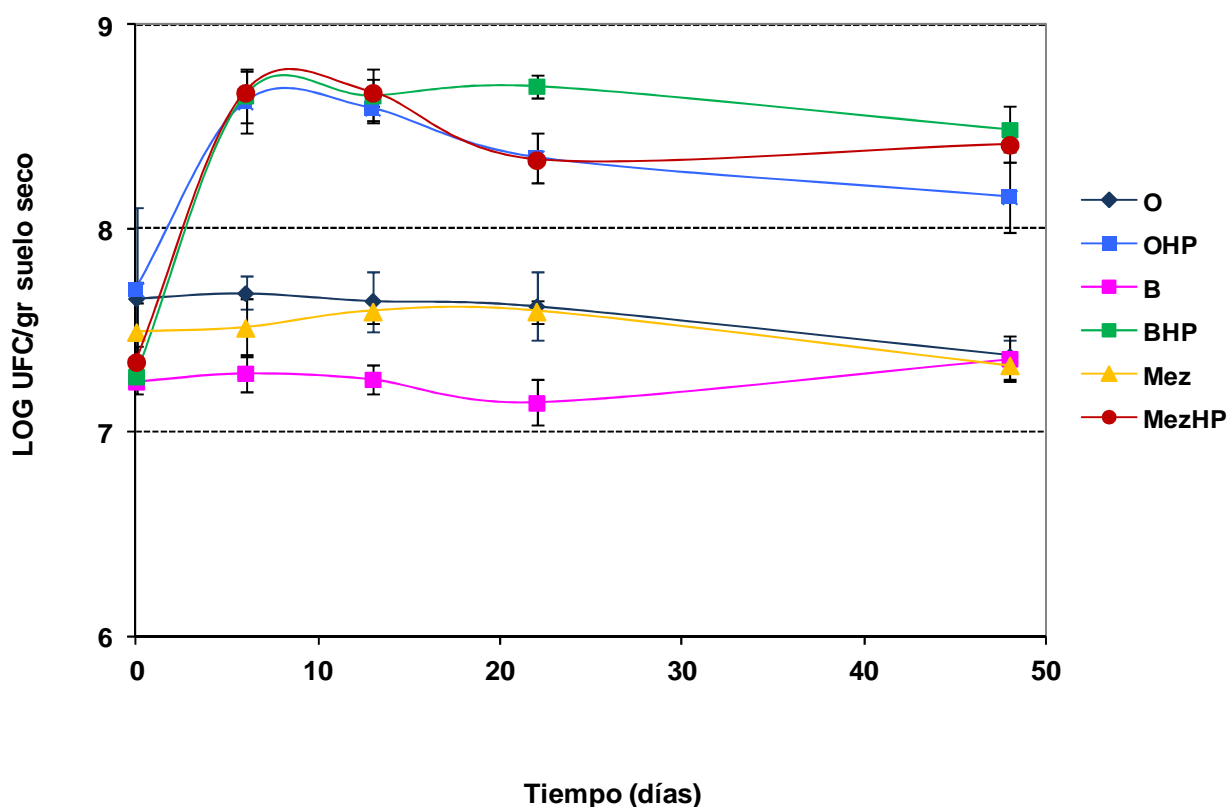


Figura V.2 Evolución de los recuentos de bacterias heterótrofas (BH) en los microcosmos evaluados a los distintos tiempos de muestreo. Las barras representan la DS de triplicados.

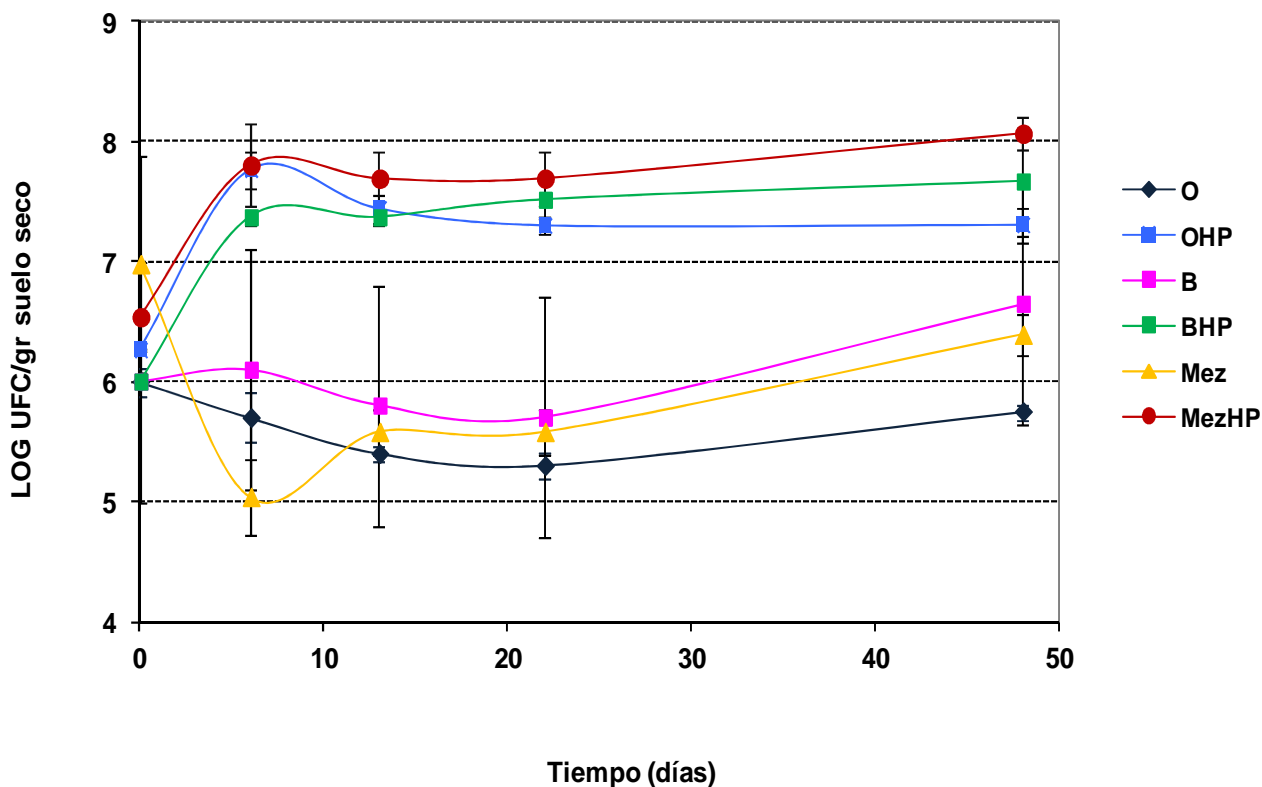


Figura V.3. Evolución de los recuentos de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) en los microcosmos evaluados a los distintos tiempos de muestreo. Las barras representan la DS de triplicados.

Las Figuras V.4 y V.5 muestran la evolución de los recuentos de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH), bacterias heterótrofas (BH) y actividad deshidrogena de los microcosmos Mez y MezHP, respectivamente. En el microcosmo Mez, los recuentos de BH se mantuvieron invariables a lo largo del ensayo, sin embargo los recuentos de BDH mostraron una inhibición del crecimiento de 1.10^7 UFC/g a 1.10^5 UFC/g a la semana de incubación. Luego se observó una recuperación del crecimiento hasta el día 48 (1.10^6 UFC/g), acompañada por una mayor actividad deshidrogenasa. Durante este ascenso, la actividad deshidrogenasa se estabilizó en los valores iniciales hasta el día 50. Luego, tanto la actividad deshidrogenasa como la población BDH descendieron. La población BDH no recuperó el valor determinado al día 0, durante los 263 días de tratamiento.

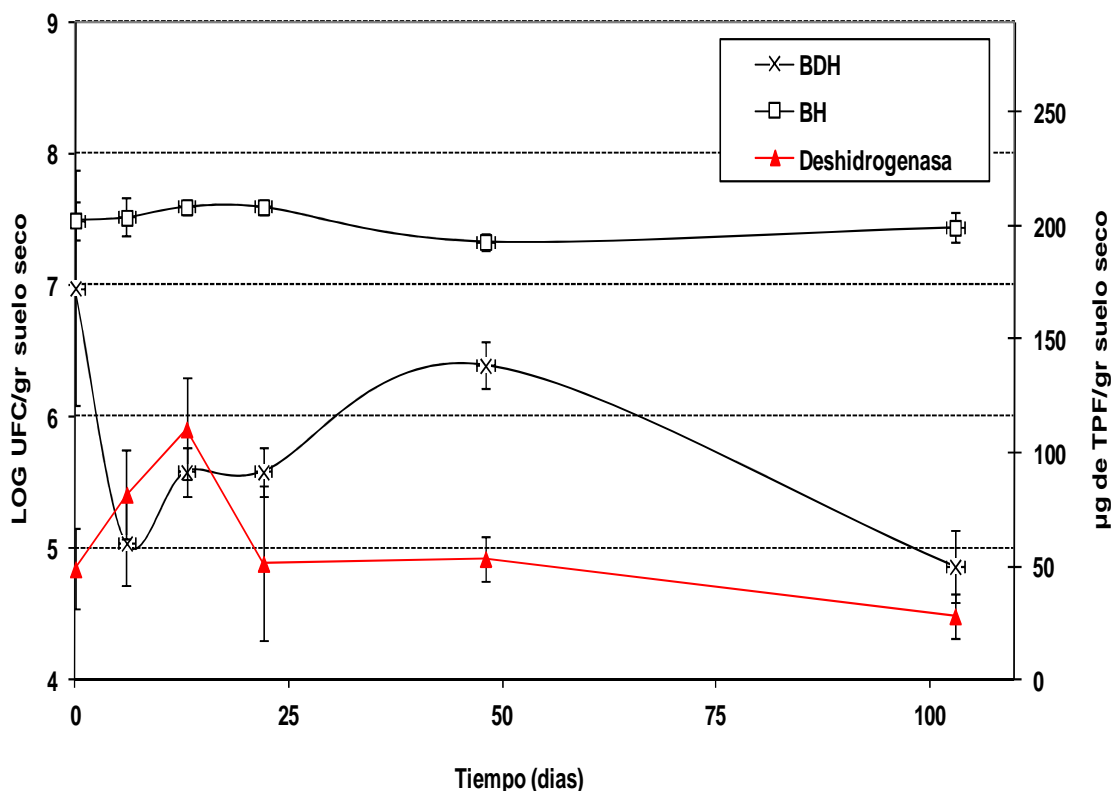


Figura V.4. Evolución de los recuentos de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH), bacterias heterótrofas (BH) y actividad deshidrogenasa del microcosmo Mez durante los distintos tiempos de muestreo. Las barras representan la DS de triplicados.

La bioestimulación con harina de pescado en el suelo Mez (MezHP) produjo un aumento de la actividad biológica hasta el día 6, luego se observó una disminución gradual hasta alcanzar, al día 22, la mitad de la actividad inicial. Este valor se mantuvo hasta finalizar el ensayo. Dicho aumento fue acompañado por un incremento en las poblaciones cultivables BH y BDH, durante los primeros 50 días, se observó luego de este periodo una lenta disminución de las BDH al valor inicial.

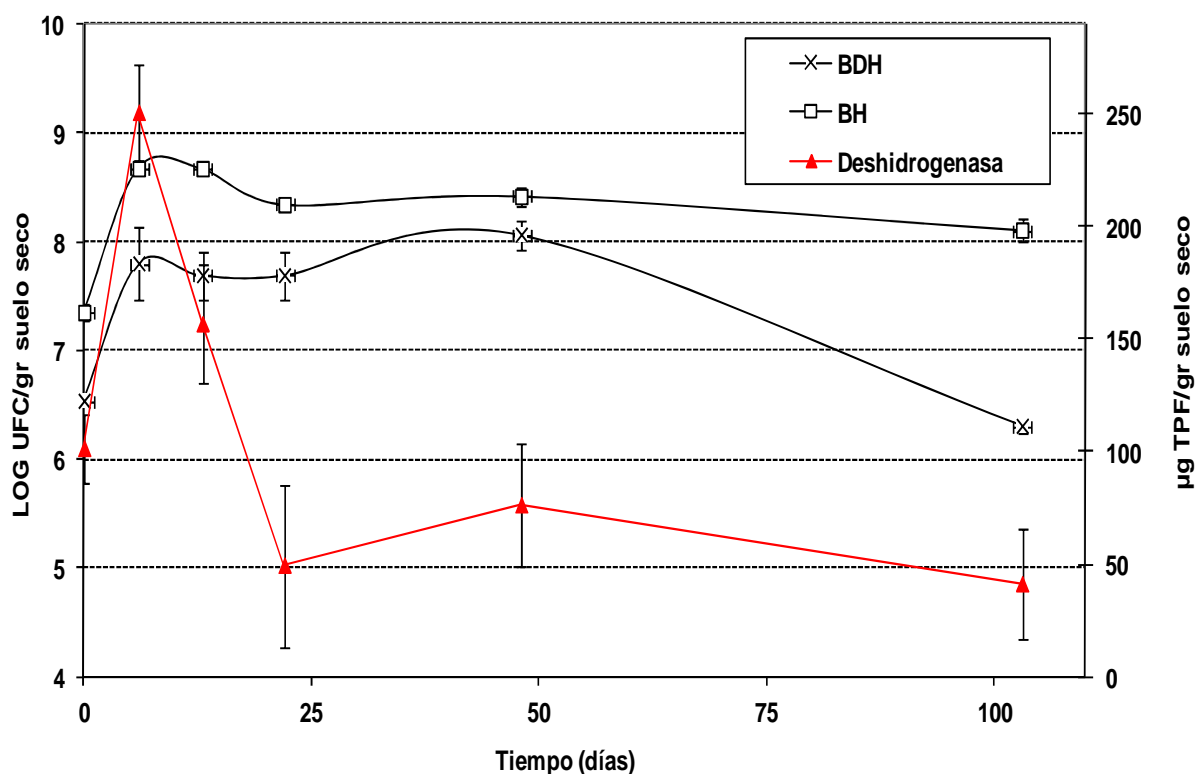


Figura V.5. Evolución de los recuentos de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH), bacterias heterótrofas (BH) y actividad deshidrogenasa del microcosmo MezHP durante los distintos tiempos de muestreo. Las barras representan la DS de triplicados.

V.B.3. Eliminación de hidrocarburos totales del suelo

En la Figura V.6 se muestra el valor a tiempo inicial (t_0) de HT (determinados por GC) y los valores obtenidos de los distintos microcosmos al final del ensayo (263 días), expresados como mg/kg de hidrocarburos totales en suelo seco.

Debe resaltarse el alto valor de remoción observado en los microcosmos O (75,5 %) y OHP (73,5 %) a los 263 días de ensayo, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) respecto al t_0 . En el resto de los microcosmos no se observó una eliminación de HT estadísticamente significativa en el periodo ensayado.

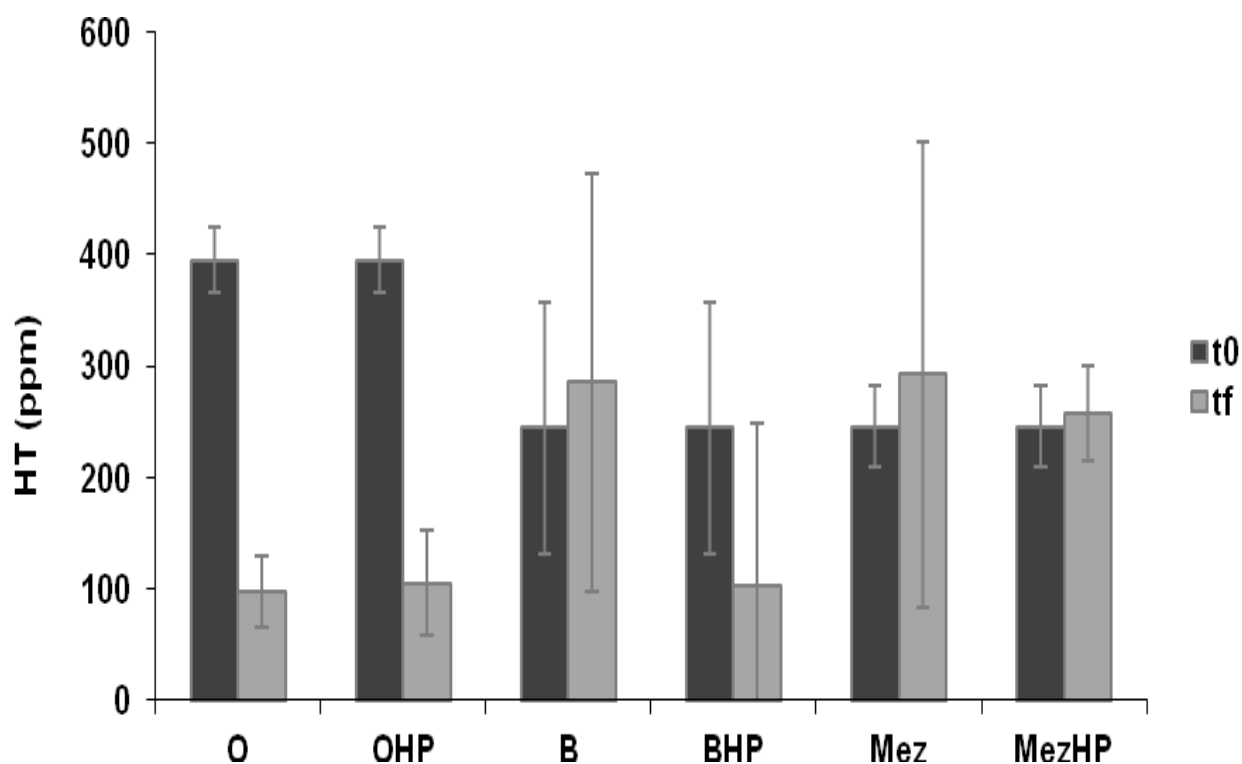


Figura V.6. Hidrocarburos totales (mg/kg) a t0 (barras color verde oscuro) y 263 días (tf, barras color verde claro) determinados en los diferentes microcosmos. Las barras representan la DS de triplicados.

V.B.4. Dinámica de las comunidades bacterianas

V.B.4.1. Análisis de la estructura de la comunidad por DGGE

Con el objetivo de analizar la estructura de la comunidad bacteriana presente bajo las diferentes condiciones planteadas en el ensayo, se realizó una PCR-DGGE de cada microcosmo a los 0, 5 y 48 días (Figuras V.7.a y b). Se eligieron estos tiempos de muestreo debido a que representaron el periodo de mayor actividad del sistema (tanto de actividad deshidrogenasa como de poblaciones cultivables de BH y BDH).

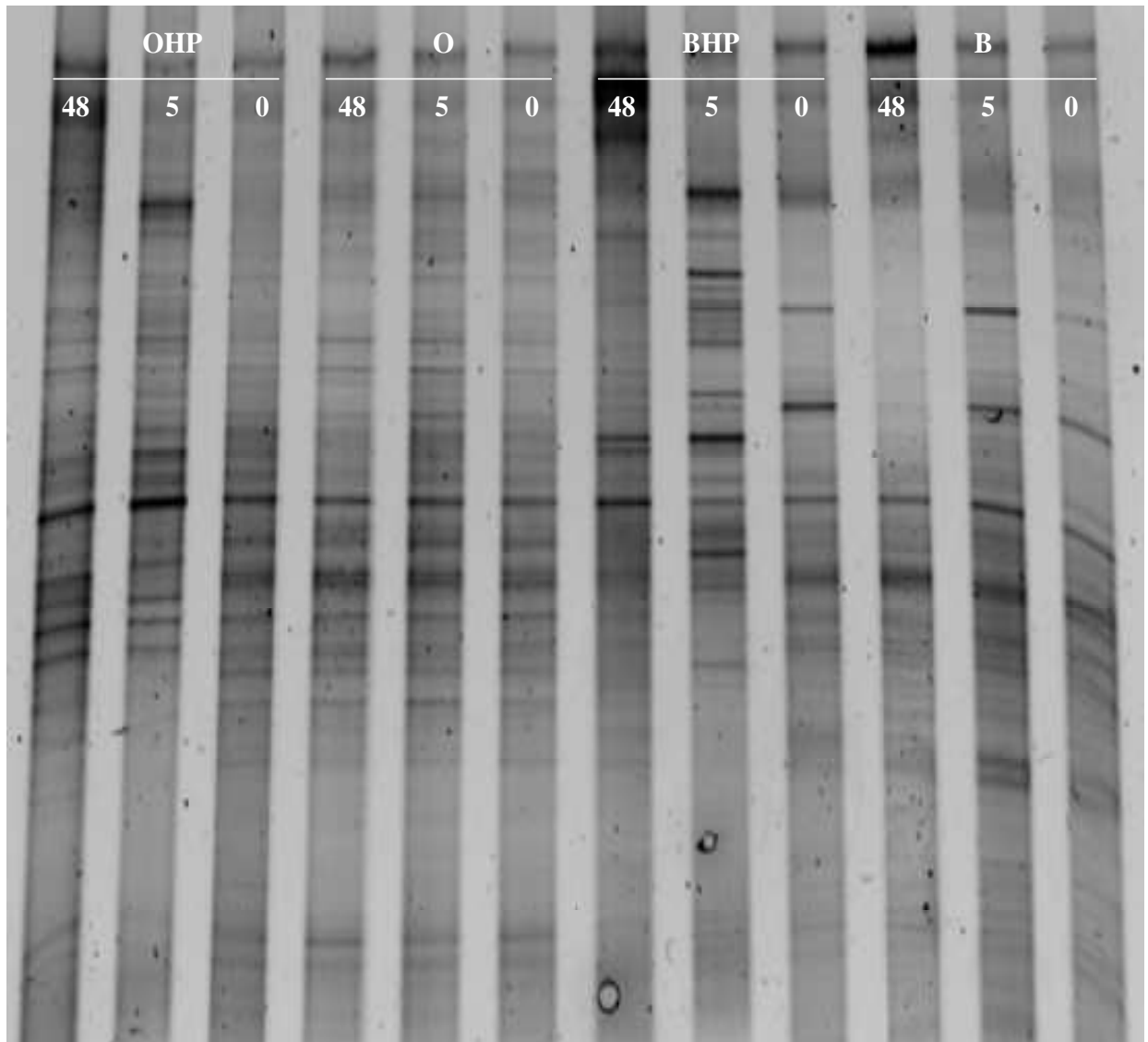


Figura V.7.a. Gel de DGGE (urea-formamida del 35-65%) correspondiente a los sistemas O, OHP, B y BHO al inicio y a los 5 y 48 días de estudio. Se utilizó la muestra BHP0 como patrón de corrida.

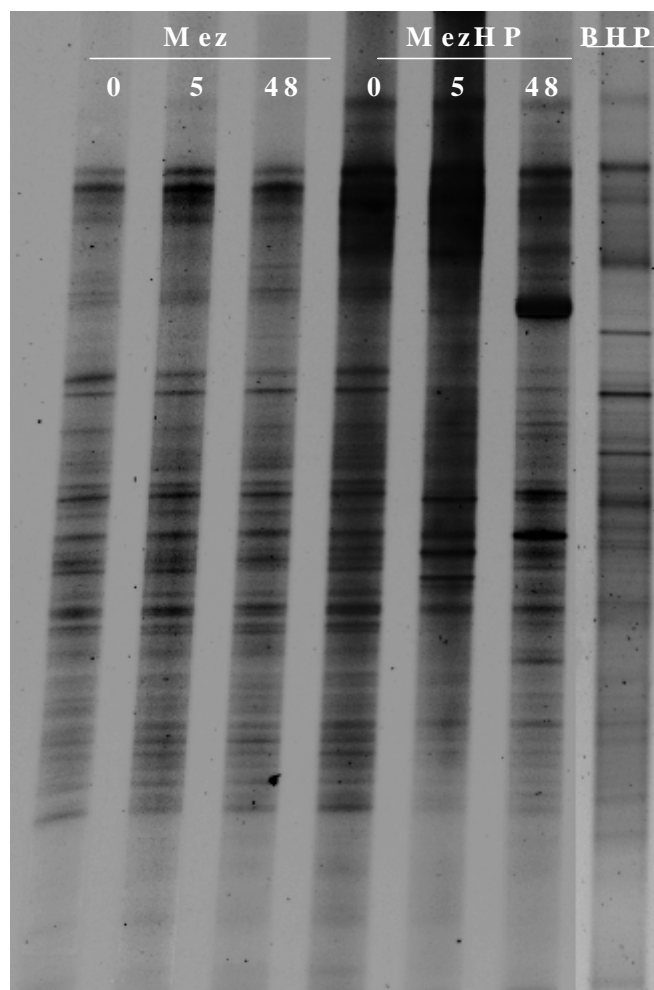


Figura V.7.b. Gel de DGGE (urea-formamida del 35-65%) correspondiente a los sistemas Mez y MezHP al inicio y a los 5 y 48 días de estudio. Se utilizó la muestra BHP0 como patrón de corrida.

El dendrograma obtenido a partir del análisis de los perfiles de bandas de los mencionados geles de DGGE se muestra en la Figuras V.8 a y b.

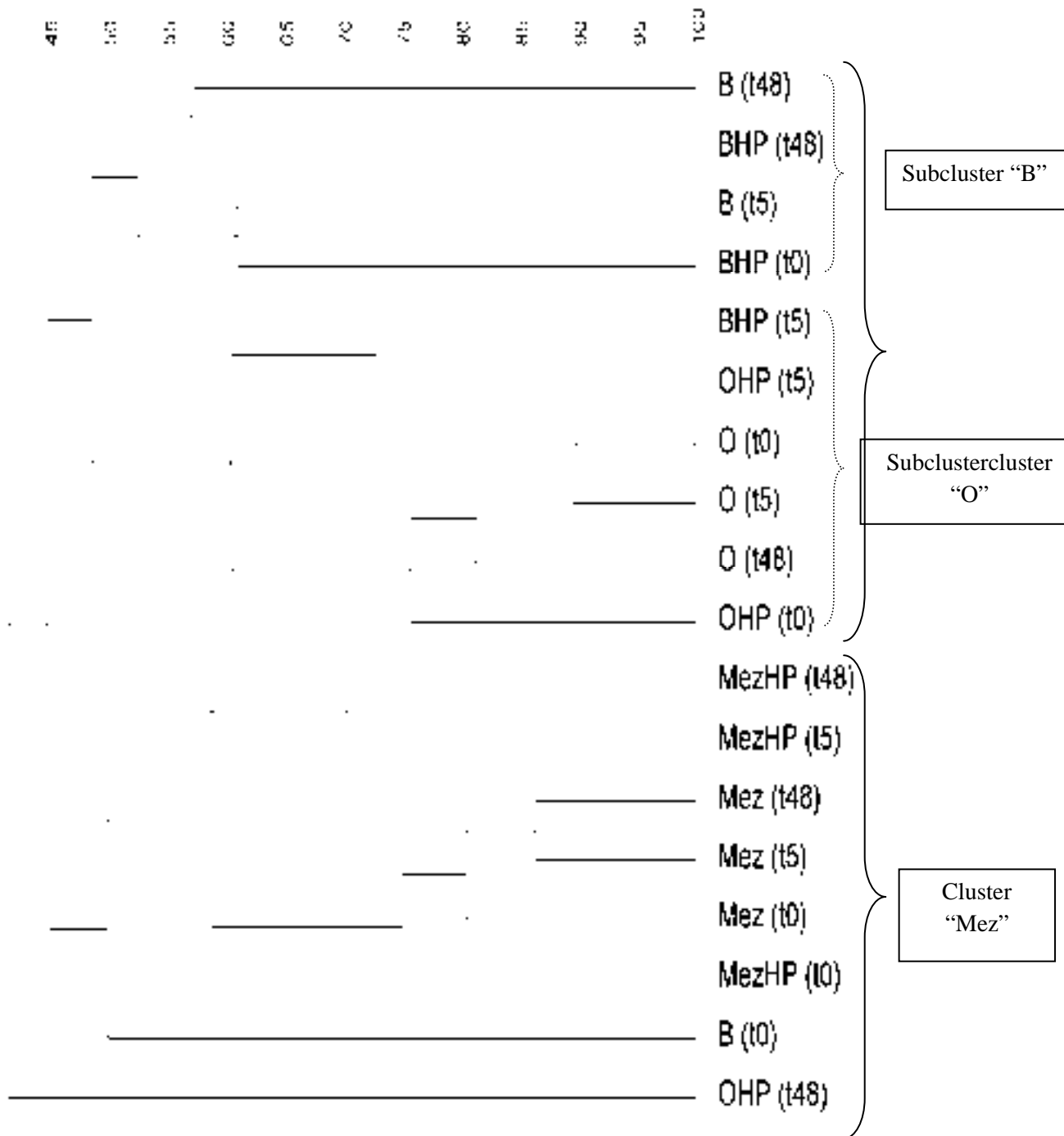


Figura V.8.a. Dendrograma de todos los microcosmos con sus respectivos tiempos de muestreo (0, 5 y 48 días). Los clusters obtenidos fueron señalados con llaves punteadas.

Puede observarse claramente la formación de dos clusters: uno formado por B, BHP, O y OHP y el otro formado por Mez y MezHP (Cluster Mez). A su vez, B y BHP se agruparon aparte (Subcluster B) de los microcosmos O y OHP (Subcluster O). Del análisis del dendrograma puede mencionarse que:

- La agrupación de las muestras del microcosmo Mez en un cluster evidencia el fuerte efecto causado por la mezcla de dos tierras distintas sobre las comunidades bacterianas. No se observaron cambios relevantes en la dinámica de las comunidades de este microcosmo (similitud mayor al 80 %). La bioestimulación con harina de pescado provocó cambios en las comunidades bacterianas en Mez a partir del día 5.
- En el subcluster O no se observaron cambios relevantes (porcentaje de similitud mayores al 80 %) en las comunidades bacterianas. En cambio, cuando se lo bioestimuló con harina de pescado se observaron cambios en las comunidades a partir del día 5.
- El microcosmo B al t0 se agrupó en el mismo cluster que el microcosmo Mez, en cambio O a t0 no mostró el mismo resultado, lo que confirma que Mez tiene comunidades bacterianas en común mayormente con B. Este resultado era esperable debido a que el microcosmo Mez contenía más tierra de Barrio Mosconi que de Canal Oeste. Por último, la bioestimulación con harina de pescado en el microcosmo B generó cambios en las comunidades bacterianas durante todo el ensayo.

El dendrograma obtenido a partir del análisis de los perfiles de bandas de las muestras Mez, B y O al inicio del ensayo (t0) se muestra en la Figura V.8.b. Se observó que Mez se agrupó con B en el mismo cluster con un porcentaje de similitud del 60 %. O, por su parte, se ubicó fuera del cluster y mostró sólo un 48 % de similitud con Mez y B. Este resultado muestra la mayor similitud entre Mez y B, lo cual está de acuerdo con la mayor proporción de B utilizada en la preparación de la muestra.

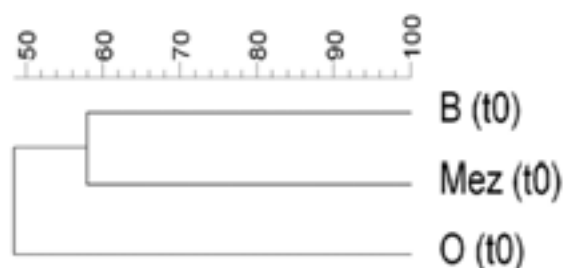


Figura V.8.b. Dendrograma de los microcosmos Mez, B y O al inicio (t0) del ensayo.

V.B.4.2. Análisis filogenético

A partir de los geles de DGGE de las Figuras V.7.a y b, se obtuvo una nueva imagen normalizada (Figura V.9) que muestra todos los microcosmos a los 0, 5 y 48 días de ensayo junto a las bandas secuenciadas señaladas con números. Se realizó la clonación y posterior secuenciación de los microcosmos con harina de pescado (OHP, BHP y MezHP) a t0 y t48, debido a que estos microcosmos fueron los únicos que mostraron un aumento y posterior mantenimiento de las poblaciones cultivables de BH y BDH en ese periodo del ensayo. Para el análisis de la dinámica de las poblaciones (bandas) en las diferentes comunidades (calles) se consideró que, bandas ubicadas en igual posición en el gel de DGGE (pertenecientes a un mismo microcosmo) pertenecen a la misma OTU (Unidad Taxonómica operacional) o filotipo.

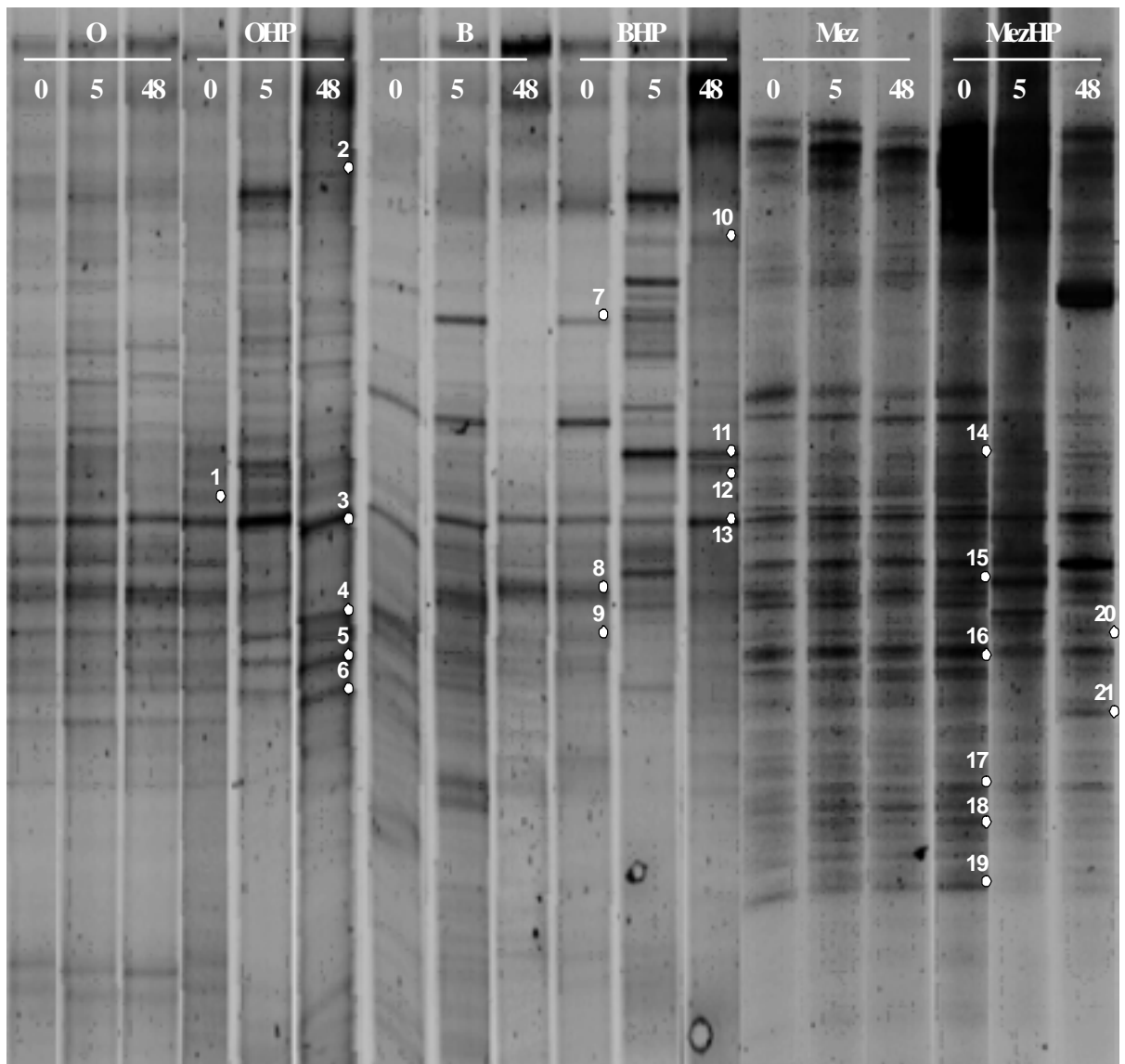


Figura V.9. Imagen construida con todos los geles de DGGE (normalizada por el programa GelComparII) obtenidos para los diferentes microcosmos al inicio y a los 5 y 48 días de estudio. Los círculos pequeños con números señalan las bandas secuenciadas numeradas de 1 a 21.

En la Tabla V.2 se describe, para cada banda secuenciada (señalada con números del 1 al 21 en la Figura V.9), la afiliación taxonómica de la secuencia relacionada con mayor homología en base a los porcentajes de máxima identidad según el Gen Bank.

Tabla V.2. Descripción de la afiliación taxonómica de la secuencia más relacionada (en base al porcentaje de similitud) a las bandas secuenciadas (bandas 1 a 21) junto a su código de acceso al Gen Bank. Se muestra el origen de aislamiento de las mencionadas secuencias relacionadas.

Banda	Secuencia relacionada (N° de acceso)	% de similitud	Origen de aislamiento
1	uncultured gamma proteobacterium (HQ111588.1)	96	residuos de una mina de uranio
2	uncultured Sphingobacteriales bacterium (AM934931.1)	98	proceso de biorremediación a escala piloto de un suelo contaminado con hidrocarburos alifáticos
3	uncultured Acidobacteria bacterium (EF073011.1)	99	suelo agrícola
4	Uncultured gamma proteobacterium (EF664293.1)	98	suelo agrícola
5	Streptomyces sp. G3_3 (JN020523)	95	suelo
6	uncultured Acidobacteriaceae bacterium (HM438239.1)	99	suelo contaminado con antraceno
7	Hydrocarboniphaga sp. DG1192 (EU052753.1)	98	suelo alcalino salino contaminado con hidrocarburos
8	uncultured Alcaligenaceae bacterium (AM935974.1)	100	proceso de biorremediación a escala piloto de un suelo contaminado con hidrocarburos alifáticos
9	Uncultured Acidobacteria bacterium (GQ120636.1)	98	rizósfera de planta crecida en suelos con metales pesados
10	Pontibacter sp. HYL7-15 (HQ223078.2)	99	suelo de un bosque
11	uncultured Acidobacteria bacterium (JF988907.1)	99	suelo agrícola
12	Steroidobacter sp. ZUMI 37 (AB548216.1)	98	suelos tratados con biosólidos
13	uncultured Pseudomonadales bacterium (FJ889290.1)	99	suelo agrícola
14	uncultured Rubrivivax sp. (EU298774.1)	98	suelo agrícola, Kansas, EEUU
15	uncultured Firmicutes bacterium (EF664720.1)	98	suelo agrícola
16	uncultured Burkholderiales bacterium (EU449563.1)	99	suelo agrícola
17	Uncultured delta proteobacterium (FM877539.1)	99	suelo contaminados con hidrocarburos alifáticos
18	uncultured Nitrosomonadaceae bacterium (EF020008.1)	99	rizósfera de álamo
19	Uncultured Acidobacteria bacterium (HM062005.1)	98	suelos agrícolas
20	Uncultured Lysobacter sp. (AM935900.1)	99	suelo contaminados con hidrocarburos alifáticos
21	Uncultured Nitrosomonadaceae bacterium (EF018502.1)	97	suelo agrícola

Del análisis de las afiliaciones taxonómicas de las bandas secuenciadas en los microcosmos del suelo de Canal Oeste, pudo observarse la presencia en O y OHP de miembros de la familia *Acidobacteriaceae* (filum Acidobacteria), del género *Streptomyces sp.* (filum Actinobacteria) y de la clase *Gammaproteobacteria* (filum Proteobacteria) durante todo el ensayo. El orden *Sphingobacteriales* (filum Bacteroidetes) fue detectado sólo en O a t0 y en OHP a t48.

En los microcosmos del suelo del Barrio Mosconi, pudo detectarse la presencia en B y BHP, del género *Hydrocarboniphaga sp.* (filum Proteobacteria) solo durante los primeros días de ensayo (t0 y 5). Miembros de la familia *Alcaligenaceae* del mismo filum fue hallada sólo al inicio del ensayo también en B y BHP. El filum Acidobacteria sólo fue detectado al inicio del ensayo en el microcosmo con harina de pescado BHP. Miembros del género *Pontibacter sp.* (filum Actinobacteria) fue hallado en el t5 y t48 también en BHP. Los ordenes *Xanthomonadales* (género *Steroidobacter sp.*) y *Pseudomonadales* (filum *Proteobacteria*), fueron detectados al final del ensayo en el microcosmo BHP.

Por último, en los microcosmos de la mezcla de los dos suelos fueron hallados en Mez y MezHP, miembros del filum *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria* (*Lysobacter sp.*), *Betaproteobacteria* (familias *Nitrosomonadaceae* y *Burkholderiaceae*, género *Rubrivivax sp.*) y *Deltaproteobacteria* durante todo el ensayo. Miembros del filum *Firmicutes* fueron hallados únicamente en los microcosmos MezHP durante todo el ensayo y el filum Acidobacteria sólo fue detectado en Mez durante todo el ensayo y en MezHP al inicio del mismo.

Tabla V.3. Clasificación taxonómica de las secuencias relacionadas a las bandas secuenciadas. En negrita se indica el tiempo de muestreo (0 ó 48) en que se obtuvo la banda secuenciada. Entre paréntesis se indica el tiempo de muestreo donde se infiere la afiliación taxonómica de la banda observada, por comigración con la banda secuenciada en el mismo microcosmo.

Banda	Detección de la banda	Filum	Clase	Orden	Familia	Género
1	O(t0, 5 y 48) OHP t0 (t5 y 48)	Proteobacteria	<i>γ-proteobacteria</i>			
2	O (t0); OHP t48	Bacteroidetes	<i>Sphingobacteria</i>	<i>Sphingobacteriales</i>		
3	O(t0, 5 y 48) y OHP t48 (t0, 5)	Acidobacteria				
4	OHP t48	Proteobacteria	<i>γ-proteobacteria</i>			
5	O (t0 y 48) y OHP t48 (t0, 5)	Actinobacteria	<i>Actinomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	
6	O (t0, 5 y 48); OHP t48 (t0, 5)	Acidobacteria	<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriales</i>	<i>Acidobacteriaceae</i>	
7	B (t0 y 5) y BHP t0 (t5)	Proteobacteria	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Sinobacteraceae</i>	
8	B (t0) y BHP t0	Proteobacteria	<i>β-proteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	
9	BHP t0 (t48)	Acidobacteria				
10	BHP t48 (t5)	Bacteroidetes	<i>Cytophagia</i>	<i>Cytophagales</i>	<i>Cytophagaceae</i>	<i>Pontibacter</i>
11	BHP t48 (t5)	Acidobacteria				
12	BHP t48	Proteobacteria	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Sinobacteraceae</i>	
13	BHP t48 (t5)	Proteobacteria	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>		
14	Mez (t0, 5 y 48) y MezHP t0 (t5 y 48)	Proteobacteria	<i>β-proteobacteria</i>			
15	MezHP t0 (5 y 48)	Firmicutes				
16	Mez (t0, 5 y 48) y MezHP t0 (t5 y 48)	Proteobacteria	<i>β-proteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>		
17	Mez (t5 y 48) y MezHP t0 (t5 y 48)	Proteobacteria	<i>δ-proteobacteria</i>			
18	Mez (t0, 5 y 48) y MezHP t0	Proteobacteria	<i>β-proteobacteria</i>	<i>Nitrosomonadales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	
19	Mez (t0, 5 y 48) y MezHP t0	Acidobacteria				
20	Mez (t0, 5 y 48) y MezHP t48 (t0)	Proteobacteria	<i>γ-proteobacteria</i>	<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Lysobacter</i>
21	MezHP t48	Proteobacteria	<i>β-proteobacteria</i>	<i>Nitrosomonadales</i>	<i>Nitrosomonadaceae</i>	

V.C. Microcosmos de suelo Polo petroquímico La Plata-Ensenada (II)

Del análisis de los resultados obtenidos en la sección anterior en el microcosmo Mez, especialmente al tratar la mezcla de tierras, pudo apreciarse un significativo aumento inicial de la actividad biológica, un ligero ascenso de la población heterótrofa, pero una disminución significativa en la evolución de la población degradadora de HT durante la primera semana de tratamiento. Este efecto de inhibición no fue apreciado cuando el microcosmo Mez fue estimulado con HP, detectándose una significativa estimulación de ambas poblaciones cultivables y de la actividad biológica.

Así mismo, del análisis de la estructura de las comunidades bacterianas (PCR-DGGE) pudo apreciarse una mayor dinámica durante el tratamiento en el microcosmos MezHP, en comparación con la dinámica observada en el microcosmos Mez.

En función de lo observado, se planteó un segundo experimento en microcosmos (frascos de 1000 cm³) con el objetivo de evaluar el efecto de la aplicación de HP en comparación con otras alternativas de estimulación como la aplicación de sales inorgánicas y de NPK. Así mismo se estudio el efecto combinado con el surfactante Brij700[®]. Los microcosmos planteados fueron: Mez (mezcla de las tierras O y B), SI (tierra Mez con harina de pescado), SIB (tierra Mez con harina de pescado y Brij700[®]), HP (tierra Mez con harina de pescado) y HBP (tierra Mez con harina de pescado y Brij700[®]).

V.C.1. Actividad microbiana deshidrogenasa

La Figura V.10 muestra la evolución de la actividad deshidrogenasa en los diferentes microcosmos durante el ensayo. Durante los primeros 4 días de ensayo, sólo los microcosmos suplementados con harina de pescado, HP y HPB, exhibieron un aumento en forma significativa de la actividad deshidrogenasa, en comparación con el resto de los microcosmos ($p > 0.001$). Luego de este periodo, se observó una disminución de la actividad en forma gradual hasta finalizar el ensayo. El resto de los microcosmos no mostró variaciones significativas durante todo ensayo.

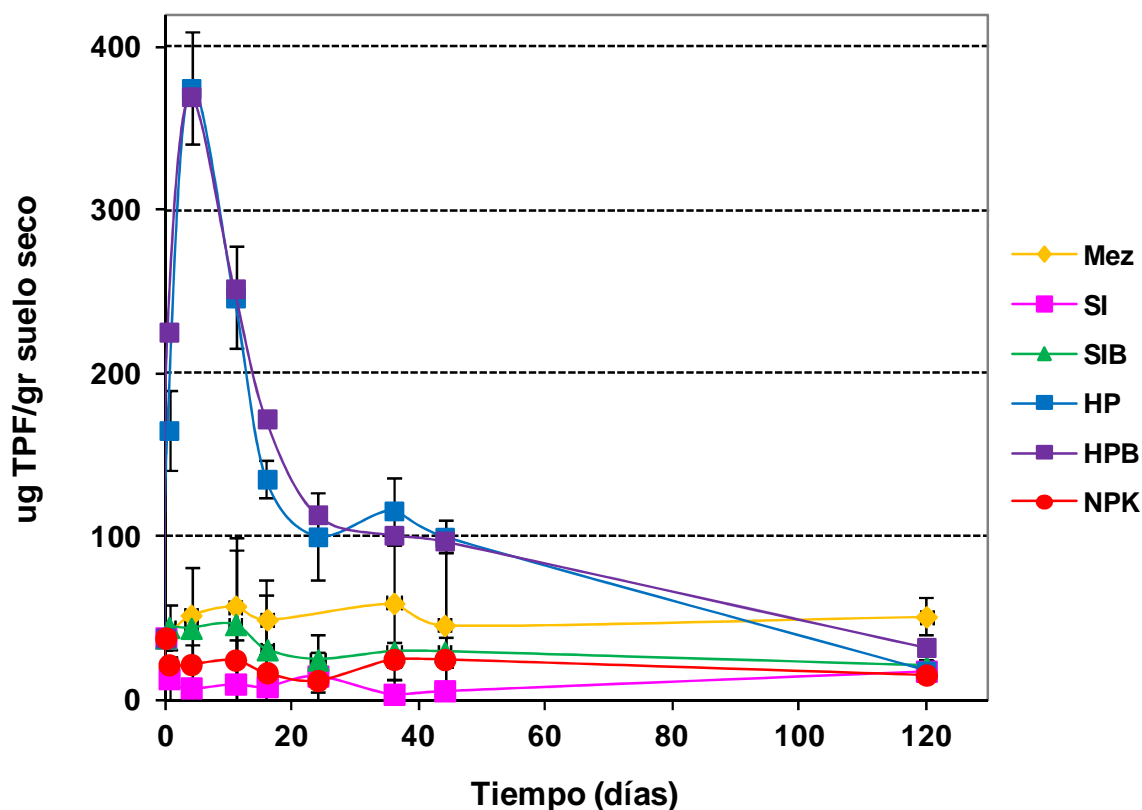


Figura V.10. Actividad deshidrogenasa de cada microcosmo estudiado durante los 120 días de ensayo. Las barras representan la DS de triplicados.

V.C.2. Evolución de las poblaciones cultivables

La evolución de las poblaciones cultivables de bacterias heterótrofas (BH) y degradadoras de hidrocarburos (BDH) en cada microcosmo se muestra en las Figuras V.11 y V.12, respectivamente, y están expresadas como unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco.

Se observó un pequeño incremento en el crecimiento de las BH solo durante los primeros 10 días en los microcosmos Mez, SI, SIB y NPK, luego se observó una disminución gradual hasta valores similares a los iniciales del ensayo. Los microcosmos HP y HPB resultaron la excepción debido a que incrementaron en forma significativa los recuentos en más de 2 órdenes de magnitud por sobre los otros microcosmos ($p < 0.001$). Particularmente, el microcosmo HPB manifestó un rápido ascenso en los primeros 5 días.

Respecto las BDH, Figura V.10, los microcosmos SI, SIB y NPK mostraron disminuciones significativas en los recuentos desde el inicio del ensayo, alcanzando valores de dos órdenes de magnitud por debajo del recuento de la mezcla de tierra inicial. Cabe señalar que el microcosmo mezcla (Mez) también exhibió este efecto inhibitorio en los recuentos de las BDH. En cambio, en los microcosmos suplementados con harina de pescado (combinada o no con Brij700[®]) se observó una estimulación en el crecimiento de las BDH de más de tres órdenes por sobre el resto de los microcosmos ($p > 0.001$) hasta los 10 días, luego descendió hasta los 48 días, manteniéndose estable hasta el final del ensayo. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los recuentos de HP y HPB.

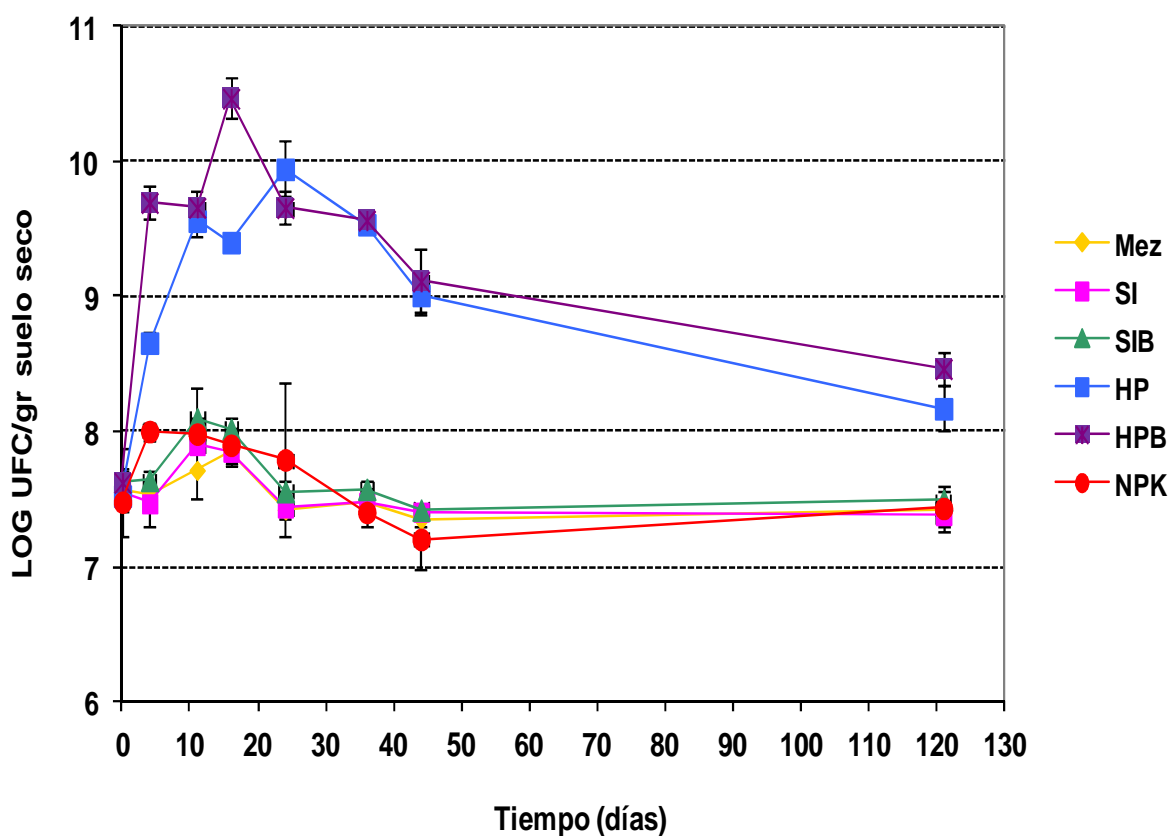


Figura V.11. Evolución de los recuentos de bacterias heterótrofas (BH) en los microcosmos evaluados a los distintos tiempos de muestreo. Las barras representan la DS de triplicados.

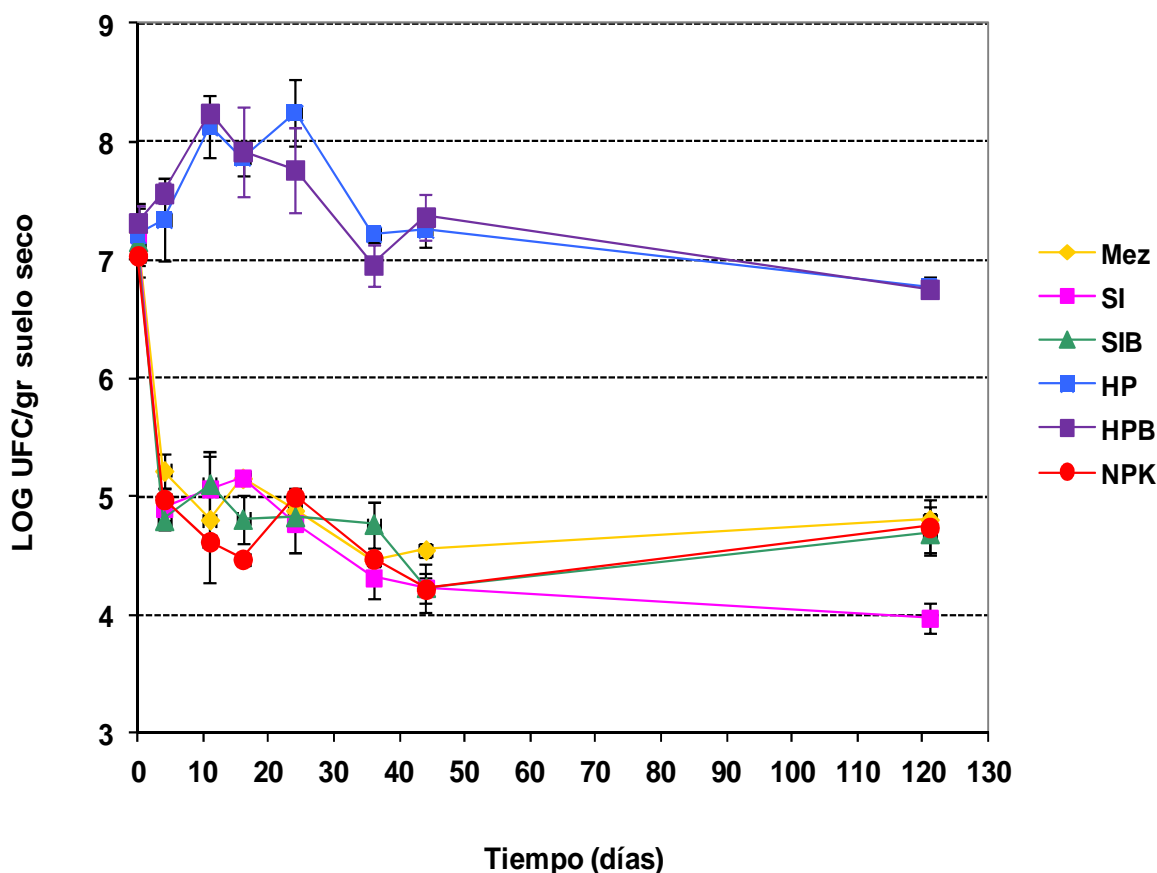


Figura V.12. Evolución de los recuentos de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) en los microcosmos evaluados a los distintos tiempos de muestreo. Las barras representan la DS de triplicados.

V.C.3. Eliminación de hidrocarburos totales del suelo

En la Figura V.16 se muestra el valor a tiempo inicial (t_0) de hidrocarburos totales (HT) determinados por IR y los valores obtenidos de los distintos microcosmos al final del ensayo (44 días), expresados como mg/kg (ppm) de hidrocarburos totales en suelo seco.

No se observó una eliminación de HT estadísticamente significativa entre los distintos microcosmos, por efecto de la aplicación de los diferentes estimulantes durante 44 días de tratamiento.

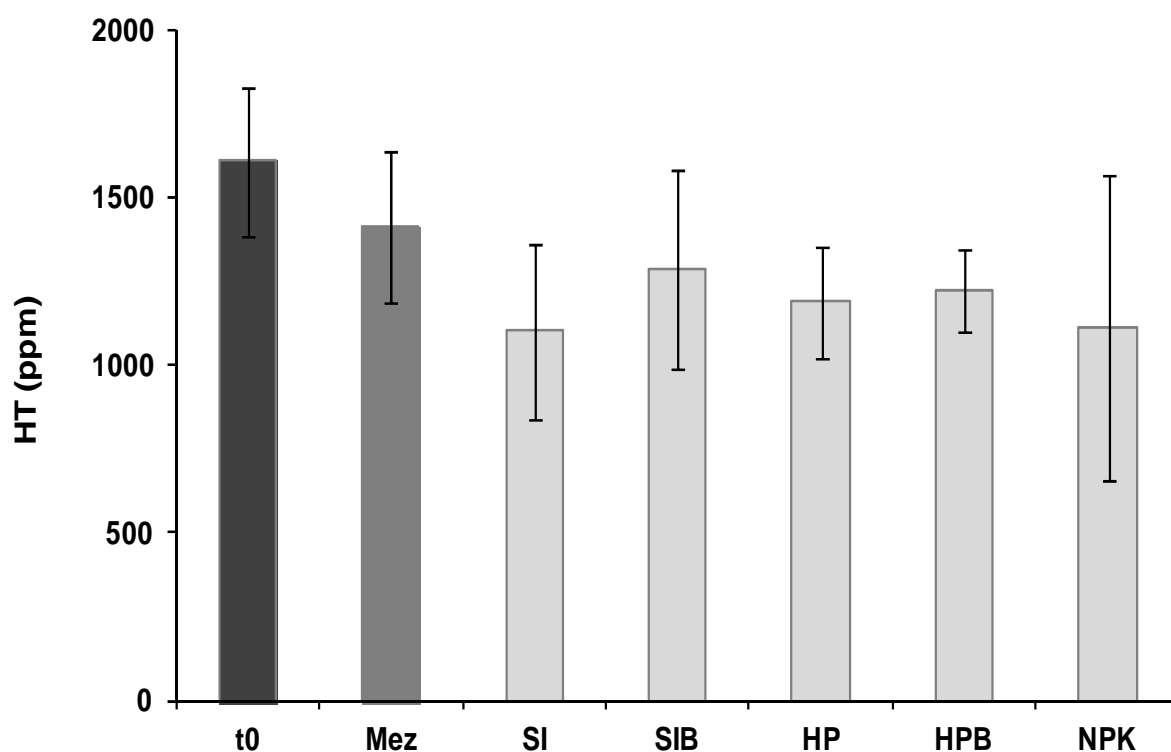


Figura V.16. Hidrocarburos totales determinados por IR a tiempo inicial (t0, barra violeta) y a los 44 días (barras verdes) para cada uno de los microcosmos. Las barras representan la DS de triplicados. Los datos son expresados en mg/kg.

V.C.4. Dinámica de las comunidades bacterianas

V.C.4.1. Análisis de la estructura de la comunidad por DGGE

Con el objetivo de analizar la estructura de la comunidad bacteriana presente bajo las diferentes condiciones planteadas en el ensayo, se realizó una PCR-DGGE de cada microcosmo a los 0, 15, 24, 44 y 121 días (Figuras V.13.a, b y c).

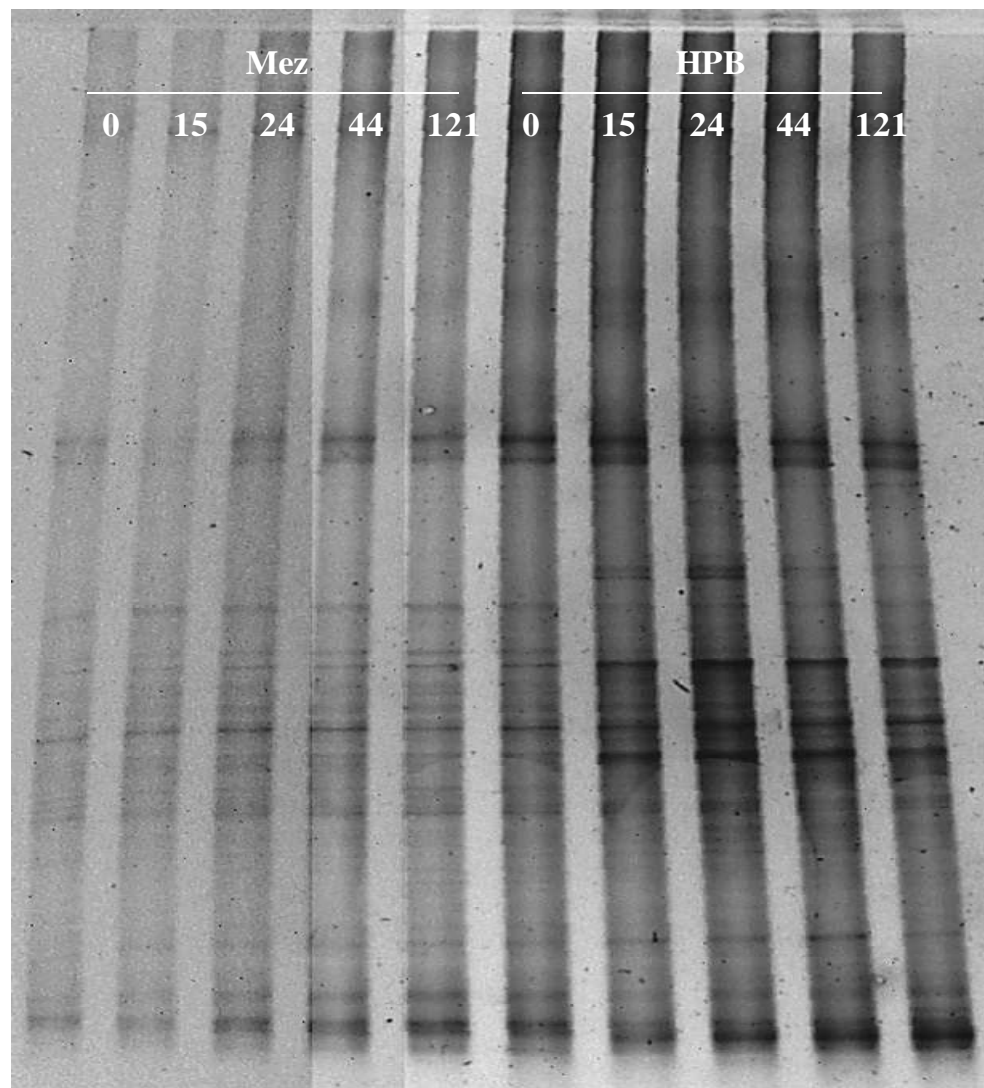


Figura V.13.a. Gel de DGGE (urea-formamida del 35-65%) correspondiente a los microcosmos Mez y HPB al inicio y a los 15, 24, 44 y 121 días de estudio.

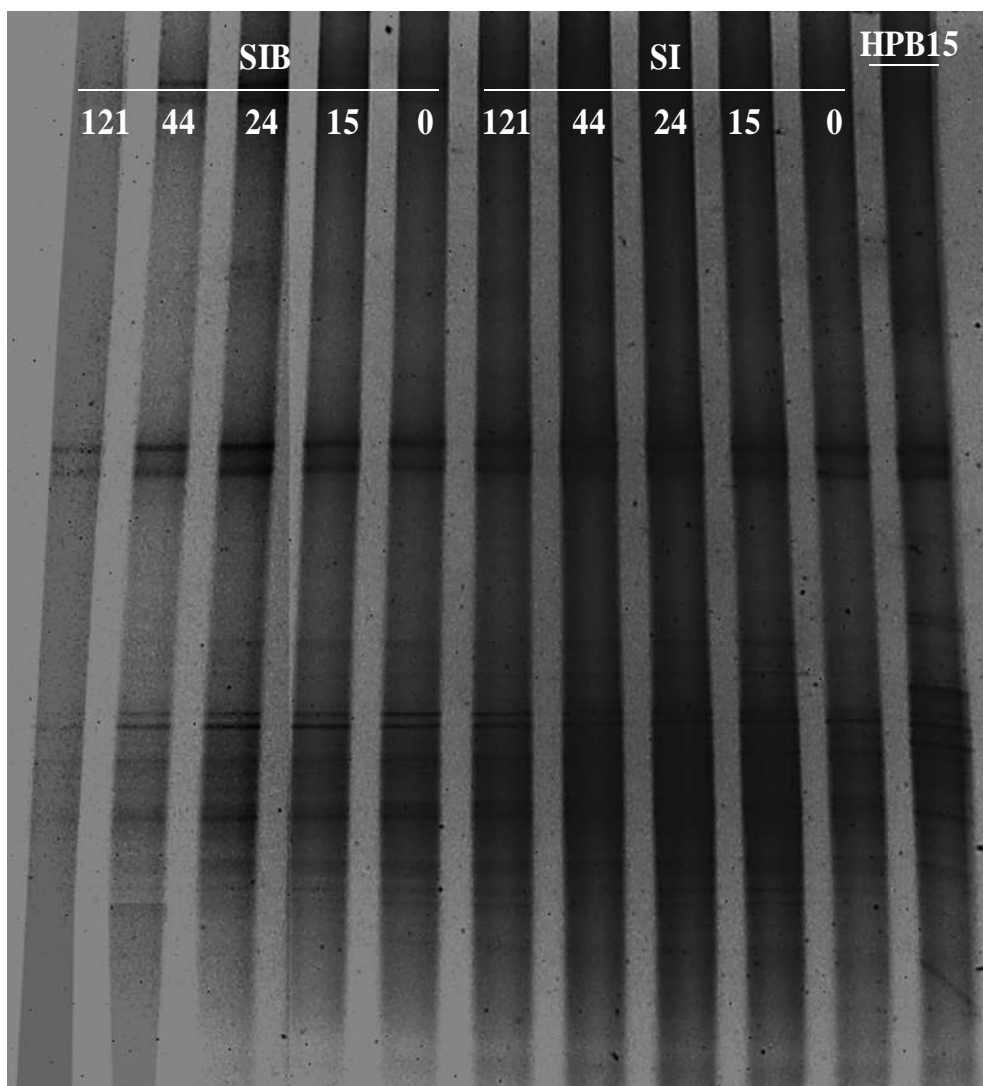


Figura V.13.b. Gel de DGGE (urea-formamida del 35-65%) correspondiente a los microcosmos SI y SIB al inicio y a los 15, 24, 44 y 121 días de estudio. Se utilizó la muestra HPB15 como patrón de corrida.

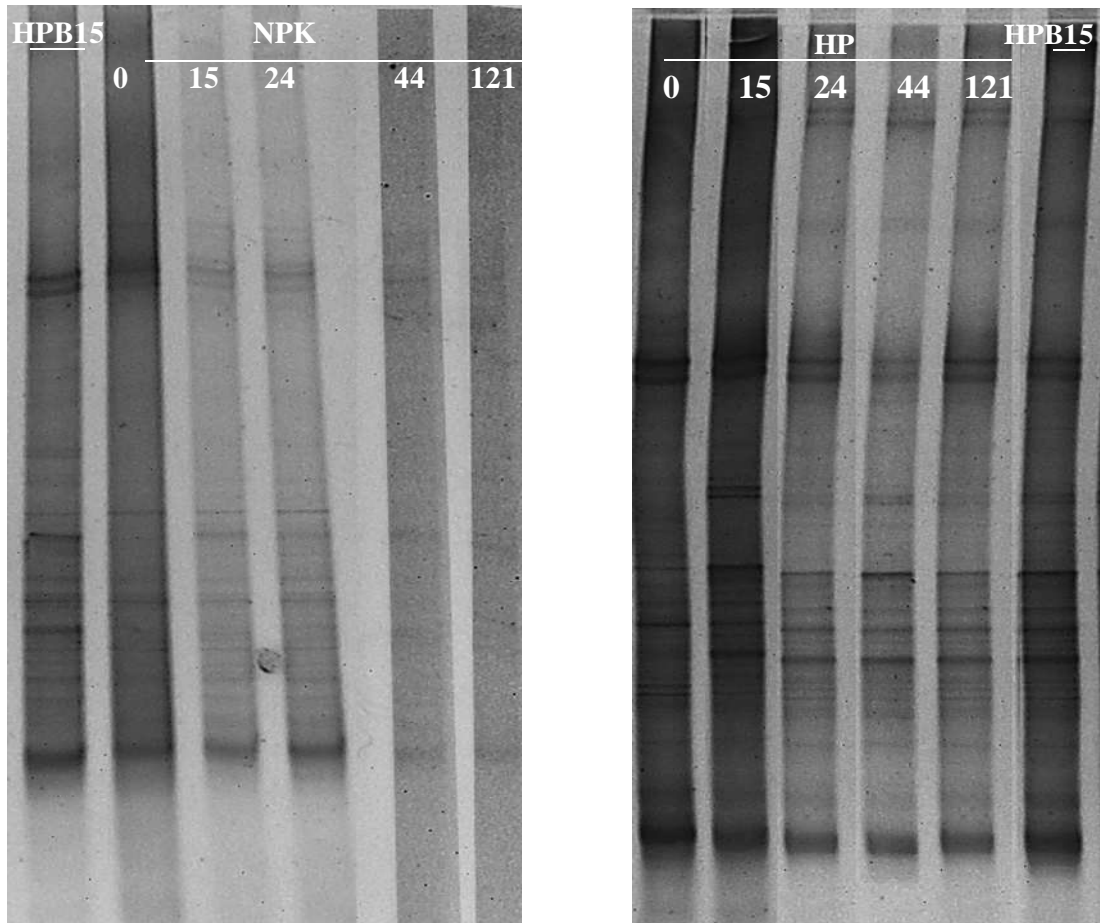


Figura V.13.c. Geles de DGGE (urea-formamida del 35-65%) correspondiente a los microcosmos NPK y HP al inicio y a los 15, 24, 44 y 121 días de estudio. Se utilizó la muestra HPB15 como patrón de corrida.

El dendrograma obtenido a partir del análisis de los perfiles de bandas del mencionado gel se muestra en la Figura V.14.

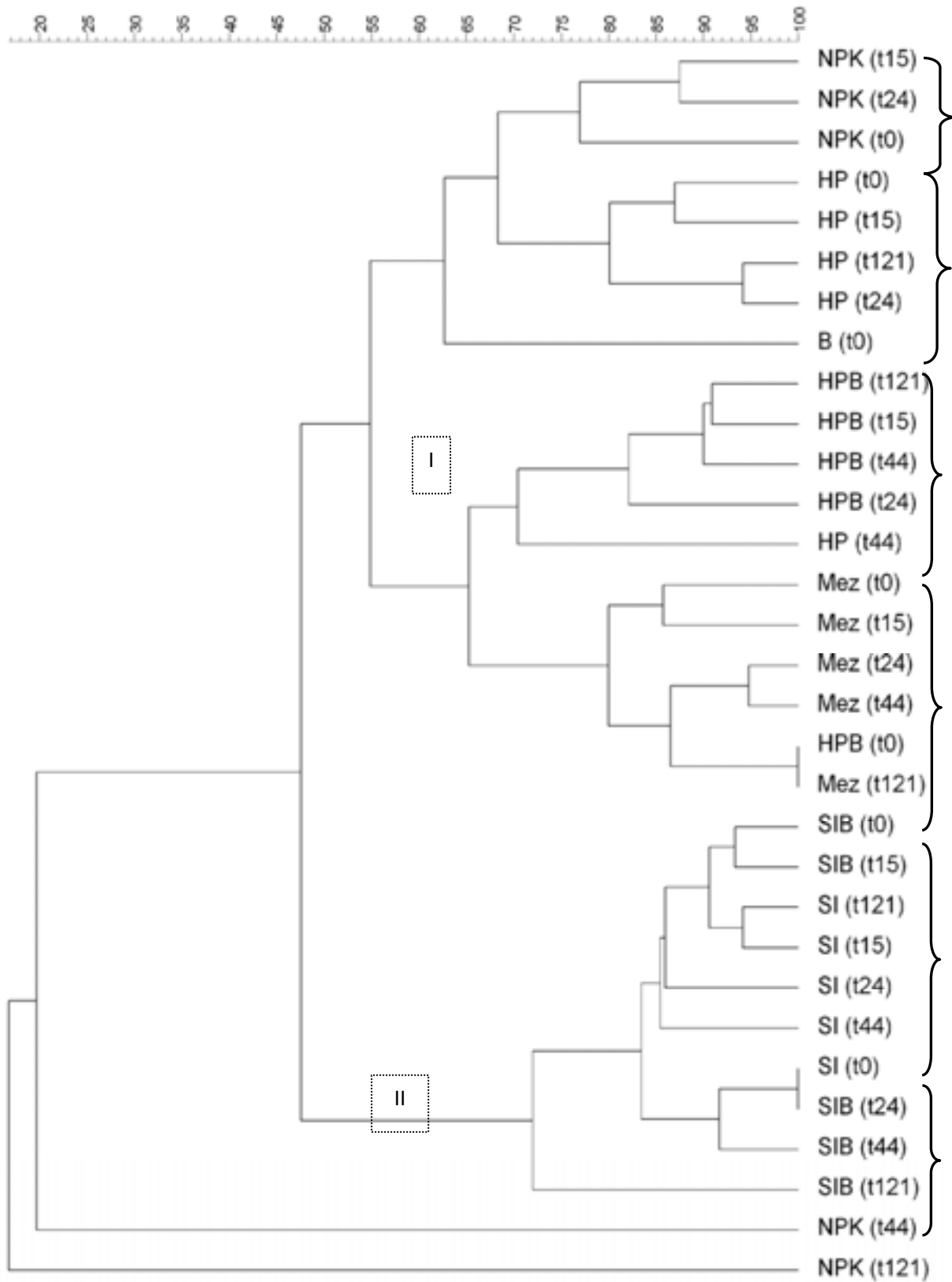


Figura V.14. Dendrograma de todos los microcosmos con sus respectivos tiempos de muestreo

(0, 15, 25, 44 y 121 días). Las llaves punteadas y lineales muestran los clusters y subclusters observados.

En el dendrograma de la Figura V.14 puede observarse claramente que el agregado de los nutrientes afectó la composición de la comunidad bacteriana de la tierra Mez.

Se observa la formación de un gran cluster que integra a todos los microcosmos con un 48 % similitud. Este a su vez, está formado por dos subclusters: I y II.

En el subcluster I (55 % similitud), se apreció una dinámica de comunidades muy relacionadas en el microcosmo sin bioestimular, Mez (78 % de similitud).

El aporte de HP y el surfactante Brij700[®] (microcosmo HBP) se produjo un marcado efecto sobre la comunidad de Mez, que se apreció en la formación de un cluster propio con un 70% de similitud.

El efecto del agregado de HP y del fertilizante NPK condujo a la formación de un cluster (62% similitud) que incluye las comunidades observadas durante el tratamiento en los microcosmos HP y NPK.

En el subcluster II (70% similitud), se aprecia la dinámica de comunidades provocada por el aporte de sales inorgánicas, con o sin el agregado del surfactante Brij700[®], microcosmos SI y SIB.

Las comunidades establecidas al t44 y t121 en el microcosmo NPK se ubicaron por fuera del gran cluster, definiendo dos ramas independientes.

Dado que en este ensayo se preparó una nueva mezcla de tierras, se realizó nuevamente el análisis de las comunidades bacterianas por DGGE de las tierras O, B y Mez.

Del análisis del gel y su dendrograma (Figura V.12), se observó que la comunidad de Mez se agrupó con la de B con un 87 % de similitud, O se ubicó fuera del cluster con un 70 % de similitud. Este resultado es concordante con lo observado en el ensayo anterior

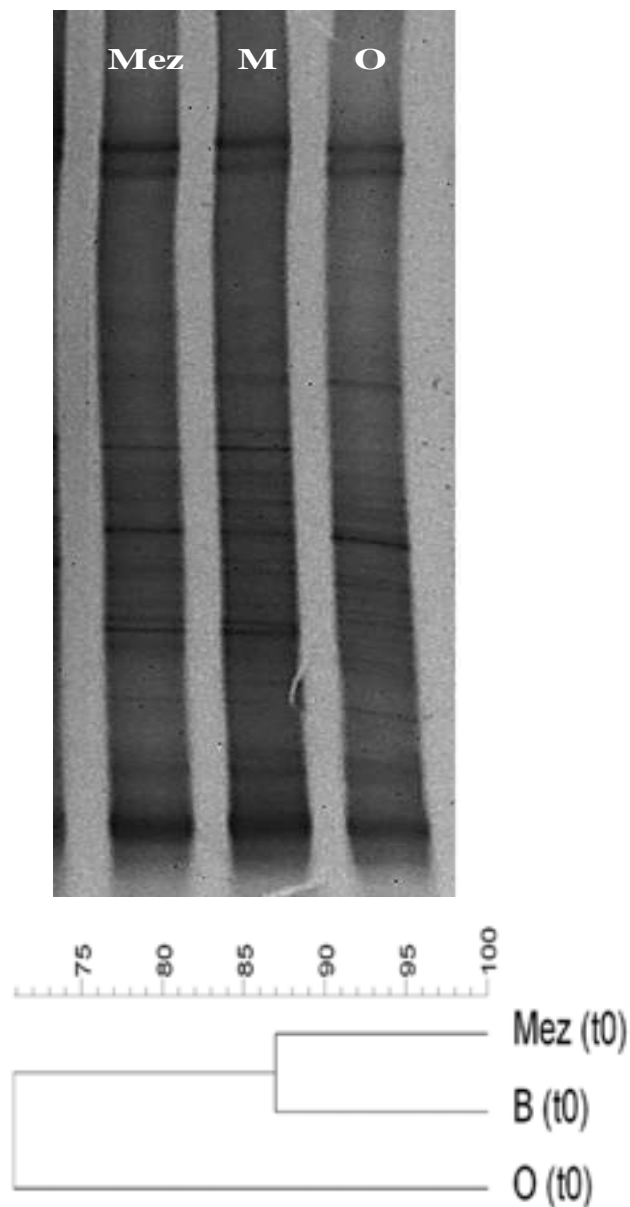


Figura V.15. Gel de DGGE que muestra el perfil de las comunidades bacterianas presentes en la mezcla de ambos suelos (Mez) y en cada suelo por separado: B (Barrio Mosconi) y O (Canal Oeste). A su lado se observa el dendrograma correspondiente.

V.D. Discusión

En el presente capítulo se describieron dos ensayos de bioestimulación (I y II). En el Ensayo I, se estudió la bioestimulación con el nutriente orgánico harina de pescado de dos suelos crónicamente contaminados del polo Petroquímico La Plata- Ensenada, (B y O) y de la mezcla de ambos (Mez). La dilución o mezcla de suelos contaminados con el agregado de un suelo prístino o con uno de menor concentración de contaminantes, es una práctica habitual que tiene como objetivo principal disminuir la concentración de los hidrocarburos presentes, que podrían afectar el proceso de biorremediación. De acuerdo con la bibliografía consultada, muy pocos estudios han sido realizados sobre el efecto que la mezcla de dos tierras puede producir en las comunidades originales. Karamalidis y col, 2010, realizaron ensayos de biorremediación de suelos contaminados utilizando suelo prístino como inoculante microbiano. En este estudio los autores justifican la incorporación de suelo prístino como vehículo de comunidades microbianas potencialmente degradadoras de hidrocarburo y también como una forma de mejorar el manejo del suelo a tratar, el cual estaba altamente contaminado (presencia de agregados muy difíciles de disgregar, con zonas oleosas y viscosas).

Los dos sitios muestreados, Barrio Mosconi y Canal Oeste están bajo la influencia del polo petroquímico La Plata-Ensenada, y se encuentran muy próximos uno de otro. Esta situación fue elegida con el fin de minimizar las variables que pudieran influenciar el efecto de la contaminación crónica por hidrocarburos, como la textura de los suelos, el contenido de C, N, P, el pH la CIC, entre otras.

A pesar que los sitios elegidos se encontraban próximos, del análisis de los suelos se concluye que las texturas resultaron diferentes, con mayor aporte de la fracción de arcillas en Barrio Mosconi (textura Franco arcillosa) en comparación con Canal Oeste (textura Franco). Los suelos presentaron similares valores de C oxidable (4,44 % y 4,36 %). En cambio, Barrio Mosconi presentó un menor contenido de N (0,36 %) y P (25,33 ppm), en comparación con Canal Oeste, 1,9 % y 63 ppm, respectivamente. El pH y la capacidad de intercambio catiónico fueron similares en ambos suelos. El contenido de HT fue de 292 mg/Kg para el Barrio Mosconi y de 395 mg/Kg para el Canal Oeste.

Es un hecho que la degradación microbiana de cada sitio contaminado responde de diferente forma de acuerdo a las diferencias de ciertos parámetros del suelo (Sabaté y col., 2004).

Teniendo en cuenta esto, no solo la contaminación inicial sino también la calidad de los suelos son propiedades que condicionarán el establecimiento de nuevas comunidades (Degens y col., 2002).

El monitoreo de los microcosmos a través de la actividad deshidrogenasa, permite estimar la evolución de la comunidad microbiana metabólicamente activa. Fue detectado un aumento significativo al inicio del tratamiento, en los microcosmos de los suelos B y O. Este resultado reflejaría la respuesta de la comunidad microbiana al estímulo producido por la aireación y el aporte de agua, permitiendo una mejor asimilación de los diferentes sustratos presentes en el sistema. Estos factores han sido referidos por Sabaté y col., (2004) como claves para la biorremediación de un suelo. La evolución de las poblaciones cultivables no reflejó el mismo comportamiento. Los recuentos de las poblaciones bacterianas BH y BDH se mantuvieron semejantes a los valores iniciales.

Del análisis de la dinámica de comunidades del microcosmo B se apreció que este microcosmo al tiempo 0 mostró mayor similitud con el microcosmo Mez, evidenciando la mayor proporción de tierra B en la mezcla. Posteriormente, y provocado por el acondicionamiento por aireación y corrección de la humedad, se apreciaron cambios inmediatos en la estructura de las comunidades bacterianas en el microcosmo B.

Es preciso tener en cuenta que la estimación de la densidad de poblaciones microbianas de suelo por métodos dependientes de cultivo representa una muy pequeña proporción (1-10 %) del total de poblaciones del suelo (Heuer y col., 2001; Nannipieri y col., 2003). Es probable entonces que poblaciones diferentes a las monitoreadas por los recuentos, hayan sido seleccionadas por el acondicionamiento de los microcosmos y en consecuencia incrementadas durante el tratamiento, a expensas de los sustratos disponibles, como lo sugiere la dinámica de comunidades observada en el microcosmo B.

De acuerdo con los datos de HT, determinados por GC, no se apreció una eliminación significativa en el microcosmo B, a diferencia de lo observado en el microcosmo O. Si bien no fueron detectados aumentos significativos en las poblaciones de BDH, la eliminación observada en el microcosmo O podría ser parcialmente atribuida a la actividad degradadora de una comunidad microbiana adaptada o establecida durante el tratamiento. Del análisis de comunidades se infieren menores cambios en las poblaciones predominantes del microcosmo O durante la primera etapa del tratamiento. Así mismo, la pérdida abiótica de HT, principalmente la

fracción volátil, pudo aportar a esta eliminación durante la etapa de acondicionamiento de las tierras en la preparación de los microcosmos.

Es posible también atribuir la eficiencia de eliminación de hidrocarburos a las características propias de cada tierra de los microcosmos. En el microcosmo B, la mayor proporción de arcilla y el menor contenido de N y P, pudieron ser los condicionantes de un hábitat menos propicio para el establecimiento de una comunidad activamente degradadora. La adsorción de los hidrocarburos a coloides del suelo, por ejemplo las arcillas, pudieron haber reducido la biodisponibilidad de los mismos (Margesin y col., 2007) La presencia de arcillas también podría haber condicionado la difusión del oxígeno del aire y la distribución del agua en los microporos del suelo dificultando el desarrollo de una comunidad activamente degradadora de hidrocarburos. La mezcla de los suelos O y B, en el microcosmo Mez, evidenció un aumento de actividad biológica inicial similar al observado en los microcosmos de suelos individuales. La evolución de la población de BH fue similar a la determinada en el microcosmo O, en cambio la población BDH evidenció un significativo y abrupto descenso de 1.10^7 UFC/g a 1.10^5 UFC/g a la semana de incubación.

El descenso inicial de la población BDH podría sugerir que la viabilidad de las poblaciones autóctonas de ambos suelos fue afectada por las características fisicoquímicas y biológicas del otro. Este impacto mutuo fue gradualmente superado (1×10^6 UFC/g), durante un corto periodo del tratamiento pero nunca alcanzó el valor inicial. Podemos inferir que la actividad respiratoria desarrollada durante la recuperación de la población BDH pudo haber contribuido al ascenso de la actividad biológica total observada en este periodo. Karamalidis y col. (2010), observaron un efecto similar en la mezcla de suelos, en experimentos de biorremediación de suelos crónicamente contaminados con petróleo. Los autores proponen como una estrategia de biorremediación, realizar la mezcla de un suelo contaminado con suelo prístino en una proporción 1:1, para reducir el alto grado de contaminación inicial, que podría inhibir el proceso y además facilitar el manejo del suelo contaminado. Al evaluar la eficiencia de la degradación de hidrocarburos, detectaron que la eliminación de alcanos fue significativamente menor durante los primeros 60 días del tratamiento en el “suelo mezcla”, en comparación con el “suelo original” y que luego de este periodo se observaron eliminaciones similares para ambos suelos. En el ensayo de Karamalidis y col. (2010), la interacción ocurrió entre una comunidad altamente seleccionada y la de un suelo prístino, con actividad potencial degradadora de hidrocarburos (Atlas y Bartha, 1998). Aparentemente durante los 60 días, la comunidad del suelo prístino se adaptó

gradualmente a la comunidad del suelo contaminado, resultado que se vio reflejado en una eliminación similar de los hidrocarburos en ambas tierras. En el presente trabajo, se realizó una mezcla de dos suelos crónicamente contaminados, con el fin de acondicionar el grado de contaminación inicial. Esta práctica condujo a la interacción de dos hábitats diferentes, con dos comunidades altamente seleccionadas. El establecimiento de una “nueva comunidad” con capacidad degradadora de hidrocarburos fue “efímero”, tanto en densidad celular como en permanencia. Del análisis de la dinámica de comunidades observadas en el microcosmo Mez se infiere que fueron producidos pocos cambios en la estructura durante los primeros 48 días.

La bioestimulación de los microcosmos B y O con harina de pescado produjo cambios significativos en la comunidad microbiana de las tierras. Si bien ambos microcosmos mostraron un aumento agudo de la actividad biológica, el microcosmo BHP disminuyó gradualmente, manteniendo valores similares al inicial, mientras que el microcosmo OHP experimentó un descenso rápido a valores muy por debajo del valor inicial. La harina de pescado también estimuló significativamente las poblaciones cultivables BH y BDH, de ambos microcosmos. El efecto estimulante fue sostenido en las poblaciones del microcosmo BHP, que se mantuvieron por encima de los valores iniciales, durante todo el experimento. Mientras que las poblaciones de OHP descendieron hacia el final del ensayo.

La semejanza en la estructura de comunidades entre BHP y OHP a los 5 días del tratamiento evidencia una temprana selección de poblaciones semejantes en ambos microcosmos, producida por el aporte orgánico, que se pierde al avanzar el tratamiento.

La harina de pescado significó un aporte de una fuente orgánica fácilmente asimilable, y una mejora de la textura para ambos suelos. Considerando que el suelo del Barrio Mosconi presentó un mayor contenido de arcilla y menor contenido de N y P, en comparación con el suelo del Canal Oeste, podría atribuirse a la harina de pescado el efecto estimulador y la puesta en evidencia de una comunidad potencialmente más activa que la del Canal Oeste, evidenciado por el aumento y mantenimiento de las poblaciones cultivables BDH. Sin embargo, estos resultados no reflejaron una eliminación significativa de los hidrocarburos.

Respecto al análisis de comunidades, el mismo sugiere que la estimulación por la harina de pescado produjo cambios comparables a los producidos en la comunidad de B.

La estimulación con harina de pescado de la actividad biológica y de las poblaciones bacterianas cultivables con ausencia de una significativa eliminación de hidrocarburos también fue observada en la presente tesis en el ensayo de biorremediación en parcelas, en clima frío

(Capítulo IV). Evidentemente, otros factores no considerados en estos ensayos pudieron ser los determinantes al momento de explicar esta ausencia de degradación. Algunos de ellos podrían ser la heterogeneidad del suelo, la composición textural del suelo, el tipo de contaminación, el protocolo de extracción de HT (el cual debería ser optimizado para cada suelo). Otros motivos podrían estar asociados a la técnica de recuento de bacterias degradadoras, realizada en medio sólido suplementado con gasoil. En esas condiciones el desarrollo se produce a expensas del gas oil como única fuente de C y energía, al suplemento de factores de crecimiento aportados agar (según su calidad) y a las sales utilizadas en su preparación. Bajo estas condiciones, el recuento de degradadoras estaría reflejando la población que tiene la potencialidad de degradar gasoil y no necesariamente se encuentre metabólicamente activa en el microcosmo. Particularmente, en aquellos microcosmos suplementados con harina de pescado, podríamos sugerir que las poblaciones BH y BDH desarrollaron rápidamente a expensas de este nutriente.

La eliminación de HT observada en el microcosmo OHP, no mostró diferencias significativas con el microcosmo O, por lo que se podría inferir que el aporte de la harina de pescado no afectó la eficiencia de la eliminación. No obstante, analizando la dinámica de comunidades, se aprecia que la harina de pescado generó una dinámica diferente en el microcosmo OHP, evidenciando mayores cambios que los apreciados en el microcosmo O.

La bioestimulación con harina de pescado en el suelo Mez produjo un aumento de la actividad biológica similar al obtenido en el microcosmo BHP. Dicho aumento se observó también en las poblaciones cultivables BH y BDH durante los primeros 50 días. El significativo descenso de la población BDH que había sido apreciado en el microcosmo Mez fue superado por el aporte de la harina de pescado, en el microcosmo MezHP. Del análisis de las comunidades, se aprecia que la harina de pescado produjo cambios en la estructura del microcosmo MezHP, respecto de la observada durante el tratamiento sin estimular, sin embargo la mezcla fue un factor perturbador mucho más fuerte que dicho nutriente.

Del resultado podría inferirse que el aporte de una fuente de C y energía, fácilmente asimilable como la harina de pescado, permitió neutralizar el efecto inhibitorio detectado en el microcosmo Mez, condicionando un nuevo hábitat donde fue posible el desarrollo relativamente rápido de una nueva población bacteriana con potencial actividad degradadora de hidrocarburos. El aporte de harina de pescado pudo haber ejercido algún tipo de “efecto protector” que evitó la inhibición/muerte de las poblaciones bacterianas, observada en el microcosmo Mez, permitiendo su desarrollo hasta los 100 días de experimento.

Como en otros ensayos en esta tesis, el aumento de la población BDH no correlacionó con la degradación de hidrocarburos, como lo demuestra la ausencia de diferencia significativa entre las determinaciones de HT realizadas en el microcosmo MezHP al comienzo y al final del tratamiento.

Del análisis de las afiliaciones taxonómicas de las bandas secuenciadas a partir de los geles de DGGE del microcosmo O, puede resaltarse la presencia del orden *Sphingobacteriales* (en O a t0 y en OHP a t48) y la clase *Gammaproteobacteria*, la cual fue detectada durante todo el ensayo en ambos microcosmos. Ambos grupos taxonómicos fueron detectados en un ensayo de bioestimulación en suelos contaminados con bifenilos policlorados (PCB) aplicando un inductor de la vía de degradación de PCB (L-carvona), lecitina de soja como surfactante y xilosa como fuente de carbono (Petrić y col., 2011).

En los microcosmos O y OHP durante todo el ensayo se destacó la presencia de la familia *Acidobacteriaceae* (filum Acidobacteria). Miembros de este filum representan aproximadamente un 20 % de las comunidades bacterianas presentes en un suelo pero en algunos casos puede contribuir hasta un 80 %. Este filum también ha sido hallado en otros ambientes como el drenaje ácido de una mina o un acuífero contaminado hidrocarburos (Koch, 2008). George y col., (2009) han reportado que la abundancia de este filum es fuertemente afectada por la presencia de contaminantes como 2, 4, 6-trinitrotolueno (TNT) en suelos y ha sugerido este filum como un grupo biomarcador de la presencia de dicho contaminante. En nuestro ensayo, se observó el efecto contrario ya que la familia *Acidobacteriaceae* estuvo presente (de acuerdo a las bandas comigrantes) durante todo el ensayo, sugiriendo un posible rol de dicha familia en la degradación de HT observada. Lo mismo podría ser inferido para el orden *Sphingobacteriales* y para la presencia de *Streptomyces sp.* (filum Actinobacteria). Este género ha sido detectado durante todo el ensayo tanto en O como en OHP. Otros autores hallaron dicho grupo taxonómico en suelos contaminados con los metales pesados Zn y Pb (Gremion y col., 2003) y mostraron la habilidad de este grupo de remover casi completamente Cr (VI) de suelos contaminados (Polti y col., 2009). La presencia de *Streptomyces sp.* en suelos contaminados con metales condice con las propiedades del suelo de Canal Oeste en el cual fue detectado, ya que se lo había reportado como sitio contaminado con metales pesados por el rebalse del Canal en el año 1993 (ver Capítulo II, Materiales y Métodos).

En los microcosmos B y BHP, miembros del filum proteobacteria (clase β) fueron detectados como los grupos taxonómicos mayoritarios. Barragán y col. (2009) reportaron la presencia de

miembros de las clases γ y β como predominantes en suelos contaminados con petróleo, en el norte del Amazonas. Particularmente, la presencia del género *Hydrocarboniphaga sp.*, (Bacilo gram-negativo, móvil y aerobio estricto), fue inferida al comienzo del tratamiento en B y BHP. Dicho género fue propuesto por Palleroni y col. (2004) quien lo describe como un miembro de γ -*Proteobacteria* activo degradador de hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Su presencia también fue detectada en suelos agrícolas tratados con herbicidas e insecticidas por largo tiempo (Zhou y col., 2008).

Miembros de la familia *Burkholderiales (Alcaligenacea)* y del filum *Acidobacteria* sólo fueron detectados al inicio del ensayo tanto en B como BHP. Se podría inferir que estas células hayan sido mayoritarias en el suelo original y ante un cambio en las condiciones, como el agregado de nutrientes o la sola aireación del suelo, haya favorecido el desarrollo de otras poblaciones mejor adaptadas que finalmente colonizaron el hábitat.

A los 48 días de tratamiento miembros del orden *Xanthomonadales* y *Pseudomonadales* fueron detectados en el microcosmo B bioestimulado, sugiriendo su participación activa en el consumo de sustratos disponibles, como la harina de pescado. Miembros de género *Steroidobacter* fueron detectados en el microcosmo BHP a los 48 días. La especie *Steroidobacter denitrificans* fue descrita por Fahrbach y col., (2008), quienes lo aislaron como degradador de hormonas esteroides en condiciones anóxicas, utilizando nitratos como aceptor final de electrones. Además de hormonas esteroides, los autores comprobaron la capacidad de este género de utilizar ácidos grasos y lo asociaron filogenéticamente al género *Hydrocarboniphaga*.

Miembros del género *Pontibacter sp.* (filum *Bacteroidetes*), fueron detectados solamente en BHP durante los 48 días. Este género ha sido aislado frecuentemente de suelos no contaminados, lo cual sugiere su desarrollo a expensas de la harina de pescado.

El filum *proteobacteria* (clases δ , γ y β) fue detectado mayoritariamente en los microcosmos Mez y MezHP durante todo el ensayo. Su presencia se podría asociar a la mayor proporción de suelo B, en la mezcla. Particularmente, se detectó el género *Lysobacter sp.* (clase γ). Especies de dicho género, han sido descritos como degradadores de carbazoles (compuestos aromáticos nitrogenados, mutagénicos, presentes en petróleo) (Maeda y col., 2010). Su predominio en el microcosmo Mez y en el MezHP, sugiere su participación durante el tratamiento de la mezcla en los primeros 48 días.

La presencia de miembros de la familia *Nitrosomonadaceae* también fue sugerida en Mez y MezHP durante todo el ensayo. Esta familia incluye géneros responsables de la nitrificación en

suelos, y fue citada por Miller y Smith, (2009) en un acuífero contaminado con aguas servidas. La mezcla de suelos pudo haber incentivado el desarrollo de estas poblaciones contribuyendo al acondicionamiento del nuevo hábitat. Miembros del orden *Burkholderiales* fueron hallados en Mez y MezHP y su presencia podría ser explicada por el aporte de los suelos del Barrio Mosconi a la mezcla de suelos, donde también fue detectado.

El filum Firmicutes fue únicamente hallado en el microcosmo suplementados con harina de pescado (MezHP). Es probable que en los microcosmos de los suelos O y B haya estado presente por debajo del límite de detección y que la mezcla y bioestimulación con harina de pescado hayan condicionado un ambiente propicio para su desarrollo. Miembros de este filum fueron detectados y asociados al efecto provocado por una contaminación con petróleo en una zona costera (Pearson y col., 2008).

Con el fin de evaluar el efecto “protector” que genera el aporte de la harina de pescado sobre la biorremediación de la mezcla de los suelos O y B (suelo Mez) se realizó un segundo ensayo (Ensayo II). Adicionalmente, se comparó con otras alternativas de estimulación como la aplicación de nutrientes inorgánicos (NPK y las sales inorgánicas). También se evaluó el efecto de la utilización del surfactante Brij700[®], anteriormente aplicado en los protocolos de biorremediación en clima frío (Capítulo IV).

En este nuevo ensayo el microcosmo Mez no mostró cambios significativos en la actividad biológica, ni en las poblaciones cultivables BH. Cabe destacar que exhibió una fuerte inhibición en la población BDH, hasta fin del ensayo. Estos resultados en las poblaciones cultivables también habían sido observados en el Ensayo I, sin embargo en este nuevo ensayo el efecto de la mezcla fue más acentuado. Probablemente debido a la heterogeneidad de los suelos y la preparación de una nueva mezcla para el Ensayo II se introdujo mayor variabilidad en los resultados.

El aporte del nutriente harina de pescado en los microcosmos HP y HPB provocó un aumento significativo de la actividad biológica durante los primeros 15 días de tratamiento. Luego ambos microcosmos disminuyeron su actividad igualándose a los demás microcosmos suplementados con los nutrientes inorgánicos. La estimulación con sales de N y P, no provocó cambios significativos en la actividad microbiana ni en las poblaciones cultivables.

El aumento de actividad biológica fue acompañado por el incremento de las poblaciones cultivables, de BH y BDH, en los microcosmos suplementados con harina de pescado, HP y HPB

En este segundo ensayo, fue posible confirmar el “efecto protector” provocado por el aporte de la harina de pescado, estimulando la actividad deshidrogenasa total de la comunidad microbiana del suelo, como así también detectado a través de la evolución de las poblaciones cultivables. Adicionalmente fue apreciado que la acción del surfactante no sería significativa en la estimulación del sistema, frente al aporte de la fuente de carbono fácilmente asimilable.

El aporte de los nutrientes inorgánicos no provocó la bioestimulación de los microcosmos, aun en presencia del surfactante, lo cual sugiere que no fue suficiente este suplemento para promover la asimilación de la materia orgánica natural provista en la mezcla de suelos.

No obstante a la estimulación lograda por el aporte de la harina de pescado, no se observó una eliminación significativa de HT en los microcosmos Mez, durante los 121 días de tratamiento.

Lee y Tremablay (1995) observaron que bioestimulando con harina de pescado y sales inorgánicas sedimentos marinos contaminados con petróleo cercanos a una plataforma de extracción marina, la harina de pescado estimuló mayormente las poblaciones cultivables, sin embargo las sales inorgánicas fueron las únicas que lograron una eliminación significativa de los hidrocarburos. Este tratamiento, probablemente represente una situación donde el petróleo resulta en un exceso de fuente de C asimilable, y el suplemento de N y P compensan los requerimientos para la asimilación y desarrollo de las comunidades degradadoras del sitio.

Los surfactantes han mostrado resultados positivos en la biorremediación de suelos contaminados (Wong y col., 2004). Estos provocan una disminución de la tensión superficial del agua e incrementan de esta manera la movilización y la biodisponibilidad de los compuestos orgánicos hidrofóbicos (Margesin y col., 2007).

La utilización del surfactante Brij700[®] no favoreció la eliminación de hidrocarburos en los microcosmos de suelo templado y tampoco en los clima frío (Capítulo IV). Es importante tener en cuenta que el suelo Mez posee una alta proporción de arcilla, aportada por la mayor proporción del suelo del Barrio Mosconi. Lee y col. (2002) reportaron que los surfactantes no iónicos como el Brij700[®], se adhieren fuertemente a las partículas de suelo. Dicha situación pudo haber alterado su transporte y solubilización, disminuyendo así su eficiencia.

Del análisis de la dinámica de las comunidades bacterianas, se observó que el agregado de nutrientes generó marcados cambios en las comunidades presentes en la mezcla de suelos del microcosmo Mez. Claramente el aporte del nutriente orgánico HP y del fertilizante NPK generó una dinámica diferente a la generada por el aporte de sales de N y P. Particularmente, el

agregado de harina de pescado generó una dinámica de poblaciones muy relacionadas durante el tratamiento, que se diferenció de la detectada en el microcosmo Mez.

El mayor efecto observado en el microcosmo Mez fue el provocado por las sales inorgánicas que definieron otro subcluster (II). Aquí la combinación con el surfactante Brij700[®] generó leves cambios en estos microcosmos.

Los resultados obtenidos al aplicar las diferentes alternativas de bioestimulación en los ensayos de biorremediación de una mezcla de suelos, llevan a la conclusión que la estimulación mediante el aporte de una fuente de carbono fácilmente asimilable no supera la condición de la especificidad de sitio. Al menos, bajo las condiciones del ensayo presentado. Es decir, la comunidad microbiana específica de un sitio, no se adapta fácilmente a las condiciones impuestas por el hábitat de otro sitio. Este concepto ha sido discutido en numerosas situaciones cuando se pretende aplicar un inóculo monobacteriano o un consorcio bacteriano en un sitio contaminado, aún verificando la capacidad degradadora *in vitro* del inóculo (Thompson y col., 2005; Ruberto y col., 2009; Pandey y col., 2010).

En nuestro caso, consideramos que el aporte de la harina de pescado podría haber actuado como un agente iniciador de una nueva comunidad. Es decir, en una primera etapa las comunidades de cada suelo serían estimuladas de una manera no específica por la fuente de carbono fácilmente asimilable, aumentando la diversidad. Posteriormente, una nueva comunidad específicamente degradadora podría haber sido seleccionada. En efecto, la población BDH aumentó significativamente en los microcosmos MezHP, Ensayo I y II, y fueron detectados miembros pertenecientes a diversos taxones, ciertamente degradadores de hidrocarburos. Sin embargo, este incremento no se resultó efectivo para la eliminación de los hidrocarburos del microcosmo, bajo las condiciones aplicadas durante el tratamiento. Definitivamente el aporte de la harina de pescado no superó las restricciones impuestas por las condiciones de cada sitio. No obstante, podrían ser evaluadas otras opciones de nutrientes orgánicos o surfactantes, para la biorremediación de estos suelos contaminados.

Por otra parte, cuando se desea biorremediar un suelo contaminado, sin la opción de la dilución (como el caso del suelo O) resulta interesante tener en cuenta la aireación y mantenimiento de una adecuada humedad del suelo contaminado, ya que dicha opción pudo haber contribuido a la eliminación observada en este suelo.

CAPÍTULO VI

Bioestimulación combinada con bioaumentación en áreas de clima frío. Efecto del agregado de nutrientes y de inóculos bacterianos sobre la degradación de gas oil en suelos antárticos contaminados

VI.A. Introducción

Como fue mencionado en la Introducción (Capítulo I), el bioaumentación es una estrategia de biorremediación que implica la inoculación de microorganismos con capacidades metabólicas específicas con el objetivo de aumentar la eficiencia de la biorremediación en un suelo contaminado. Esta estrategia es usualmente combinada con la bioestimulación, de forma de potenciar la capacidad degradadora del inoculante. Además, requiere de microorganismos que puedan competir con la flora autóctona del suelo contaminado, para así participar de los principales flujos de carbono y energía y aumentar la remoción del contaminante (Ruberto y col, 2003).

La eficiencia del bioaumentación es controversial, ya que según el tipo de suelo, de flora autóctona o la estrategia utilizada se han reportado tanto éxitos como fracasos aplicando esta metodología (ver el apartado de Introducción).

Por esta razón, el objetivo general de los estudios presentados en este capítulo fue caracterizar sistemas biológicos considerados aptos para su utilización en procesos de biorremediación de suelos antárticos contaminados con hidrocarburos y realizar estudios iniciales, tanto a escala laboratorio como *on site* en la Antártida, a fin de investigar la utilidad de aplicar algunos de esos sistemas biológicos en procesos de biorremediación de dichos contaminantes.

VI.B. Estudio de algunas propiedades de los inóculos bacterianos

Las propiedades de superficie y la capacidad de adhesión a los contaminantes de los inóculos bacterianos degradadores de hidrocarburos juegan un rol importante en la eficiencia de remoción de estos compuestos (Kaczorek y col., 2011). Ha sido mencionado en trabajos previos (Parales y Haddock, 2004), que en combinación con la capacidad de utilizar los hidrocarburos como única fuente de carbono y energía, la existencia de movimientos quimiotácticos hacia los contaminantes contribuyen al éxito competitivo de las bacterias que los poseen, ya que les permite competir más exitosamente con otro microorganismos del ambiente, convirtiéndose en eficientes agentes de biorremediación.

Por lo anteriormente mencionado, es importante conocer algunas propiedades de los inóculos bacterianos que se planean utilizar en biorremediación. En este estudio, los sistemas biológicos

estudiados fueron la cepa bacteriana degradadora de gas oil *Rhodococcus* ADH y el consorcio degradador de gas oil y HAPs, M10. Ambos sistemas biológicos fueron previamente aislados por el grupo de trabajo a partir de suelos antárticos contaminados (Ruberto y col., 2005; Ruberto y col., 2006).

VI.B.1. Capacidad degradadora de hidrocarburos en MML suplementado con distintos hidrocarburos

La Tablas VI.1.y VI.2 muestran la capacidad de crecimiento de la cepa ADH y del consorcio M10 respectivamente en MML suplementado con distintos hidrocarburos como única FCE. La cepa ADH exhibió mayor crecimiento en gas oil, JP1, Kerosene, nC16 y nC12. Por otro lado el consorcio M10, además de mostrar una alta capacidad de crecimiento en gasoil, nC16 y nC12, exhibió también un buen crecimiento en hidrocarburos aromáticos policíclicos, como naftaleno y fenantreno.

Tabla VI.1. Capacidad de crecimiento de la cepa *Rhodococcus* ADH en MML suplementado con diferentes hidrocarburos como única fuente de C y energía.

Sustrato	Capacidad relativa de crecimiento
Gasoil	+++
JP1	+++
Petróleo crudo	++
Kerosene	+++
nC16	+++
nC12	+++
nC6	-
nC7	-
IsoC8	-
Ciclohexano	+
Fenantreno	-
Antraceno	-
Fluoreno	-
Pireno	-

Tabla VI.2. Capacidad de crecimiento del consorcio bacteriano M10 en MML suplementado con diferentes hidrocarburos como única fuente de C y energía.

Sustrato	Capacidad relativa de crecimiento
Gasoil	+++
Hexadecano	+++
Dodecano	+++
Naftaleno	+++
Fenantreno	+++
Antraceno	++
Dibenzotiofeno	++
Fluoreno	++
Tolueno	++
Pireno	+

Se estudió la cinética de crecimiento de ambos sistemas biológicos en presencia de gas oil como única fuente de C y energía. En ambos casos se estimaron también los valores de hidrocarburos totales (HT) durante el crecimiento de los inóculos.

En el caso de la cepa *Rhodococcus* ADH (Figura VI.1), la misma mostró un crecimiento heterogéneo, exhibiendo la formación de agregados macroscópicos en el medio de cultivo. Por esta razón, los valores de biomasa se expresaron en g/l ya que no fue posible evaluar el crecimiento mediante recuento. ADH desarrolló a 20 °C, una fase exponencial de una duración aproximada de 75 hs y la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{\max}) estimada fue de 0.038 h^{-1} . El valor de biomasa máxima obtenido fue de 2,52 g/l a las 125 hs, luego de lo cual se observó una caída en los valores de biomasa. Durante el periodo analizado (150 h), ADH exhibió un porcentaje de eliminación de gas oil del 85%.

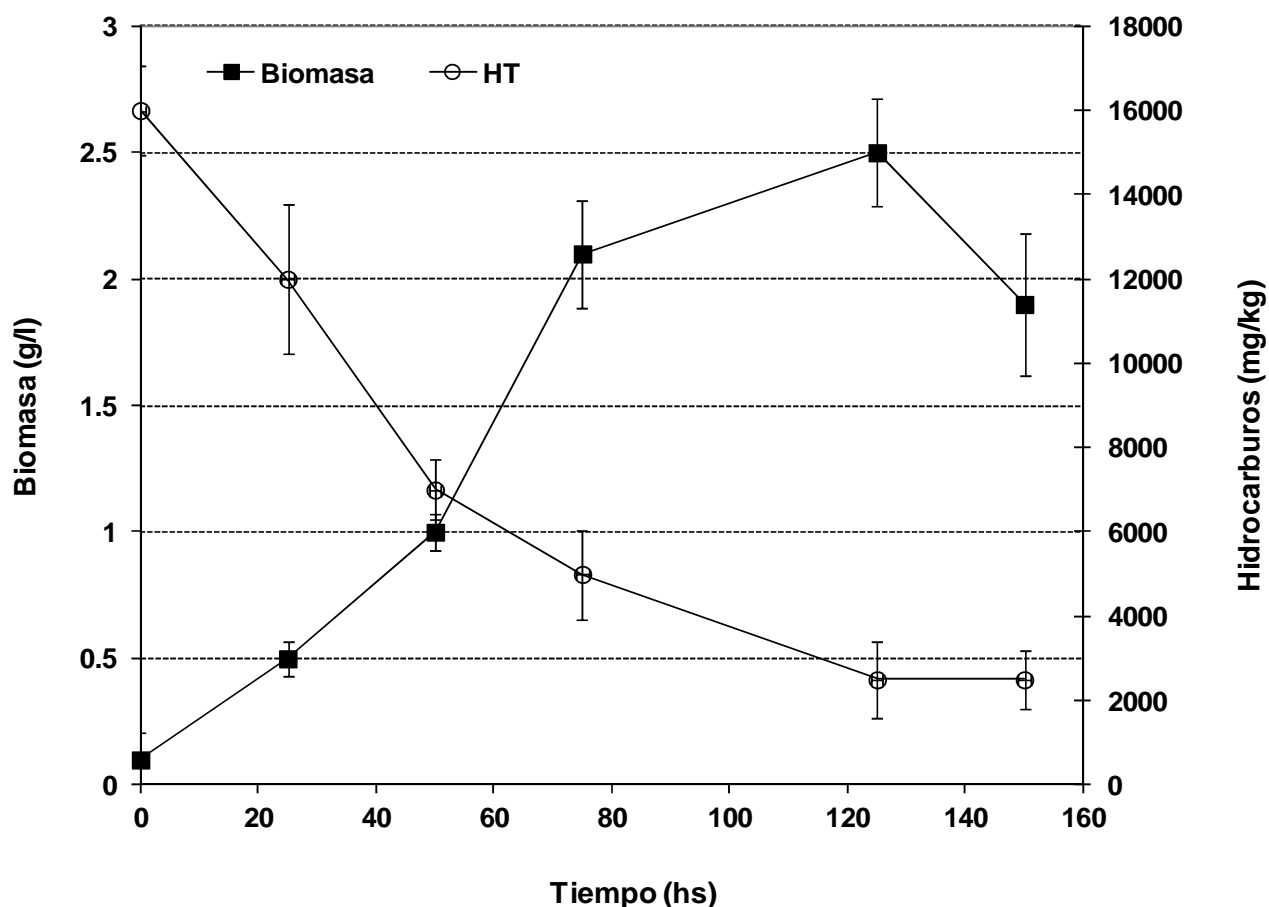


Figura VI.1. Cinética de crecimiento en gasoil (mg/l) y curva de eliminación de hidrocarburos totales (mg/kg) de la cepa ADH. Las barras representan la DS de triplicados.

Respecto a M10 (Figura VI.2), este consorcio exhibió un crecimiento homogéneo. Si bien por ser un cultivo mixto no pueden definirse en forma estricta los parámetros cinéticos descriptos para el crecimiento de cepas puras, el consorcio desarrolló una fase exponencial aparente con una duración de aproximadamente 50 hs. Mostró también una fase incremento exponencial de la biomasa, durante la cual se estimó una μ_{\max} aparente de $0,03 \text{ h}^{-1}$ cuando el cultivo se realizó a 20°C . El valor de biomasa máxima alcanzada por el consorcio fue estimado en $0,92 \text{ g/l}$. Durante el periodo analizado, M10 mostró un porcentaje de degradación de gas oil del 65 %.

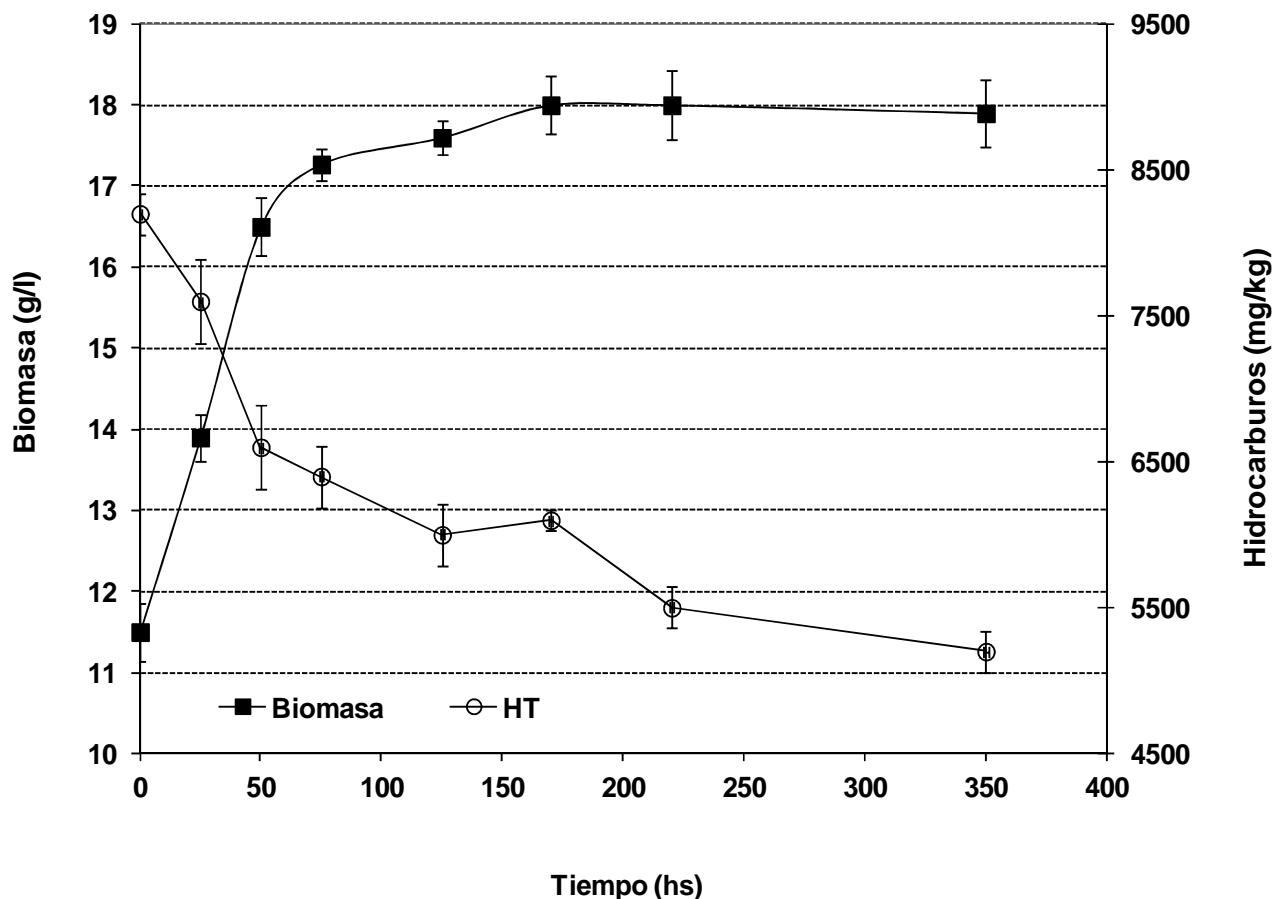


Figura VI.2. Cinética de crecimiento en gasoil y curva de eliminación de hidrocarburos totales del consorcio M10. Las barras representan la DS de triplicados.

VI.B.2. Caracterización mediante microscópica electrónica

Como parte de la caracterización de los inóculos bacterianos, se realizó la observación mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) de la cepa ADH (Figura VI.3) y del consorcio M10 (Figura VI.4). En numerosas células de ADH provenientes de cultivos con hidrocarburos como única FCE, se observaron importantes invaginaciones de la membrana plasmática en forma de espiral las cuales nunca fueron detectadas en individuos provenientes de cultivos con otros sustratos (datos previos, no mostrados). No fue evidenciada la presencia de “gotas” o acúmulos intracelulares de hidrocarburos. Estas estructuras poco habituales, así como la

ausencia de acúmulos intracelulares de hidrocarburos, podrían estar relacionadas con la estrategia de interacción, incorporación y metabolización de estos compuestos por parte de la cepa ADH.

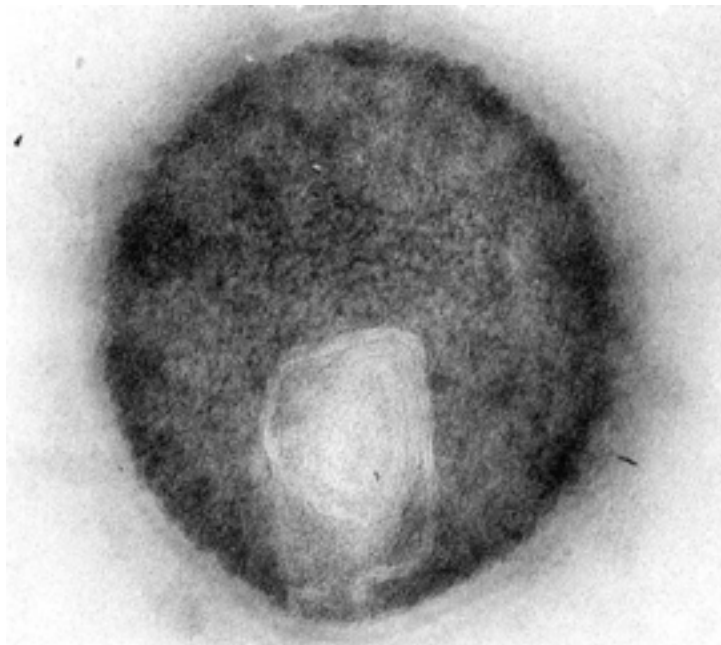


Figura VI.3. Micrografía electrónica de transmisión (120.000 x) de una célula de la cepa ADH proveniente de un cultivo en n-dodecano. Puede observarse la invaginación de la membrana plasmática. Esta estructura no se observó en células provenientes de cultivos en caldo nutritivo u otros sustratos hidrofílicos.

Por otro lado, en las imágenes obtenidas del consorcio M10 (Figura VI.4) se observaron células de diversa morfología (Fotografías 1 y 2) junto a la presencia de una matriz amorfa que parece contener a las células y podría tratarse de algún tipo exopolímero. Esta matriz fue observada en varias de las fotografías tomadas. Las Fotografías 3 y 4 muestran la mencionada matriz y la asociación de la membrana celular a la misma.

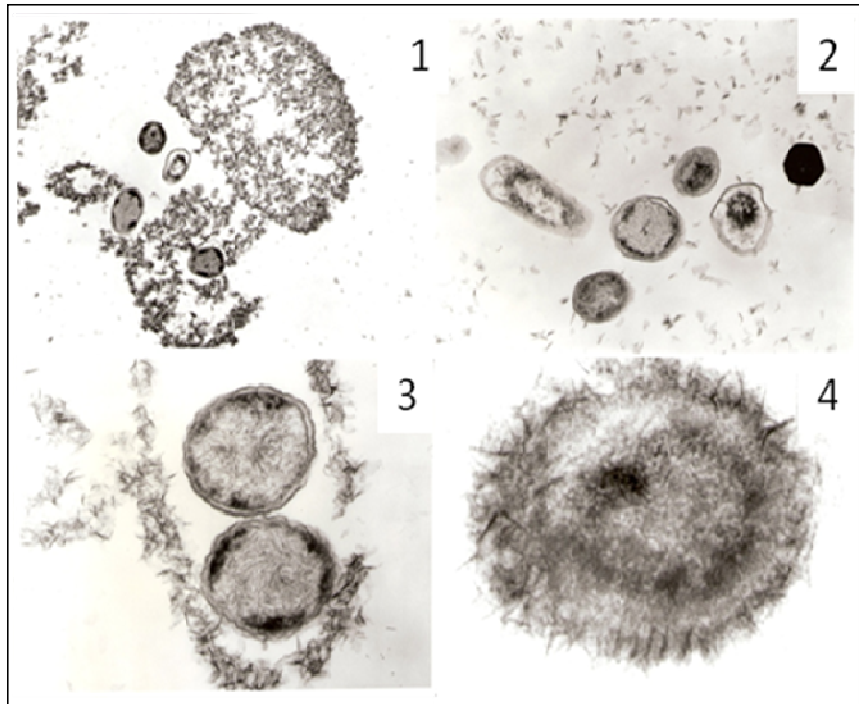


Figura VI.4. Micrografía electrónica de transmisión de las células del consorcio M10 cultivados en fenantreno como única FCE. 1: 10.000x. 2: 18.500x. 3: 46.000x. 4: 70.000x.

Para el consorcio M10, se realizaron también estudios mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las imágenes mostradas en las Figuras VI.5, VI.6, y VI.7 evidenciaron también la presencia de células con diversas morfologías, predominando la forma bacilar. También se observaron estructuras de tipo biofilm (Figura VI.6).

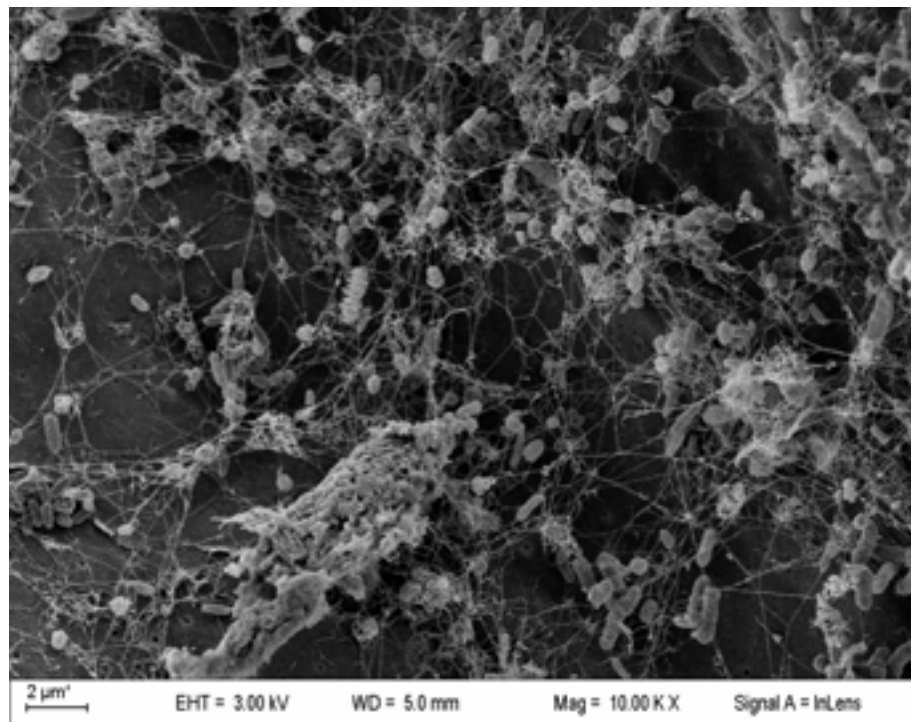


Figura VI.5. Aspecto del consorcio M10 (SEM) sobre una matriz sólida (copos de quitina). Los componentes se agregan formando una estructura tipo biofilm en donde se mantienen unidos por material extracelular que en la imagen se aprecia como una estructura fibrosa. Magnificación: 10000X.

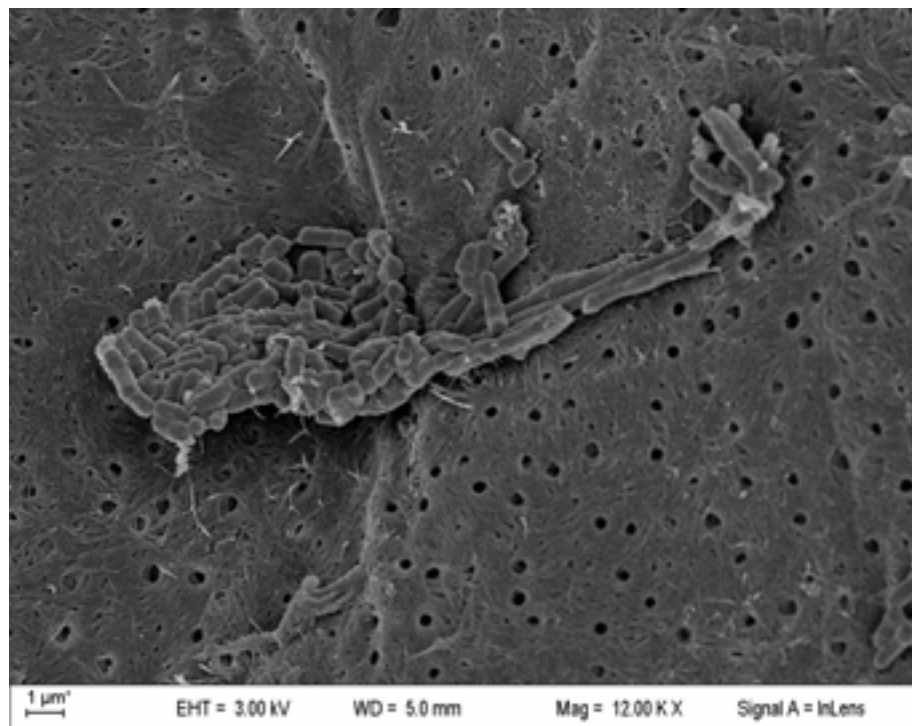


Figura VI.6. Detalle de un agrupamiento de componentes del consorcio M10 (SEM). Magnificación: 12000X.

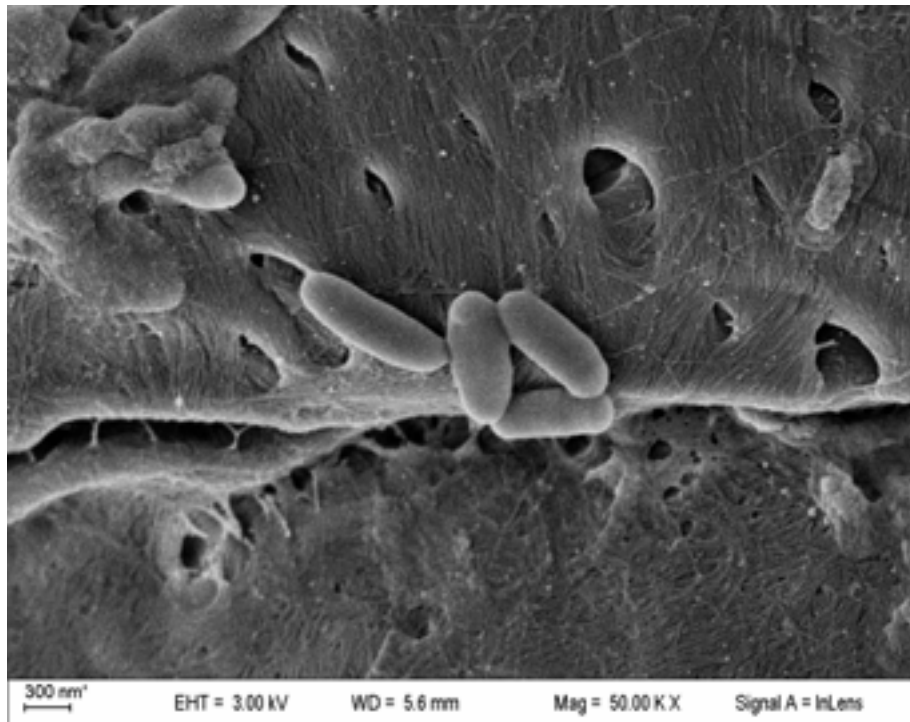


Figura VI.7. Detalle de uno de los componentes del consorcio M10 (SEM). Magnificación: 50000X.

VI.B.3. Propiedades de superficie: Medida del porcentaje de adhesión a partículas de suelo y del porcentaje de hidrofobicidad

Se estimó la capacidad de adhesión de la cepa *Rhodococcus* ADH, que es una medida de la retención de las bacterias en las partículas de suelo. El porcentaje de adhesión obtenido fue del 52,1 %.

Por otro lado se estimó la hidrofobicidad, que como se ha mencionado anteriormente en Materiales y Métodos, es una propiedad que expresa la afinidad de un microorganismo por una fase orgánica. Se obtuvo un 57,1 % de hidrofobicidad para dicha cepa.

No se estimaron dichos porcentajes para el consorcio M10, debido a que al estar definido dicho consorcio como el cultivo mixto originado en un cultivo de 8 días en gasoil, su crecimiento en el medio nutritivo R3 no permitía asegurar la composición del consorcio de partida.

IV.B.4. Capacidad quimiotáctica

Un aspecto interesante de los microorganismos que parece tener una importante relación con su capacidad degradadora de PAHs en el suelo es la actividad quimiotáctica. Debido a que han sido publicados trabajos que evidencian que la movilidad y la quimiotaxis favorecen la capacidad de desorción y biodegradación de los contaminantes hidrofóbicos por parte de los microorganismos que poseen estas capacidades, el objetivo de este ensayo fue evaluar la respuesta quimiotáctica que poseen los dos inóculos bacterianos degradadores de hidrocarburos hacia algunos PAHs (aquellos que usualmente están presentes en suelos contaminados). Para esto fue utilizado el método de la “placa de swarming”.

La Figura VI.8 muestra las placas obtenidas con la cepa ADH y la Figura VI.9 las obtenidas con el consorcio M10.

La determinación de la actividad quimiotáctica evidenció que el consorcio bacteriano M10 expresó la actividad quimiotáctica hacia los PAH testeados. En cambio, la cepa ADH no evidenció actividad quimiotáctica en ninguno de los hidrocarburos analizados.

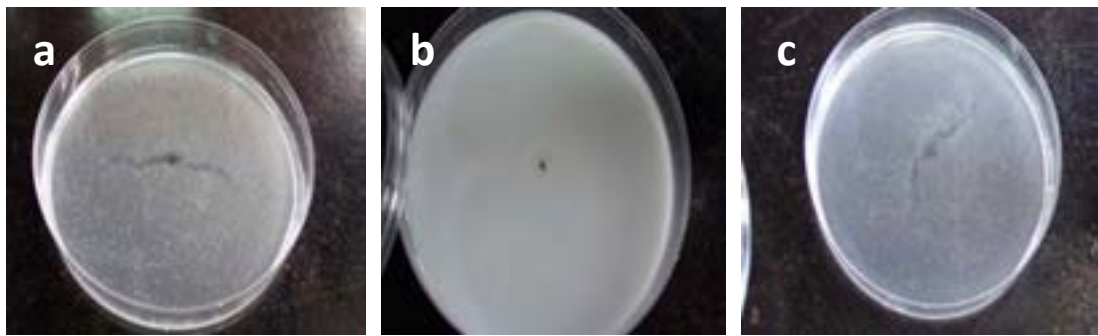


Figura VI.8. Desarrollo obtenido para la cepa ADH con el método de la “placa de swarming” en: a) fenantreno; b) pireno y c) fluoreno.

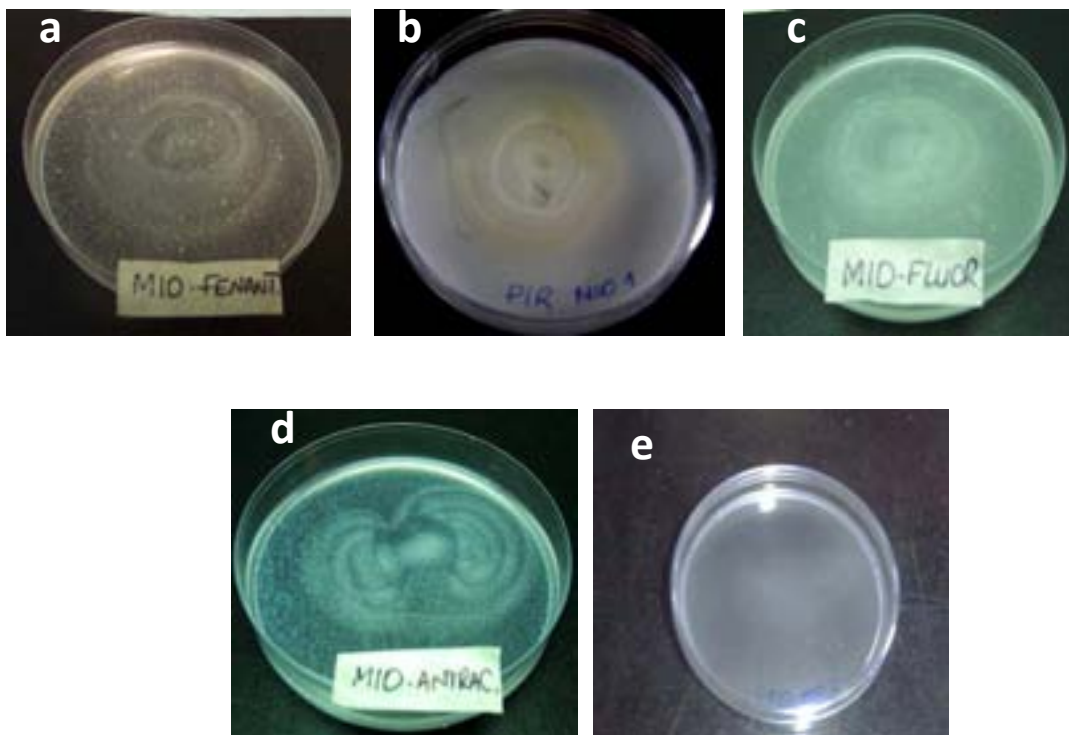


Figura VI.9. Desarrollo obtenido para el consorcio M10 con el método de la “placa de swarming” en: a) fenantreno; b) pireno; c) fluoreno y d) antraceno. En e) se exhibe el control negativo.

La formación de anillos de desarrollo concéntricos a partir del punto de siembra en las placas de M10, se interpretó como “quimiotaxis positiva” y se asocia a la capacidad de desplazamiento en grupos o “swarming”, a través de ciclos de asimilación del sustrato, crecimiento, diferenciación en células swarm y deslizamiento hacia zonas de mayor concentración de sustrato

(Sharma y Anand, 2002). La formación de halos coloreados fue interpretada como quimiotaxis positiva con la formación de productos de degradación de HAPs coloreados.

A partir de los anillos de swarming más externos donde fue inoculado el consorcio M10, se realizaron aislamientos bacterianos para intentar identificar los componentes del consorcio que presentaban ésta capacidad. Se aislaron 4 cepas bacterianas cuya descripción macro y microscópica se describe en la Tabla IV.3.

Tabla VI.3. Descripción macro y microscópica de los 4 aislamientos obtenidos de las placas de swarming del consorcio M10. Se incluye también las secuencias relacionadas con mayor grado de similitud para cada aislamiento.

Nombre del aislamiento	Descripción macroscópica	Descripción microscópica			Secuencia relacionada (N° de acceso)	% similitud
		Morfología y agrupamiento	Gram	Movilidad		
2-PEG	Colonia pequeña blanca-crema, borde finito transparente	Bacilo cocoide	(-)	++++	<i>Pseudomonas putida</i> GB-1, complete genome (CP000926.1)	100%
2-RE	Colonia pequeña forma redonda y blanca, centro amarillo, borde finito transparente	Bacilo cocoide	(-)	++	Idem 2-PEG	99%
3-BLA	Colonia mediana forma irregular, blanca y borde transparente	Bacilo cocoide	(-)	++++	<i>Pseudomonas putida</i> strain XJ-2 (HM641753.1)	99%
1-CHI	Colonia pequeña forma redonda y transparente, borde entero	Bacilo	(-)	+++	Idem 3-BLA	99%

Las cepas aisladas se identificaron mediante la amplificación del gen ARNr 16S y posterior secuenciación según la metodología detallada en la sección Materiales y Métodos.

Los 4 aislamientos estudiados presentaron muy alta homología (99-100 %) con cepas de *Pseudomonas putida* (Phylum: *Proteobacteria*) depositadas en los bancos de datos consultados (ver Tabla IV.3). Si bien las conclusiones basadas en secuencias parciales deben ser tomadas con precaución y posteriormente confirmadas realizando la secuenciación total del gen, es posible que los 4 aislamientos pertenezcan al mismo integrante del consorcio M10, una cepa de *Pseudomonas putida* con alta capacidad quimiotáctica.

IV.B.5. Formación de biofilm

En el sistema suelo los contaminantes suelen adsorberse a los constituyentes orgánicos de ésta matriz. En muchos casos, las bacterias degradadoras, para acceder en forma eficiente al contaminante adsorbido, necesitan adherirse a la superficie mediante la formación de un biofilm. El desarrollo del mismo es determinado por el balance en los procesos de adherencia, crecimiento y liberación de las células que lo conforman (Hunt y col., 2004).

Con la intención de estudiar el comportamiento de la cepa pura ADH frente a superficies inertes, se determinó la capacidad de inicio de formación del biofilm sobre una superficie de tipo hidrofóbica: poliestireno. No se realizó la cinética de formación de biofilm para el consorcio M10, nuevamente debido a que al estar definido dicho consorcio como el cultivo mixto originado en un cultivo de 8 días en gasoil, su crecimiento en el medio nutritivo R3 no permitía asegurar la composición del consorcio de partida.

La Figura VI.10 muestra la cinética de formación de biofilm sobre poliestireno de la cepa ADH. La medición de DO_{580nm} nos permite evaluar qué proporción de células bacterianas de un cultivo crecido en un tubo de poliestireno, se adhirieron a las paredes del mismo formando un biofilm, luego de un tiempo de incubación adecuado. Esta cepa no mostró una fase Lag, y mostró una importante velocidad de adsorción a poliestireno en las primeras 5 horas de incubación. A partir de este tiempo los valores se mantuvieron aproximadamente estables hasta las 40 horas.

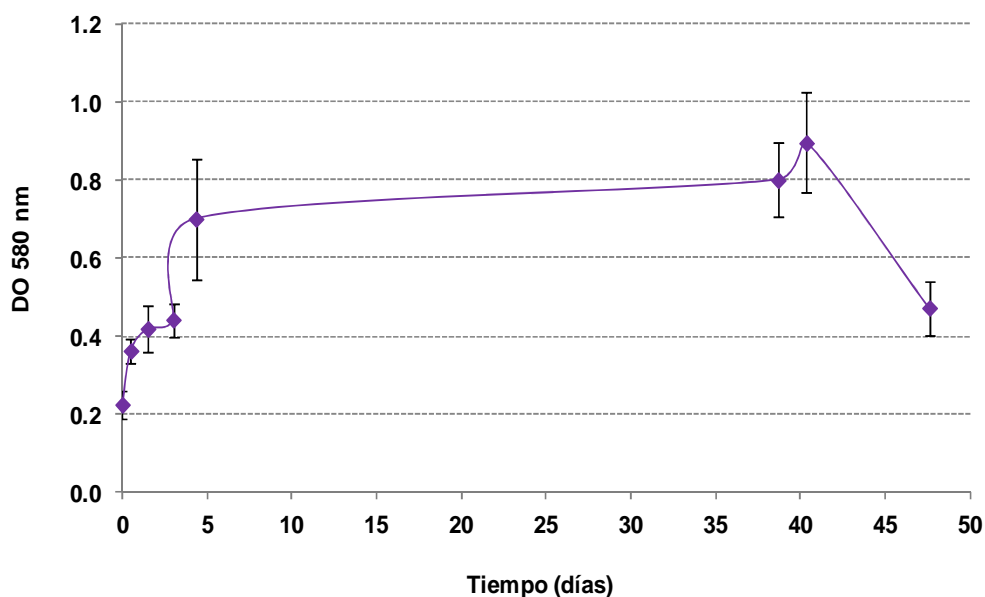


Figura VI.10. Cinética de inicio de formación de biofilm sobre tubos de poliestireno de la cepa ADH. Las barras representan la DS de triplicados.

VI.C. Ensayos de bioaumentación combinado con bioestimulación utilizando microcosmos en frascos como diseño experimental

VI.C.1. Ensayo preliminar en Antártida utilizando suelo crónicamente contaminado

Utilizando como herramienta uno de los sistemas biológicos descritos previamente en este capítulo (consorcio M10), se realizó un ensayo preliminar, a escala laboratorio, inoculando el consorcio en un suelo antártico crónicamente contaminado con gasoil. El estudio se realizó en presencia de la flora autóctona del suelo y solamente se analizó la evolución de las poblaciones cultivables.

En este estudio se eligió un suelo crónicamente contaminado con el objetivo de estudiar la eficiencia degradadora del consorcio bacteriano en una situación de baja biodisponibilidad de los contaminantes y en competencia con una flora autóctona adaptada. Este ensayo se realizó por un periodo de 9 días ya que, resultados previos propios (Ruberto y col., 2009) habían sugerido que en los procesos de bioaumentación con el consorcio M10 combinado con la bioestimulación con sales inorgánicas los principales cambios en la actividad degradadora se producían durante los

primeros 10 días de ensayo. Los microcosmos planteados fueron: CC (control no tratado), SI (bioestimulado con sales inorgánicas), y SI + M10 (bioestimulado con sales inorgánicas y bioaumentado con el consorcio M10).

VI.C.1.1. Evolución de las poblaciones cultivables

La evolución de las poblaciones cultivables de bacterias heterótrofas (BH) y bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) en los diferentes microcosmos se muestran en las Figuras VI.11 y VI.12 respectivamente, expresadas como UFC por gramo de suelo seco. La bioestimulación con sales inorgánicas solas o combinadas con la inoculación del consorcio M10, no mostró un efecto significativo sobre la evolución de las BH presentes al compararla con el microcosmo CC. Sin embargo, cuando sólo se analizaron las BDH, las sales inorgánicas (microcosmo SI) mostraron un efecto positivo sobre los recuentos, el cual resultó estadísticamente significativo respecto a CC recién a partir del 5to día de iniciado el ensayo ($p < 0.01$). En el microcosmo SI + M10, la estimulación fue significativa con respecto a CC ($p < 0.01$) y también comparada con SI ($p < 0.05$). El efecto estimulante de las sales se observó desde el inicio del estudio, siendo más acentuado durante los 3 primeros días. Por último el microcosmo control CC se mostró invariable en el nivel de BDH a lo largo del ensayo.

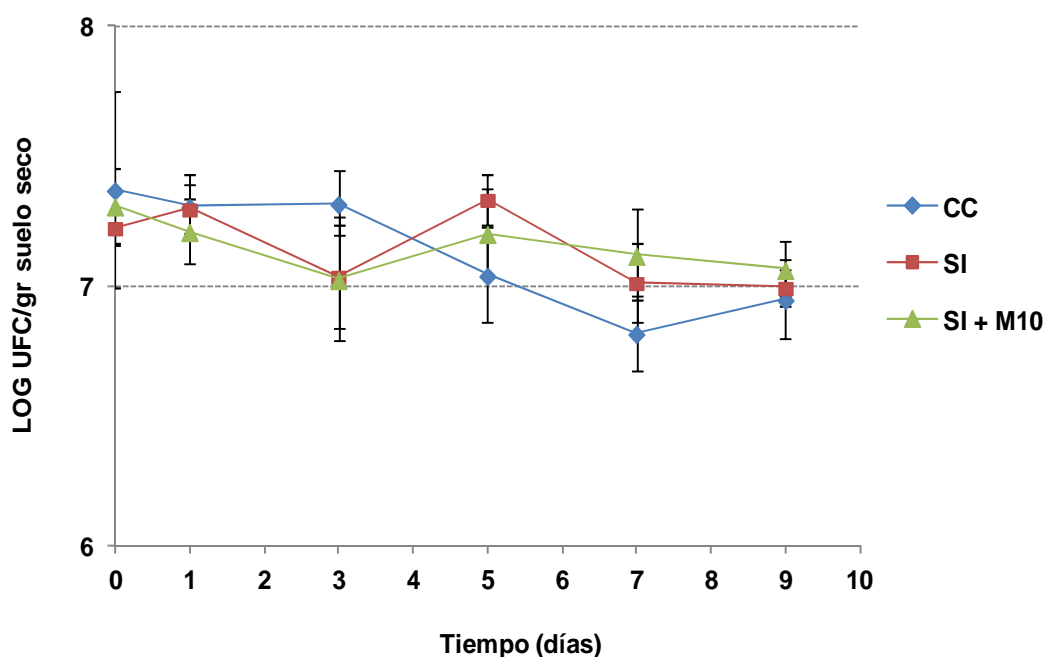


Figura VI.11. Evolución de los recuentos de las BH en los diferentes microcosmos durante los 10 días de ensayo. Las barras representan la DS de triplicados.

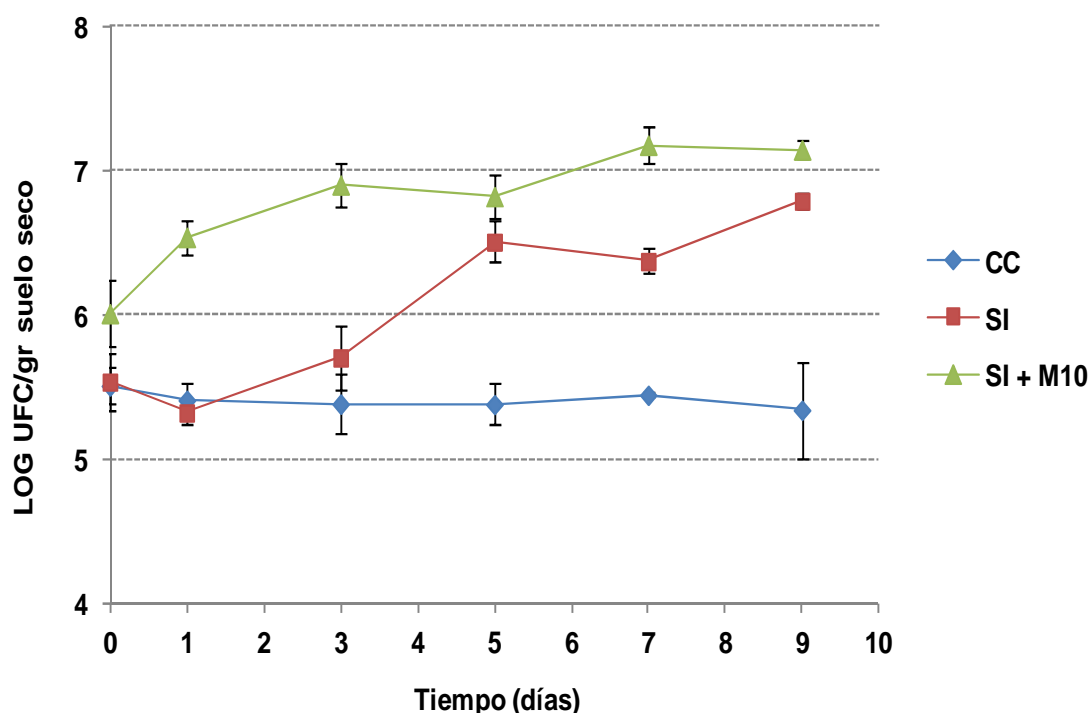


Figura VI.12. Evolución de los recuentos de BDH en los diferentes microcosmos durante los 10 días de ensayo. Las barras representan la DS de triplicados.

Puede remarcarse que, al nivel de inóculo utilizado ($2,1 \times 10^6$ UFC/g), el agregado de M10 no produjo diferencias apreciables en los valores de BH en el microcosmo inoculado al inicio del estudio con respecto a aquellos que no lo fueron. Por el contrario, la inoculación es detectable por el mayor nivel de recuento cuando sólo se evalúan las BDH. Este efecto se aprecia desde el inicio del ensayo (aunque estadísticamente no es significativo a ese tiempo). Llama la atención la tendencia a igualarse que presentan los valores de BDH en los microcosmos SI y SI + M10, tendencia que ha sido observada con anterioridad en suelos crónicos bioestimulados con sales inorgánicas.

VI.C.2. Ensayo en los laboratorios de Buenos Aires

Basados en los resultados preliminares obtenidos en el ensayo anterior en la Antártida, que habían mostrado que la presencia de un inóculo bacteriano generaba una diferencia significativa en el número de BDH durante los primeros días, aún en un suelo con contaminación crónica, se

realizó un estudio posterior en los laboratorios de Buenos Aires. En este ensayo, se evaluaron ambos inóculos cuya caracterización se presentó en la sección anterior (ADH y M10) solos o combinados con distintos nutrientes. En este caso, el suelo utilizado fue un suelo prístino, sin historia previa de exposición a los hidrocarburos. La utilización en este ensayo de un suelo con contaminación aguda se basó en trabajos previos que refieren que el bioaumentación podría ser una herramienta efectiva para aumentar la velocidad de degradación en suelos recientemente contaminados, situación en la cual los contaminantes están más biodisponibles, o sea más accesibles para ser degradados por las bacterias inoculadas (Mrozika y Piotrowska-Seget, 2010, Ruberto y col. 2010). El suelo utilizado se esterilizó antes del estudio para poder evaluar la acción de los inóculos en ausencia de competencia con la flora autóctona presente, ya que también ha sido frecuentemente citado que el bioaumentación es exitoso cuando no existe una flora autóctona previamente adaptada a tolerar y degradar los contaminantes (Vogel, 1996).

Se plantearon los siguientes microcosmos: ADH ó M10, ADH ó M10 + SI (cepa ADH ó consorcio M10 y sales inorgánicas), ADH ó M10 + HP (cepa ADH ó consorcio M10 y harina de pescado) y ADH ó M10 + NPK (cepa ADH ó consorcio M10 y fertilizante NPK).

IV.C.2.1 Evolución de las poblaciones cultivables

La evolución de las poblaciones cultivables de bacterias heterótrofas (BH) en los microcosmos inoculados con la cepa ADH y con el consorcio M10 se muestra en las Figuras VI.13 y VI.14 respectivamente, expresada como UFC por gramo de suelo seco. Cabe señalar que como el suelo fue esterilizado, los recuentos evaluados corresponden solamente al inóculo agregado al suelo. Por esta misma razón no se analizaron adicionalmente las poblaciones de BDH, ya que todos los microorganismos recuperados en los diferentes tiempos de muestreo provienen de los inóculos agregados al inicio del estudio.

Respecto a los microcosmos inoculados con ADH (Figura VI.13), todos mostraron una estimulación de los recuentos hasta los 7 días, para luego estabilizarse hasta el final del ensayo. ADH (sin bioestimar) no mostró diferencias estadísticamente significativas con el microcosmo bioestimulado con harina de pescado, ADH + HP, ni con ADH + SI. Este último mostró un leve efecto inhibitorio durante los primeros 30 días de ensayo. De esto se infiere que bajo las condiciones ensayadas, la bioestimulación con la harina de pescado o con sales inorgánicas en la

concentración probada no mejoró el desarrollo de la cepa ADH en comparación con el microcosmo no bioestimulado. ADH + NPK por su parte, exhibió una menor estimulación del crecimiento ($p < 0.05$) que la lograda en el resto de los microcosmos, lo que podría sugerir algún tipo de efecto inhibitorio.

En relación a los microcosmos inoculados con M10 (Figura VI.14), el incremento en los recuentos de BH se extendió, en todos los microcosmos, hasta los primeros 15 días. El suplemento de harina de pescado mostró nuevamente una evolución de los recuentos similar al mostrado por el microcosmo solamente bioaumentado con M10, no mostrando diferencias estadísticamente significativas. El microcosmo bioestimulado con sales inorgánicas no ejerció efectos significativos sobre el crecimiento del consorcio, exhibiendo una disminución gradual de los recuentos hacia el final del ensayo, lo que determinó que, comparando sólo los valores a ese tiempo (56 días) el microcosmo M10 + SI resultara significativamente menor ($p > 0.001$) que el microcosmo M10. Al igual que con la cepa ADH, el microcosmo con NPK exhibió un significativo menor nivel de biomasa durante todo el ensayo ($p > 0.001$).

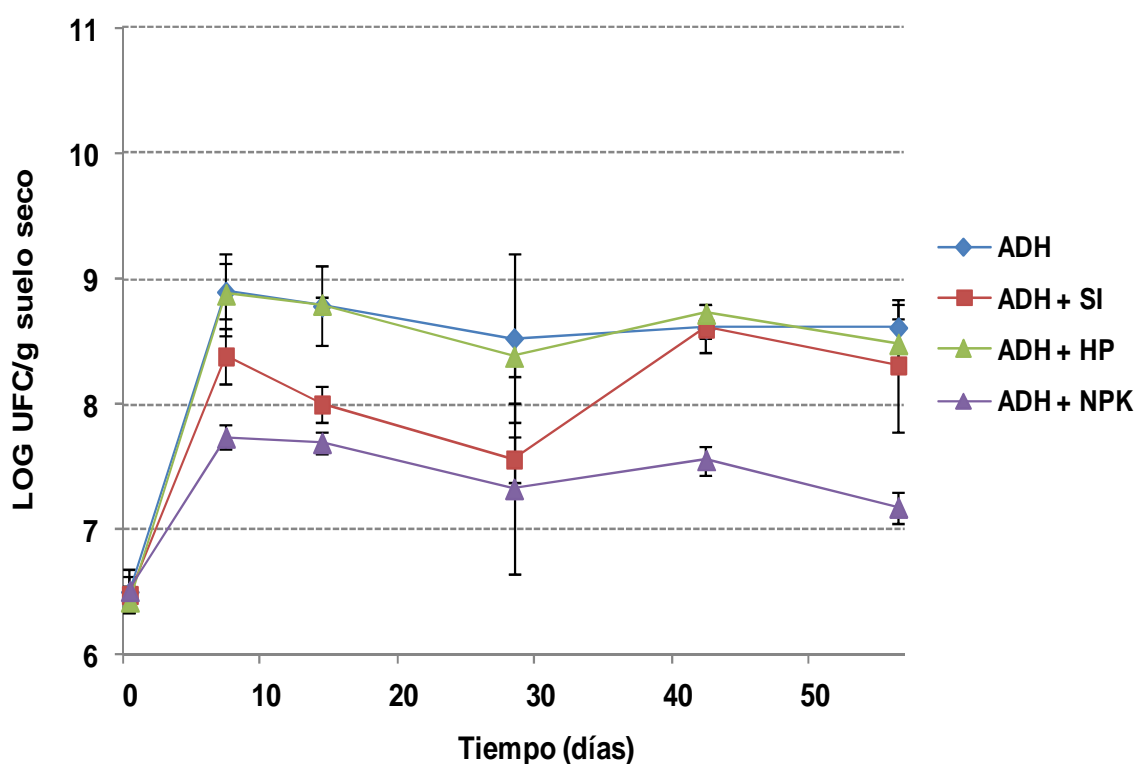


Figura VI.13. Evolución de los recuentos de bacterias heterótrofas (BH) en los distintos microcosmos inoculados con la cepa ADH y bioestimulados con distintos nutrientes. Las barras representan la DS de triplicados.

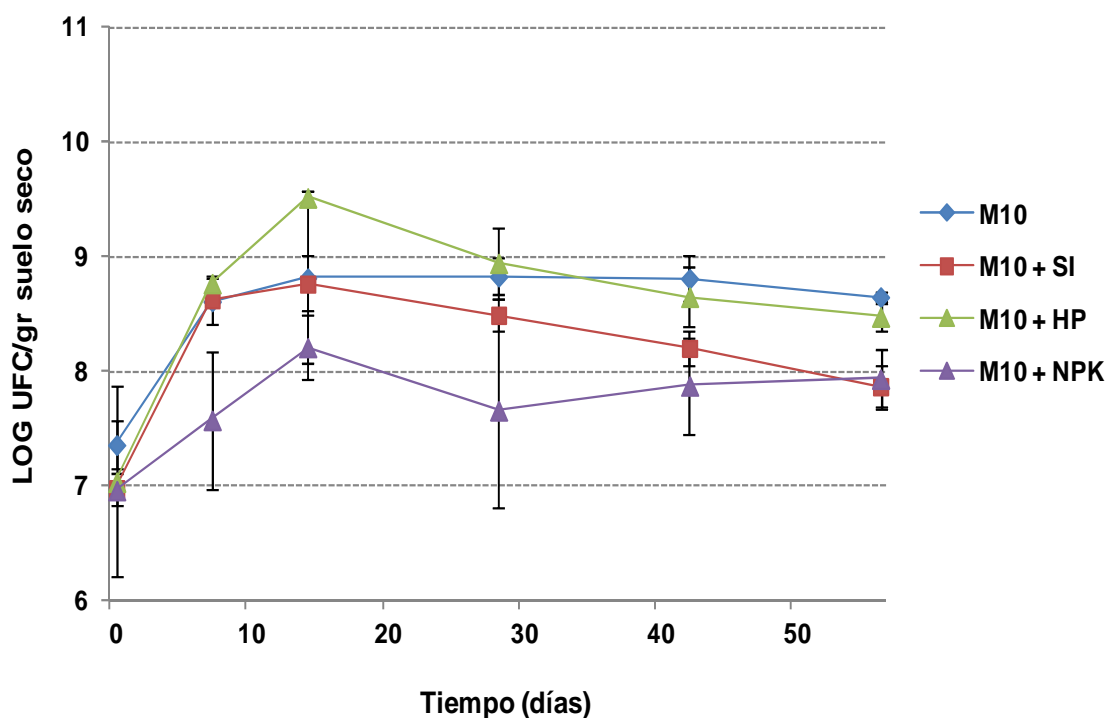


Figura VI.14. Evolución de los recuentos de bacterias heterótrofas (BH) en los distintos microcosmos inoculados con el consorcio M10 y bioestimulados con distintos nutrientes. Las barras representan la DS de triplicados.

IV.C.2.2. Eliminación de hidrocarburos totales del suelo

Las Figuras VI.15 y VI.16 muestran los valores de HT a tiempo inicial (t_0) y los valores obtenidos en los diferentes microcosmos al tiempo final del ensayo (t_{56}).

El microcosmo CA (control abiótico) mostró una eliminación de hidrocarburos cercana al 21 %, exhibiendo en ambos casos diferencias estadísticamente significativas con el t_0 ($p < 0.05$). Esta pérdida abiótica fue producida por los diferentes mecanismos físicos y químicos (evaporación, fotooxidación, lavado, entre otros) que operan en el suelo durante el proceso.

Cuando se compararon los porcentajes de eliminación de los microcosmos inoculados con ADH con el sistema control (CA), la cepa ADH evidenció una importante capacidad de remoción de HT (61 %) a los niveles de nutrientes presentes en el suelo sin bioestimar ($p < 0.001$). En concordancia con lo observado en los recuentos bacterianos, la capacidad de remoción del microcosmo ADH + HP mostró un porcentaje de remoción similar (57 %),

($p < 0.001$). El microcosmo bioestimulado con sales inorgánicas mostró diferencias significativas respecto a CA (62 %, $p < 0.001$). Por último, NPK mostró la menor eficiencia degradadora (24 %) lo que sugiere un efecto inhibitorio del fertilizante NPK sobre la eficiencia de eliminación de HT bajo las condiciones ensayadas, resultado coincidente con lo observado en los recuentos de BH. Ni la presencia de harina de pescado, ni la presencia de sales mejoró significativamente la remoción de HT respecto al microcosmo solamente inoculado, ADH, por lo que se puede inferir que el agregado de nutrientes no mejoró la eficiencia de eliminación de HT por parte de la cepa ADH, la cual con los nutrientes presentes en el suelo logró una importante eficiencia de eliminación de HT.

Cuando se analizaron los microcosmos inoculados con M10 (Figura VI.16), respecto a CA el consorcio M10 mostró un 33 % de eliminación de HT ($p < 0.05$). En presencia de harina de pescado (M10 + HP) y de las sales inorgánicas (M10 + SI), M10 perdió eficiencia degradadora bajo las condiciones ensayadas, observándose niveles de remoción de sólo 18 % y 5 % respectivamente (no significativos). En el microcosmo con NPK se observó un 62 % de eliminación ($p < 0.05$ respecto a CA). Sin embargo, cuando se comparó el microcosmo solamente inoculado con M10 respecto a los microcosmos bioestimulados con nutrientes, el nutriente NPK fue el único que mostró una tendencia clara a mejorar la eliminación de HT, con un 43 % de remoción con respecto a M10 ($p < 0.05$).

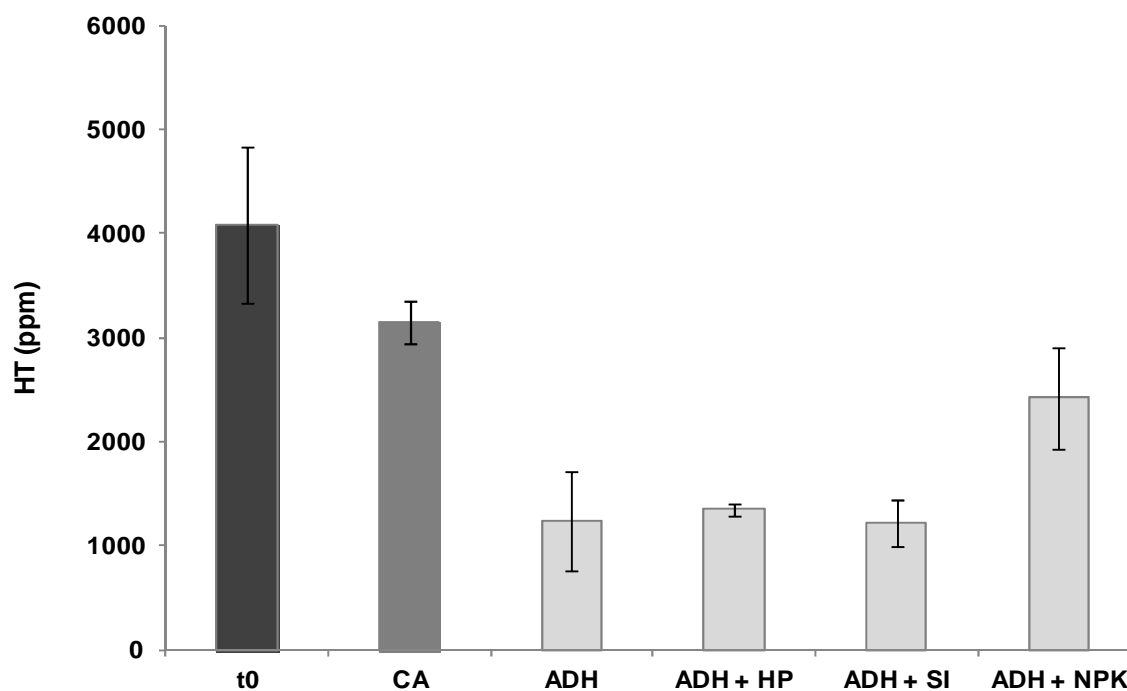


Figura VI.15. Hidrocarburos totales (ppm) a tiempo inicial (t_0) y a los 56 días (barras grises) para cada uno de los microcosmos inoculados con la cepa ADH y el microcosmo control (CA). Las barras representan la DS de triplicados.

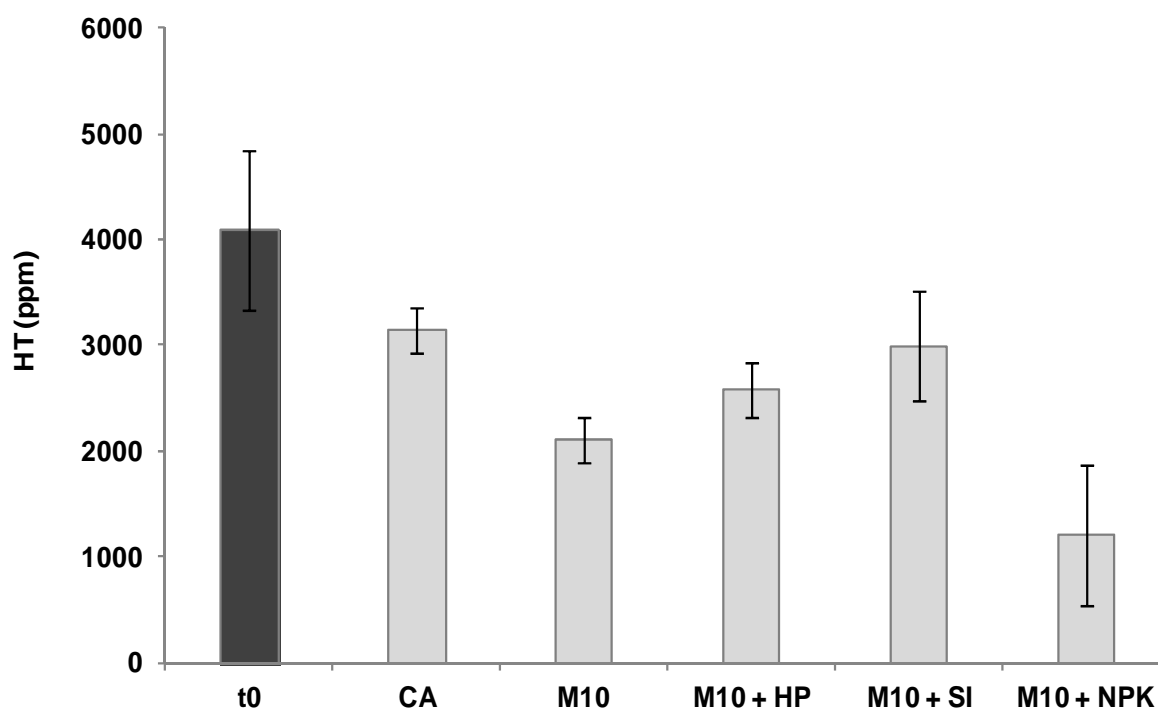


Figura VI.16. Hidrocarburos totales (ppm) a tiempo inicial (t_0) y a los 56 días (barras grises) para cada uno de los microcosmos inoculados con el consorcio M10 y el microcosmo control (CA). Las barras representan la DS de triplicados.

VI.C.3 Ensayo *on site* utilizando biopilas como diseño experimental

En este estudio sobre la influencia del bioaumentación, se reemplazaron los microcosmos en frascos por biopilas *on site* (diseño utilizado también en el Capítulo IV, Sección C) y se analizó la actividad degradadora del consorcio M10 combinado con la bioestimulación con sales inorgánicas sobre un suelo crónicamente contaminado, estrategia que mostró una mayor estimulación de los recuentos de BDH en el ensayo preliminar de laboratorio descrito en el apartado VI.B.1. Cabe aclarar que el suelo utilizado en este ensayo es el mismo que el utilizado en el *Ensayo preliminar en Antártida utilizando suelo crónicamente contaminado* descrito en este mismo y en los ensayos de parcelas y Biopilas I del capítulo IV. Los microcosmos planteados fueron: CC (control no tratado) y M10 + SI (consorcio M10 y sales inorgánicas).

VI.C.3.1. Actividad microbiana deshidrogenasa

Como se mencionó en capítulos anteriores (sección IV.B.4), en este ensayo se determinó la actividad de la enzima deshidrogenasa con el objetivo de evaluar el impacto del contaminante sobre la capacidad oxidativa de los microorganismos presentes en el suelo.

La Figura VI.17 muestra la evolución de la actividad deshidrogenasa del microcosmo control CC y del microcosmo M10 + SI.

El microcosmo inoculado con el consorcio M10 mostró un aumento de la actividad deshidrogenasa a partir del día 10, mostrando un pico máximo de actividad a los 30 días para luego disminuir. La actividad deshidrogenasa del microcosmo control comenzó a aumentar a partir de los 15 días pero se mantuvo por debajo de la actividad del microcosmo inoculado con M10 entre los 20 y 30 días ($p < 0.01$) para igualarse al final del estudio.

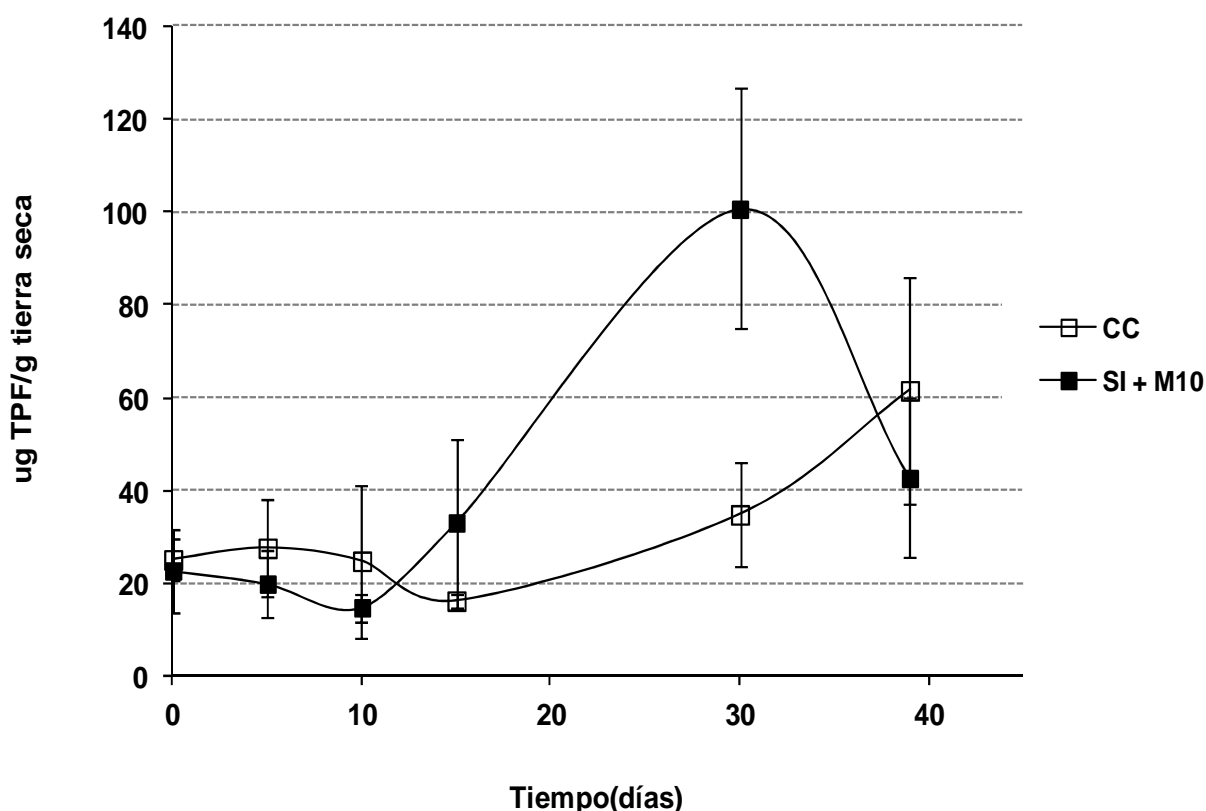


Figura VI.17. Evolución de la actividad deshidrogenasa (μg de TPF/g de tierra seca) para cada microcosmo durante el proceso de biorremediación. Las barras representan la DS de triplicados.

VI.C.3.2. Evolución de las poblaciones cultivables

El efecto de la inoculación con el consorcio M10 se estudió mediante la evolución de las poblaciones cultivables de BH (Figura VI.18) y BDH (Figura VI.19), expresadas como UFC por gramo de suelo seco.

De manera similar a lo observado en el ensayo en frascos, la inoculación con el consorcio M10 no mostró un efecto significativo sobre los valores de BH al compararlos con los observados en el microcosmo control CC. Ambos microcosmos mostraron valores aproximadamente constantes a lo largo del ensayo, si bien a partir del día 10, el microcosmo inoculado mostró una tendencia constante pero no significativa a presentar valores mayores de BH. Este comportamiento fue coincidente con el aumento de la actividad deshidrogenada observada en dicho microcosmo.

Respecto a la evolución de las BDH, la inoculación con el consorcio M10 combinado con la bioestimulación con sales inorgánicas, generó un incremento de las BDH, cuyos valores aumentaron paulatinamente durante todo el ensayo a una tasa aproximadamente constante, aunque menor a la observada en los microcosmos en frascos. Debe tenerse en cuenta que los niveles de inóculo fueron muy similares en ambos casos: se inocularon 3×10^6 UFC/g del consorcio M10 en este ensayo y $2,1 \times 10^6$ UFC/g en el ensayo preliminar en frascos. Al igual que lo observado en los frascos, la presencia del inóculo se hizo muy evidente desde el muestreo inicial de BDH, mostrando valores significativamente mayores a los registrados en el microcosmo CC. Al igual que la evolución apreciada de BH, el ligero aumento observado en BDH a partir de los 15 días fue coincidente con el aumento de la actividad deshidrogenada, sugiriendo la activa participación de la población degradadora a la actividad total de la comunidad. Por último, el microcosmo control CC se mostró invariable en el crecimiento de las BDH a lo largo del ensayo, mostrando sólo un aumento de estas poblaciones cultivables a los 15 días de ensayo.

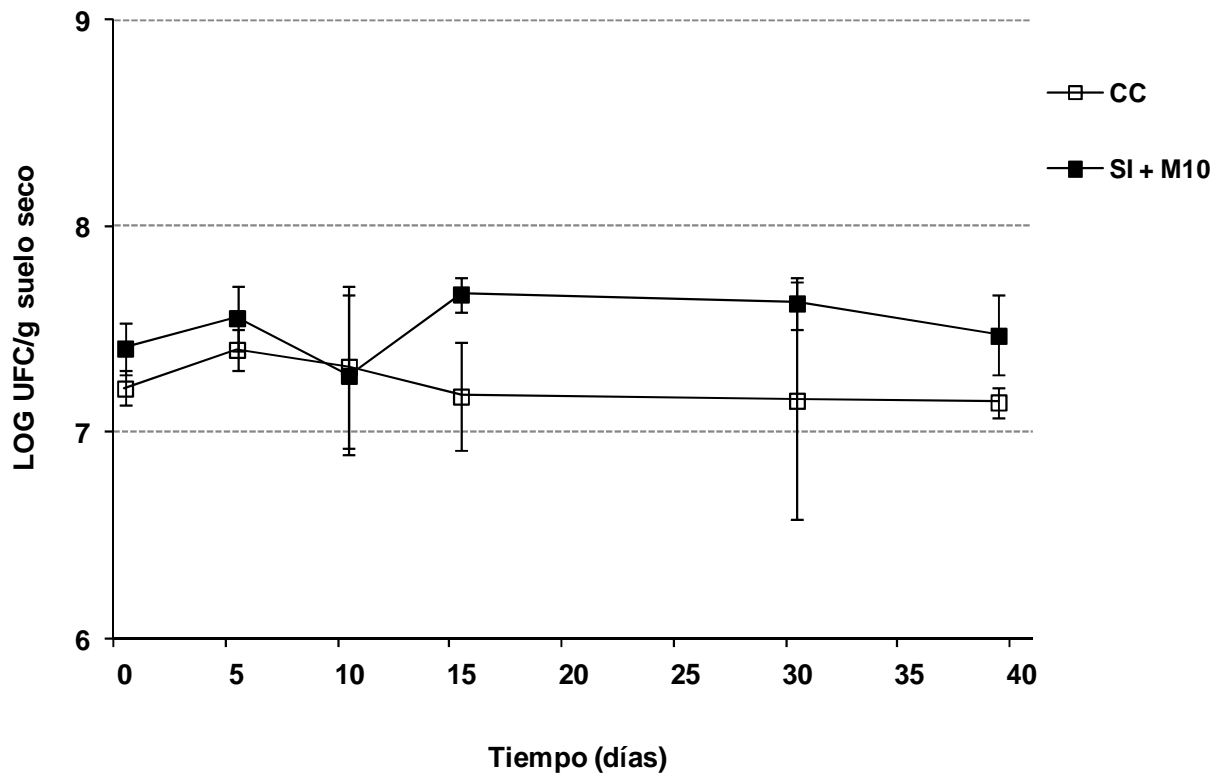


Figura VI.18. Evolución de los recuentos de BH en las biopilas evaluadas durante el ensayo de biorremediación de un suelo antártico crónicamente contaminado. CC: suelo control, sin tratamiento; SI+M10: suelo fertilizado con sales inorgánicas y bioaumentado con el consorcio M10. Las barras representan la DS de triplicados.

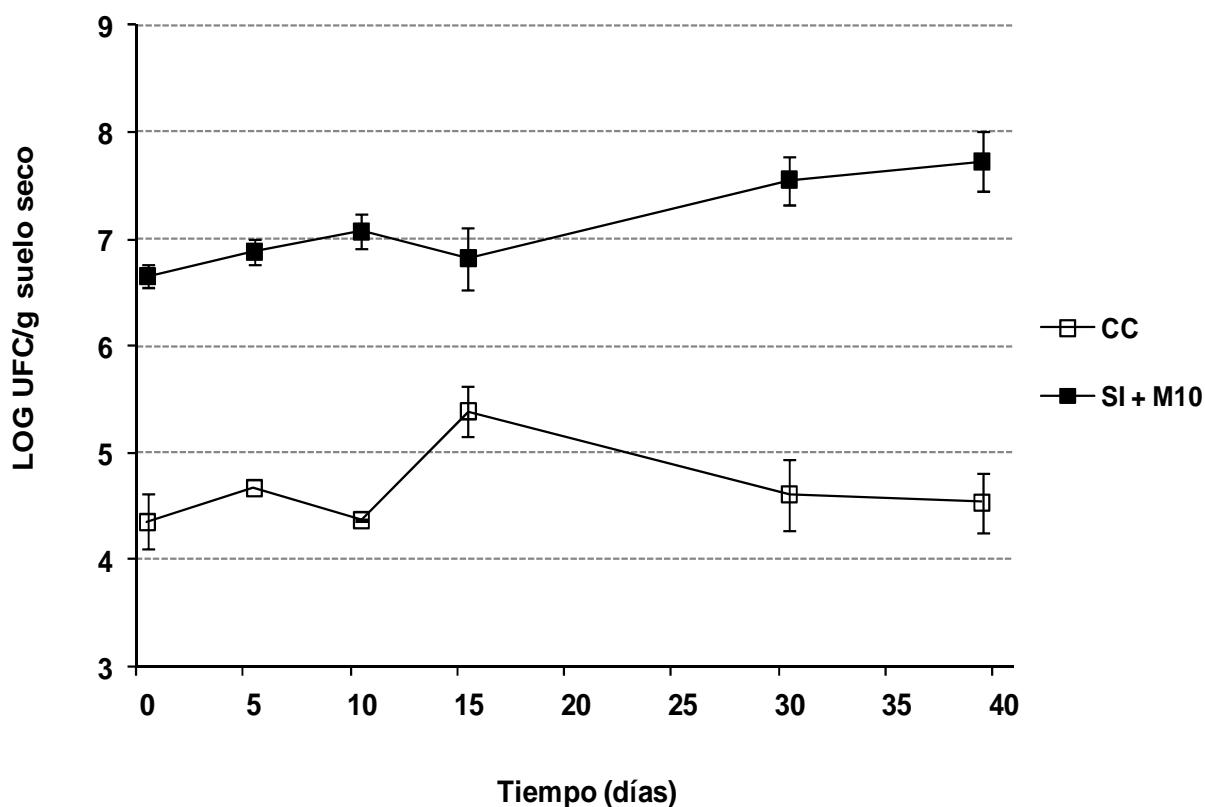


Figura VI.19. Evolución de los recuentos de BDH en las biopilas evaluadas durante el ensayo de biorremediación de un suelo antártico crónicamente contaminado. CC: suelo control, sin tratamiento; SI + M10: suelo fertilizado con sales inorgánicas y bioaumentado con el consorcio M10. Las barras representan la DS de triplicados.

VI.C.3.3. Eliminación de hidrocarburos totales del suelo

En la Figura VI.20 se muestra el valor del contenido de HT a tiempo inicial y los valores encontrados en los microcosmos CC y SI + M10 al tiempo final del ensayo (39 días).

Si bien el CC evidenció la existencia de una reducción del 19.3 % de los HT con respecto al tiempo inicial, esta diferencia no llegó a ser significativa. Por el contrario, SI + M10 mostró tasas de remoción del 36.6 % con respecto al suelo a t0 ($p < 0,001$) y del 21 % con respecto a CC al tiempo final ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren cierta eficiencia de la estrategia de bioaumentación con M10, así mismo vuelven a sugerir que los valores de remoción atribuibles a los procesos abióticos y la degradación biológica natural son bajos en los sistemas de biopilas en comparación con aquellos que presentan una relación superficie/volumen mayor.

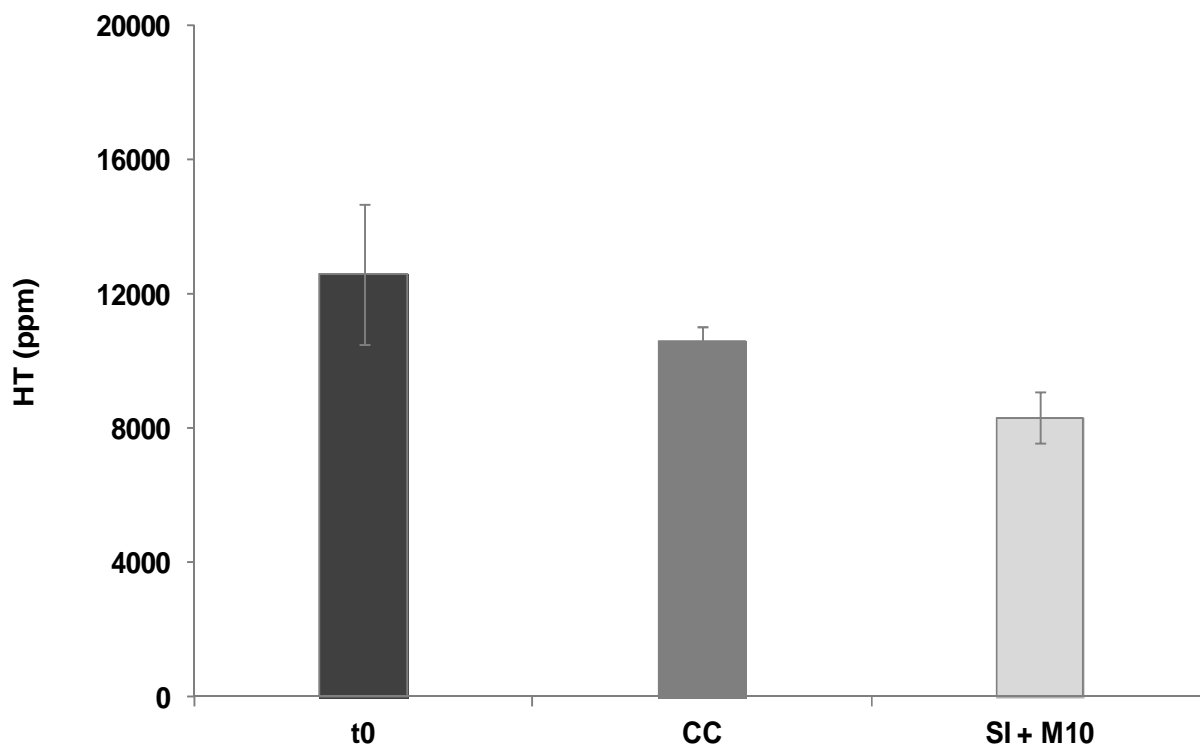


Figura VI.20. Hidrocarburos totales (ppm) a tiempo inicial (t0,) y a los 39 días de tratamiento (barras grises) para cada microcosmo. Las barras representan la DS de triplicados.

VI.C.3.4. Dinámica de las comunidades bacterianas

VI.C.3.4.a. Análisis de la estructura de la comunidad por DGGE

En la Figura VI.21 se puede observar la imagen obtenida del gel de DGGE de los microcosmos CC y SI + M10 a los 0, 5, 10, 39 y 365 días de ensayo.

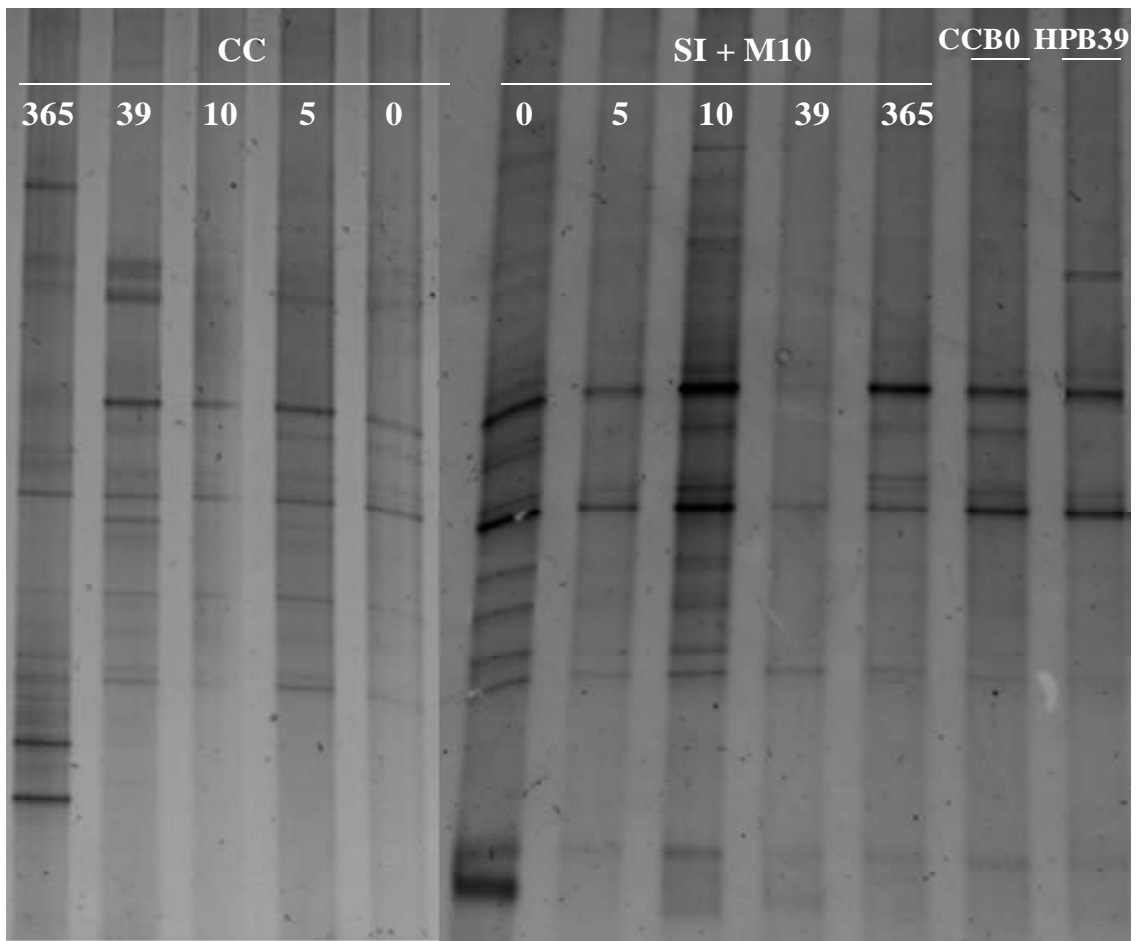


Figura VI.21. Estimación de la estructura de la comunidad bacteriana en los microcosmos CC y SI + M10 a los 0, 5, 10, 39 y 365 días del ensayo de bioestimulación y bioaumento en biopilas. Las calles CCB0 y HPB39 corresponden a los patrones de corrida.

El dendrograma que muestra la evolución de la estructura de las comunidades bacterianas de ambos microcosmos a lo largo de la campaña de verano (tiempos 0, 5, 10 y 39 días) se presenta en la Figura VI.22. Se puede observar que el microcosmo CC a t_0 se ubicó en un cluster distinto al resto de las muestras. El resto de las muestras del microcosmo CC, a partir de los 5 días de iniciado el ensayo, formaron otro subcluster, evidenciando rápidos cambios en las comunidades bacterianas. Nuevamente, estos cambios pueden relacionarse con el efecto causado durante la preparación del suelo (aireación, mantenimiento de la humedad, etc). Por otro lado, los cambios en las comunidades bacterianas presentes en el microcosmo inoculado con el consorcio M10 también fueron inmediatos a partir del t_0 , se diferenciaron de los sistemas CC y se mantuvieron hasta el final del ensayo.

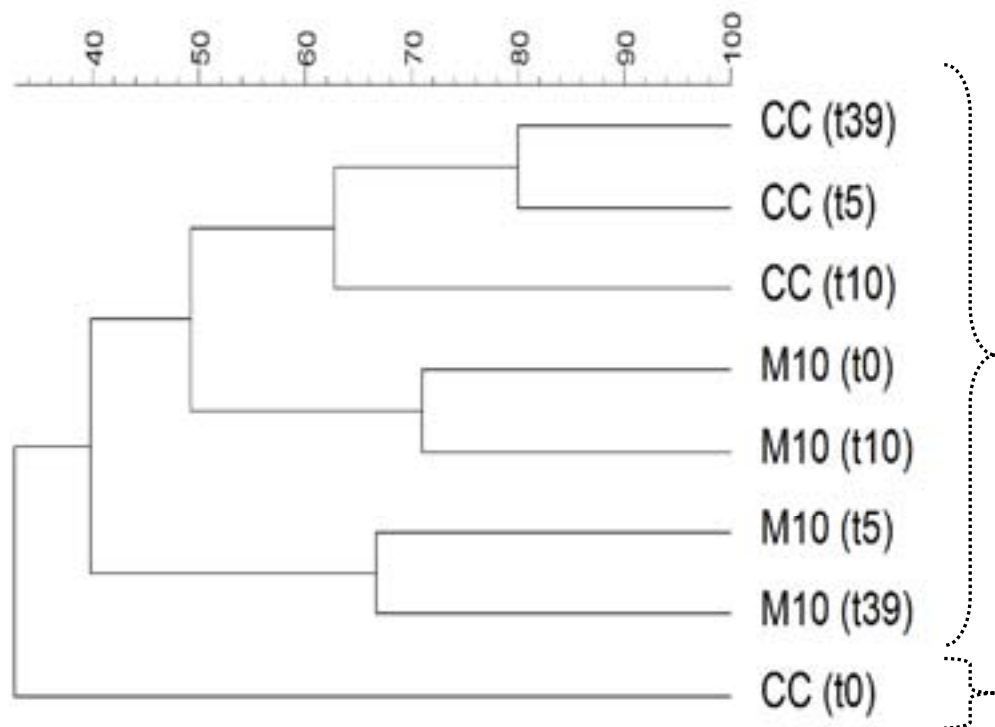


Figura VI.22. Dendrograma construido a partir de los perfiles de bandas obtenidos en el gel de DGGE de los microcosmos CC y SI + M10 muestreados durante la campaña de verano (tiempos 0, 5, 10 y 39 días). Las llaves punteadas muestran los clusters más representativos. El rótulo M10 corresponde al microcosmo SI + M10.

Dado que los sistemas también se analizaron luego de un año de tratamiento, en la Figura VI.23 se observa el dendrograma construido a partir de las muestras obtenidas al inicio y final del ensayo del verano (t0 y t39) y de la muestra obtenida al año (t365). Se puede observar claramente como los cambios generados en las comunidades bacterianas autóctonas en el microcosmo CC continuaron ocurriendo hasta un año después de iniciado el ensayo (t365). La inoculación con el consorcio M10 también mostró cambios en las comunidades bacterianas presentes al año. Dicha comunidad se agrupó con la de M10 a los 39 días, aunque mostrando un bajo % de similitud.

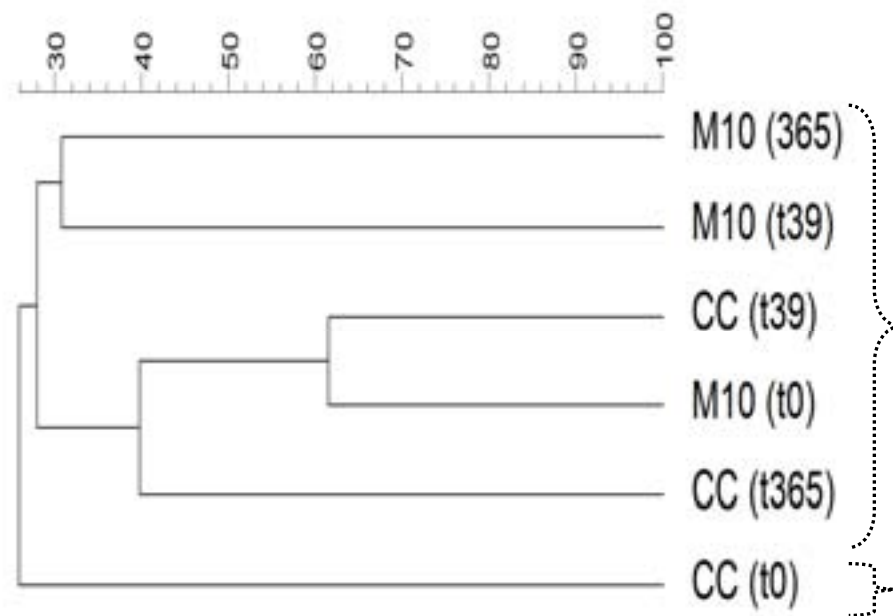


Figura VI.23. Dendrograma construido a partir de los perfiles de bandas obtenidos en el gel de DGGE de los microcosmos CC y SI + M10 a los 0, 39 y 365 días. Las llaves punteadas muestran los clusters más representativos. El rótulo M10 corresponde al microcosmo SI + M10.

VI.C.3.4.b. Estudio de la biodiversidad bacteriana

En la Tabla VI.4 se muestra la riqueza y los índices de diversidad para cada microcosmo a los 0, 5, 10, 39 y 365 días de ensayo. Cabe señalar que estos índices fueron determinados en muestras por simplificado por lo tanto serán considerados como una tendencia.

Se puede observar que el microcosmo CC mostró un aparente aumento de la diversidad en función del tiempo. Por su parte, si bien el consorcio bacteriano M10 evidenció un aumento inmediato de la diversidad al iniciar el ensayo (resultado esperable por el agregado de un inóculo mixto al suelo), luego de esto el microcosmo mostró variaciones considerables a lo largo del ensayo, observándose una tendencia a la disminución de la diversidad bacteriana. A los 365 días, el microcosmo control CC mostró mayor diversidad bacteriana que el microcosmo inoculado con M10.

Tabla VI.4. Valores de riqueza (entre paréntesis) e índices de diversidad de Shannon, (H) obtenidos para cada microcosmo a los 0, 5, 10, 39 y 365 días de ensayo.

Shannon (H)	CC	M10 + SI
t0	1.587 (6)	2.452 (17)
t5	2.062 (9)	1.551 (6)
t10	1.516 (6)	2.631 (19)
t39	2.235 (11)	1.334 (4)
t365	2.489 (15)	1.986 (9)

VI.C.4. Ensayo de bioaumentación utilizando bateas como diseño experimental y un inóculo inmovilizado

Como parte de los estudios iniciales tendientes a analizar el potencial del bioaumentación como estrategia facilitadora de la biorremediación de suelos antárticos afectados por la contaminación con hidrocarburos, se evaluó el efecto de la inoculación de una mezcla de cepas degradadoras denominada MAD. Como se describió en la sección Materiales y Métodos, la mezcla MAD está compuesta por 7 cepas obtenidas a partir del estudio del consorcio M10 más la cepa ADH descrita en el presente capítulo. El objetivo del estudio fue analizar si la reconstitución del consorcio a partir de sus componentes (mas el agregado de ADH) podía mostrar una capacidad degradadora comparable a la mostrada por el consorcio original M10. Si así fuese, se dispondría de un sistema biológico que puede construirse, cada vez que fuese necesario, a partir de aislamientos individuales, eliminando la incertidumbre en la preparación del consorcio a partir de una alícuota del stock original del mismo. Si no se conoce exactamente la composición del consorcio, cada vez que se prepara el inóculo para un proceso, no se sabría con certeza si dicho inóculo es igual al anterior, ya que cualquier modificación en los factores ambientales podría estar afectando la composición final del mismo.

En este ensayo se utilizó un suelo contaminado producto de un derrame ocurrido sólo 2 meses antes del ensayo. Además, basados en estudios previos que reportaron resultados positivos de la inmovilización del inóculo sobre la eficiencia de degradación de hidrocarburos (Rahman y col., 2006), el inóculo fue inmovilizado, en un intento por prolongar la permanencia del mismo en el

suelo bajo tratamiento, reduciendo al menos, su pérdida por lavado. Para la inmovilización se probaron diferentes soportes. Una de las matrices ensayadas fue suelo del mismo sitio, previamente esterilizado. Otros autores (Van Dyke y Prosser, 2000) han reportado que la preincubación del inóculo con un suelo esterilizado incrementa notablemente su supervivencia en el ambiente. El segundo soporte utilizado fue la turba micronizada, la cual es frecuentemente utilizada como matriz para inmovilizar los inoculantes de interés agronómico (Olsen y col., 1996) habiendo mostrado repetidamente su utilidad para ese objetivo. Finalmente, se utilizó también como soporte copos de quitina. Este material ha sido referido como apto para mantener una alta supervivencia y actividad de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos (Gentili y col. 2006). Debe aclararse que todos los microcosmos fueron además, bioestimulados con sales inorgánicas, debido a que en el ensayo en biopilas descrito anteriormente en este capítulo, se observó una eliminación significativa combinando a la inoculación del consorcio M10 con la bioestimulación con sales inorgánicas. Este nutriente fue agregado en dos etapas: al inicio del ensayo y a los 30 días del mismo. Los microcosmos planteados fueron: CC (suelo control no tratado), MAD (suelo inoculado con el consorcio MAD), TUR (suelo con el agregado de turba con consorcio MAD inmovilizado), COP (suelo con el agregado de copos de quitina con consorcio MAD inmovilizado), y SU (suelo con el agregado de suelo con estéril con consorcio MAD inmovilizado).

VI.C.4.1. Evolución de las poblaciones cultivables y el pH

La evolución de las poblaciones cultivables de BH y BDH en los diferentes microcosmos se muestran en las Figuras VI.24 y VI.25 respectivamente, expresadas como UFC gramo de suelo seco.

El microcosmo TUR (inóculo inmovilizado en turba) fue el único soporte que evidenció a tiempo inicial la presencia de microorganismos inoculados, ya que presentó valores de BH medio orden de magnitud mayor a los detectados en el microcosmo CC. TUR mostró una curva sin diferencias significativas con la curva del microcosmo MAD hasta los 5 días de ensayo, a partir de los cuales logró sostener el nivel de recuentos del inóculo alcanzado hasta finalizar el ensayo, en cambio MAD mostró una caída en los recuentos hasta un valor similar al del inicio. El microcosmo control CC también evidenció un incremento en los valores de BH, aunque siempre

manteniéndose en niveles inferiores al de TUR durante los 10 primeros días, mostrando una tendencia a igualarse a los 30 días de estudio. Por otro lado, los microcosmos SU (suelo estéril) y COP (copos de quitina) también favorecieron el crecimiento de las BH los primeros 5 días., pero partiendo de valores similares al del CC. Sin embargo, estos dos microcosmos evidenciaron luego una disminución en los recuentos que se prolongó hasta el final del ensayo y no mostraron diferencias significativas entre sí.

Respecto a las BDH (Figura VI.25), todos los microcosmos inoculados evidenciaron un nivel inicial de recuento significativamente mayor ($p < 0.01$) al CC. Además, en todos los microcosmos (incluido el CC) se observó un aumento de los valores de BDH hasta los 5-10 días. Posteriormente, todos mostraron una disminución de las BDH hasta el final del ensayo con excepción de TUR, que mantuvo aproximadamente constantes los valores hasta finalizar el ensayo (al igual que los recuentos de BH), mostrando diferencias significativas con el resto de los sistemas tanto a los 30 como a los 40 días ($p < 0.001$).

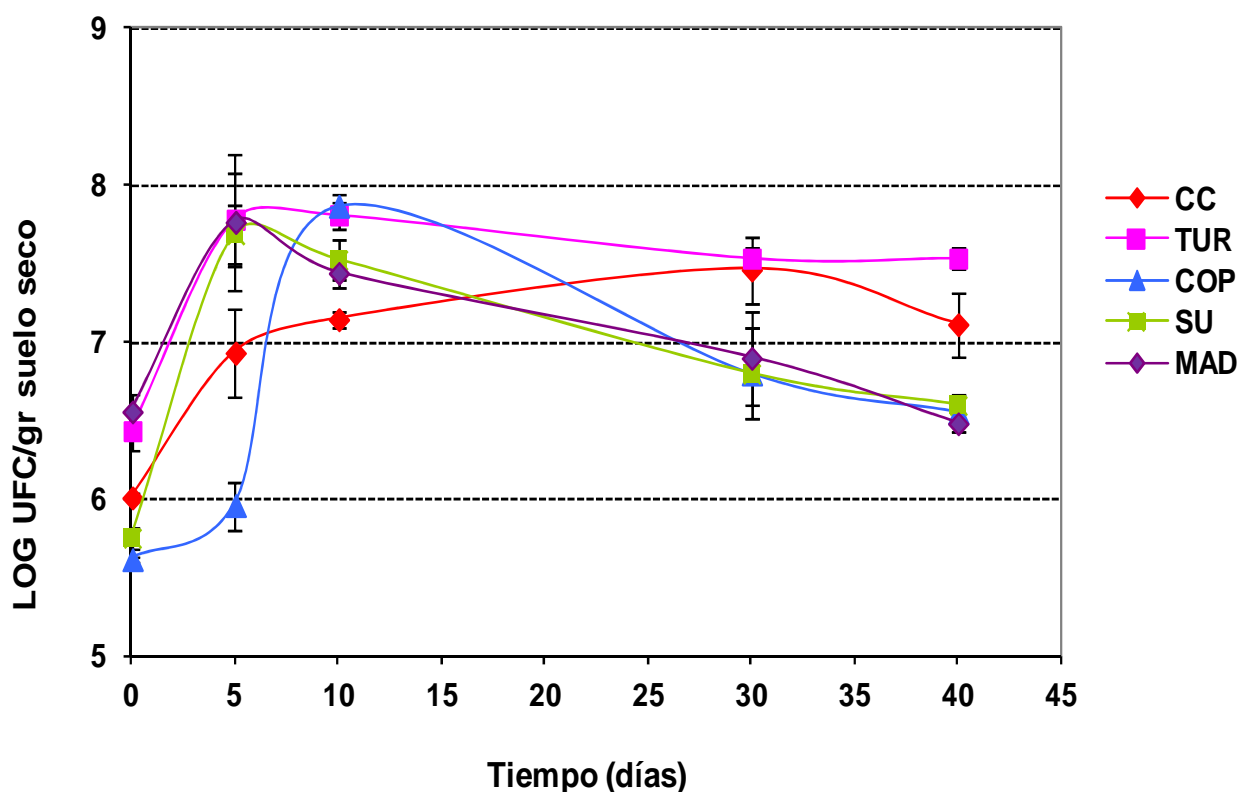


Figura VI.24. Evolución de las bacterias heterótrofas (BH) en los distintos microcosmos en donde se analizó el bioaumentación utilizando inóculos inmobilizados. Las barras representan la DS de triplicados.

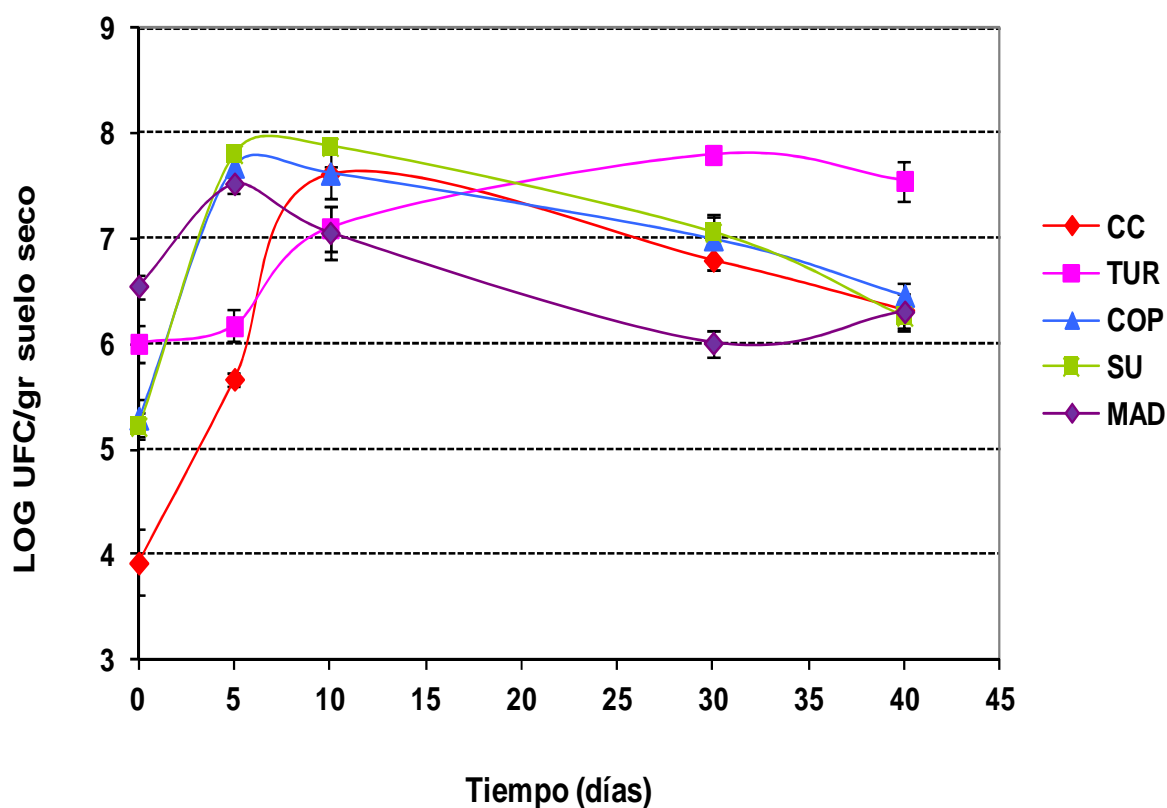


Figura VI.25. Evolución de los recuentos de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) en los microcosmos en donde se analizó el bioaumentación utilizando inóculos inmovilizados. Las barras representan la DS de triplicados.

Los valores promedio de pH para cada uno de los microcosmos durante el ensayo se muestran en la Figura VI.26. Al inicio del ensayo el pH del suelo resultó ligeramente ácido en todos los microcosmos (pH promedio: 6,5). Luego, durante el ensayo, el microcosmo CC fue el único que mostró un ligero aumento del pH. Los microcosmos MAD y TUR mantuvieron el pH hasta finalizar el ensayo y TUR alcanzó un valor de pH similar al inicial. El resto de los microcosmos mostró una leve caída, con un promedio de 5,95.

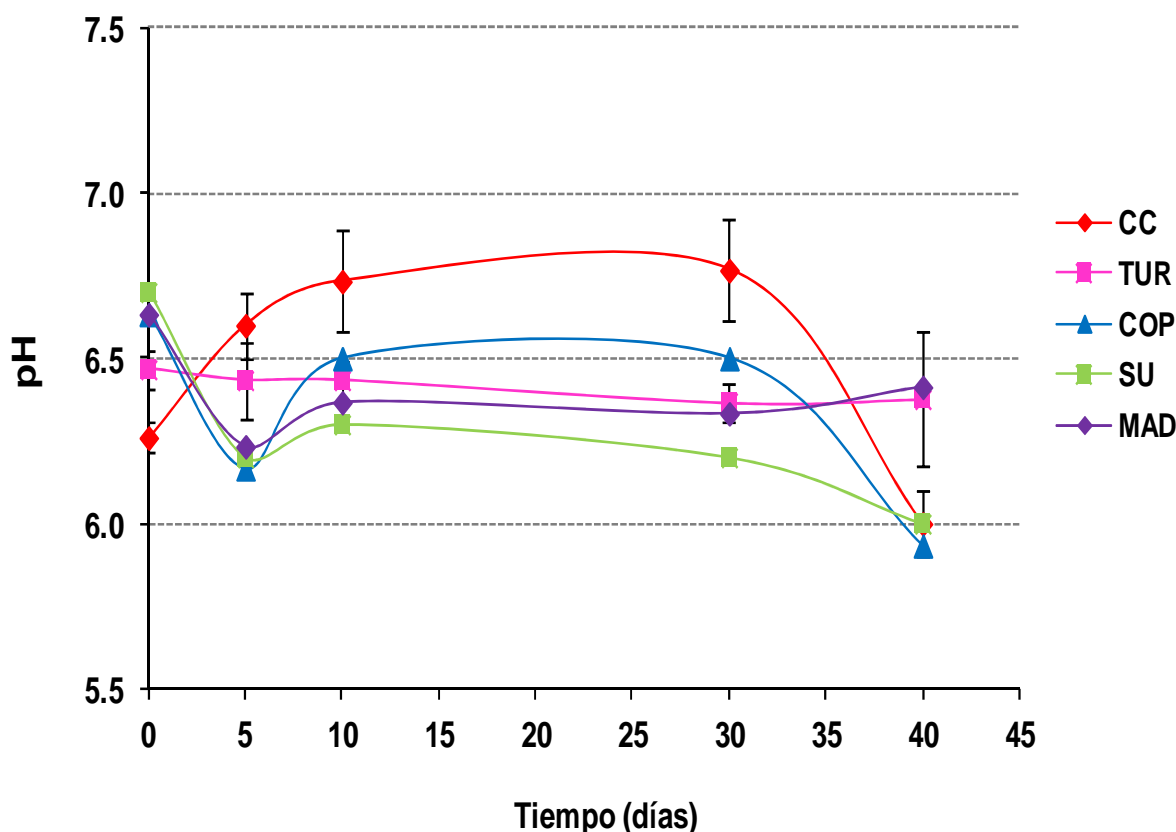


Figura VI.26. Evolución del pH del suelo durante los 40 días de ensayo en bateas con suelo contaminado en forma aguda y bioaumentado con una mezcla de cepas (MAD) inmovilizada sobre diferentes soportes. Las barras representan la DS de triplicados.

VI.C.4.2. Concentración de hidrocarburos totales

En la Figura VI.27 se muestra el valor a tiempo inicial del contenido de HT y los valores encontrados en los diferentes microcosmos al tiempo final del ensayo (t40).

A pesar del incremento detectado en los recuentos no se observó eliminación de HT en ninguno de los microcosmos inmovilizados. Además, ni el consorcio inoculado sin inmovilizar ni el control de comunidad CC mostraron valores menores a los del suelo a tiempo inicial.

Evidentemente, por factores que son difíciles de definir sin posteriores estudios, las diferentes alternativas de inmovilización del sistema biológico no tuvieron ningún efecto positivo durante la evolución de los microcosmos. Llama la atención la ausencia de remoción de hidrocarburos en el microcosmo CC, principalmente porque el suelo había recibido el aporte de hidrocarburos sólo

2 meses antes del estudio, por lo que no se lo consideraba *a priori* un modelo “crónico” sin embargo, el microcosmo CC no se comportó como un suelo “agudo”. Evidentemente, las duras condiciones ambientales antárticas, especialmente la alta tasa de evaporación, producto de los fuertes vientos, hacen que 2 meses sea un periodo suficiente para eliminar todos los componentes más volátiles y hacer que un suelo se comporte más como un suelo crónico que como uno agudo. Puede especularse también que ese tiempo sí sea insuficiente para el establecimiento de una comunidad bacteriana eficiente para degradar los hidrocarburos remanentes y, que por esa razón, la eliminación biológica en el microcosmo CC tampoco sea significativa.

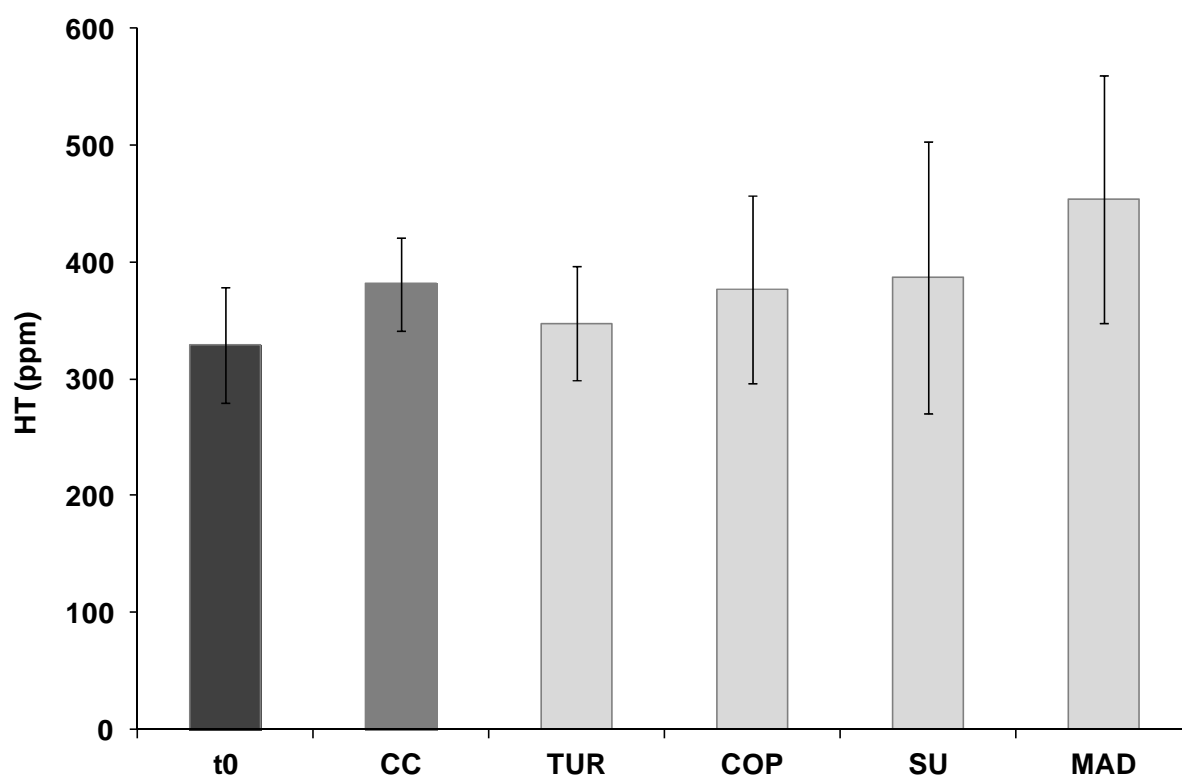


Figura VI.27. Hidrocarburos totales (ppm) al inicio del ensayo (t0,) y 39 días (barras grises) para cada microcosmo. Las barras representan la DS de triplicados.

VI.C.4.3. Observación microscópica (SEM) de las diferentes matrices utilizadas

Como parte de los estudios iniciales sobre inmovilización, se analizaron mediante MET las superficies de las diferentes matrices de inmovilización utilizadas.

Las Figuras VI.28 y VI.29, ejemplifican el aspecto de las partículas de suelo y turba respectivamente, con los componentes del consorcio MAD adheridos a ellas. Si bien se detectaron bacterias adheridas a la matriz suelo, las mismas fueron escasas. En la matriz turba, el número de células por unidad de área fue mayor, aunque no se observaron cúmulos ni formación de biofilms. Sin embargo, los copos de quitina (Figura VI.30) mostraron una mayor proporción de células del consorcio MAD adheridos a su superficie. La observación microscópica muestra que tanto la turba, como los copos de quitina son matrices adecuadas de inmovilización de M10. Sin embargo, se requerirán estudios más profundos a fin de analizar las causas por las cuales la inmovilización no resulta efectiva sobre la actividad degradadora.

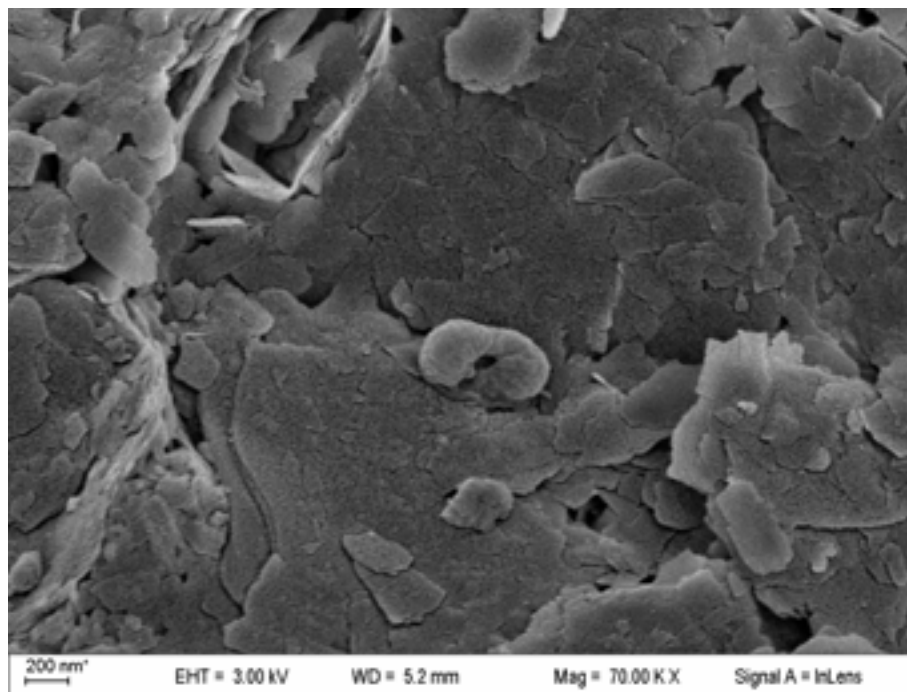


Figura VI.28. Micrografía electrónica (SEM) que muestra el aspecto de la matriz suelo con una célula del consorcio MAD asociada a ella. Magnificación: 70000X.

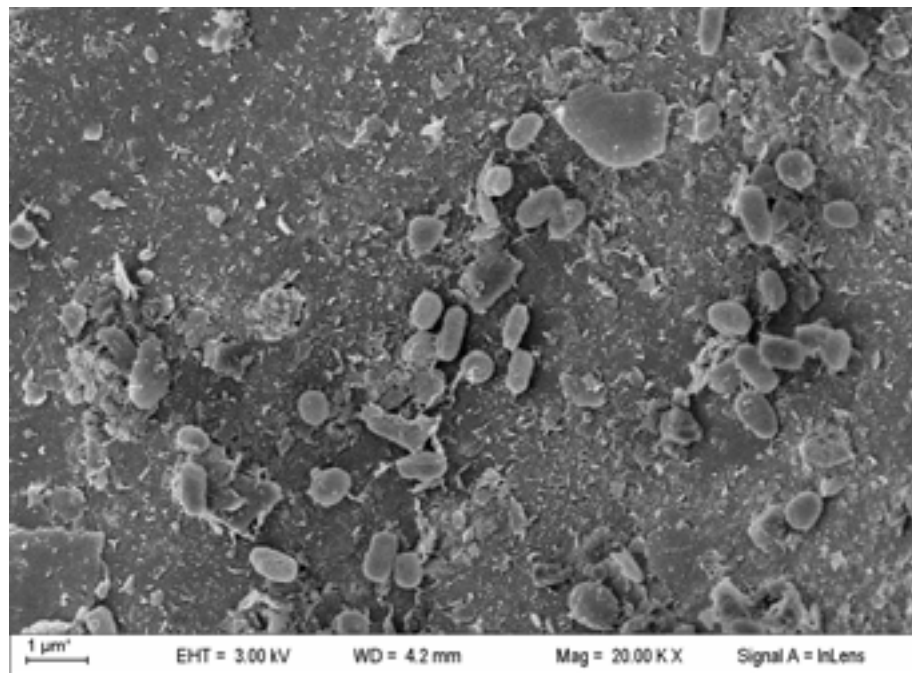


Figura VI.29. Micrografía electrónica (SEM) que muestra el aspecto de la matriz turba con algunas células del consorcio MAD asociadas sobre ella. Magnificación: 40000X.

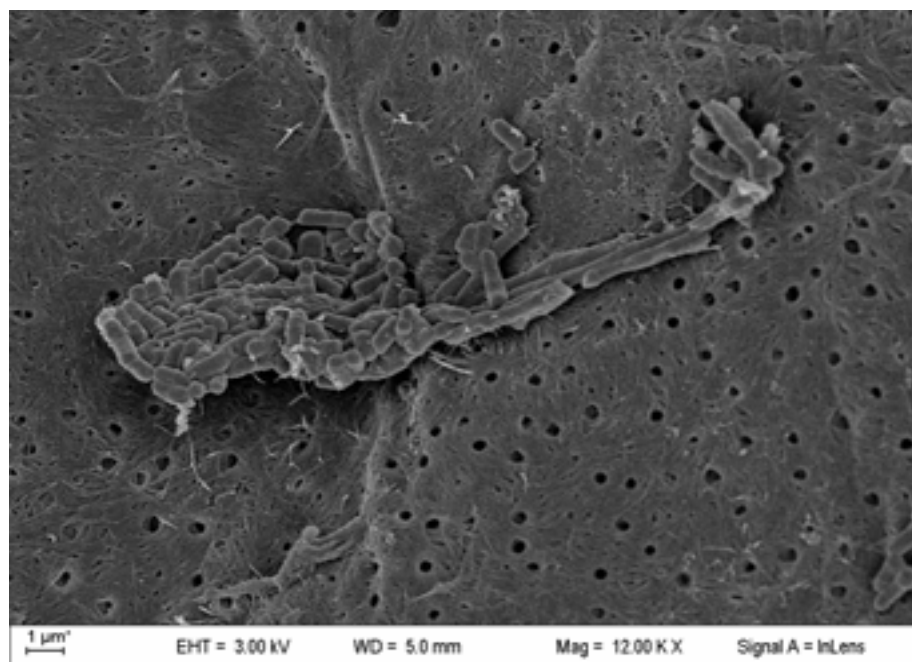


Figura VI.30. Micrografía electrónica (SEM) que muestra el aspecto de la matriz copos de quitina con abundantes células del consorcio MAD asociadas sobre ella. Magnificación: 12000X.

VI.D. Discusión

El bioaumentación es considerado una de las herramientas con mayor potencial para aumentar la eficiencia de los procesos de biorremediación (Ruberto y col., 2005; Osokawa y col., 2009). Particularmente en la Antártida, las extremas condiciones ambientales exigen que las bacterias degradadoras estén adaptadas, no sólo al estrés que representa la presencia de los contaminantes, sino también al estrés causado por el clima. A esta situación se le suma el hecho de que la reglamentación internacional prohíbe la introducción deliberada de cualquier especie no autóctona en el continente antártico (RCTA XXXII, 2009). Por ello, cualquier proceso de biorremediación en Antártida que, por sus características, requiera la aplicación de la estrategia de bioaumentación, deberá estar diseñada con bacterias obtenidas de la microbiota autóctona, las cuales representan la herramienta biológica ideal y obligada en este tipo de procesos

Estudios sobre la eficiencia del bioaumentación realizados en suelos de diferentes sitios han mostrado resultados divergentes, evidenciando la enorme complejidad de las interacciones bióticas y abióticas que se generan al introducir microorganismos cultivados fuera del ambiente natural, incluso si los mismos provienen de aislamientos del mismo sitio a biorremediar. Aún restringiendo el análisis a los reportes sobre suelos antárticos, mientras en algunos estudios se obtuvieron mejoras significativas en la biorremediación utilizando el bioaumentación (Margesin y col., 2003; Ruberto y col., 2006), en otros no se observaron beneficios en su aplicación (Margesin y Schinner 1997, El Fantroussi y Agathos, 2005; Ruberto y col., 2009).

La caracterización de los inóculos bacterianos se relaciona de forma más o menos directa con su potencial aplicación en procesos de biorremediación basados en la estrategia de bioaumentación (Madueño y col., 2011). En este capítulo se presentaron los resultados obtenidos de la caracterización de la cepa ADH y el consorcio M10, degradadores de hidrocarburos, previamente aislados de suelos antárticos contaminados. Luego se presentan una serie de ensayos preliminares cuya intención fue avanzar en el camino hacia el análisis de la factibilidad del bioaumentación con ambos sistemas biológicos en suelos antárticos contaminados con hidrocarburos, ya sea en forma aguda como crónica.

La cepa ADH mostró una importante capacidad de utilizar alcanos de cadena media como sustrato. Esta característica es frecuente en *Rhodococcus* (Bej y col., 2000) como también lo es su incapacidad para utilizar alcanos de menos de 10 átomos de carbono. La mencionada

capacidad de metabolizar hidrocarburos podría ser explicada en base a ciertas propiedades que caracterizan a este género. Ha sido citado que la presencia de cadenas alifáticas de ácido micólico en la membrana celular, facilitan la internalización y posterior degradación de sustratos hidrofóbicos dentro de la célula. También, que el potencial de metabolizar estos sustratos sea debido a la capacidad de producción de surfactantes, la cual facilita la adhesión de la célula a los compuestos hidrofóbicos (Martínková y col., 2009). La habilidad de sintetizar y acumular lípidos neutros de reserva, como triglicéridos (TAG), durante la fase estacionaria, reteniendo agua en el interior de la célula, es probablemente esencial para proporcionar a estos microorganismos resistencia a ambientes con condiciones adversas como por ejemplo suelos con déficit de nutrientes, estrés hídrico o ambientes con bajas temperaturas (Silva, 2008). Estas características serían una ventaja en los suelos fríos, secos y altamente arenosos presentes en la Antártida. Teniendo en cuenta estas capacidades y la versatilidad para tolerar condiciones adversas ambientales, este género ha sido considerado como una prometedora herramienta de bioaumentación (Whyte y col., 1999).

Por otro lado, la incapacidad de utilizar alcanos de menos de 10 carbonos por parte de ADH ha sido más relacionada con un efecto tóxico de estos compuestos altamente volátiles que con un problema de especificidad de sustrato de las oxigenasas del microorganismo (Asperger y Kleber, 1991) y no puede considerarse a priori un serio inconveniente para la utilización de esta cepa en procesos de bioaumentación ya que los componentes de los combustibles que presentan bajo peso molecular son altamente volátiles y se pierden rápidamente luego de su derrame en el ambiente, aun bajo las condiciones ambientales antárticas (Ruberto, 2009).

Si bien en la Antártida, la mayor parte de los hidrocarburos que contaminan el suelo son alifáticos, la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en suelos antárticos ha sido citada por diversos autores (Aislabie y col., 2000; Ruberto y col., 2006, Curtosi y col., 2007). Por ésta razón, estos compuestos también representan un problema en el ambiente antártico. La presencia de estos hidrocarburos en el suelo se origina en los eventos de contaminación generados por derrames y pérdidas de combustibles y por combustión de materia orgánica, todas situaciones generadas por la presencia de las bases antárticas. Se observó que ADH mostró incapacidad de crecer con HAPs como sustrato, esta incapacidad podría requerir, en el caso de presentarse problemas de contaminación con HAPs, de la presencia adicional de otros microorganismos que posean las vías catabólicas adecuadas para degradarlos. El estudio del

consorcio M10 apuntó, entre otras cosas, en esa dirección ya que podría, eventualmente, aportar dicha capacidad catabólica.

Se ha reportado que la hidrofobicidad bacteriana juega un rol importante en el crecimiento sobre sustratos hidrofóbicos, en la formación inicial de biofilms, en la adhesión a superficies hidrofóbicas, en la agregación y en la floculación (Rosenberg, 2006). La cepa ADH, mostró un porcentaje de hidrofobicidad de 57,1 %. Se podría inferir entonces que esta cepa posee capacidad de adherirse a sustratos hidrofóbicos. Dicha inferencia se ve reforzada por el porcentaje de adhesión a partículas de suelo, que fue del 52,1 %. Estos valores son mayores a los obtenidos con la cepa degradadora de fenantreno *Sphingomonas paucimovilis* 2006FA, que exhibió un porcentaje de hidrofobicidad del 13,5 % y de adhesión del 42,6 % (Dias, 2006). Esta diferencia está de acuerdo con lo citado por Zhang y col. (2009) que señala que las bacterias Gram positivas son generalmente más hidrofóbicas que las Gram negativas debido a los constituyentes hidrofóbicos de su pared celular. Por otro lado, la hidrofobicidad observada en la cepa ADH podría ser la causa de la notoria capacidad de formar agregados que exhibe la misma al ser cultivada en medios mínimos con hidrocarburos como única fuente de carbono y energía.

Durante un proceso de biorremediación, la habilidad de adherirse a superficies hidrofóbicas es de gran utilidad, ya que la interacción célula-contaminante es el primer paso en el proceso de biodegradación. ADH, además de mostrar capacidad de adhesión a partículas de suelo, también mostró capacidad de adherirse a la superficie hidrofóbica poliestireno y formar un biofilm estable.

La caracterización por microscopía electrónica de ADH, mostró la presencia de invaginaciones de la membrana plasmática en forma de espiral, las cuales, hasta donde tenemos conocimiento, no fueron citadas por otros autores. En cambio fue citada la presencia de triglicéridos, como inclusiones intracelulares visibles en una cepa de *Rhodococcus* degradadora de hidrocarburos aislada de Patagonia, Argentina (Álvarez y col., 2002). Dichas inclusiones no fueron observadas en la cepa ADH bajo las condiciones estudiadas.

ADH mostró una velocidad de crecimiento similar a la reportada por otros investigadores para cepas ambientales de *Rhodococcus* degradadoras de hidrocarburos (Ivshina y col., 1998). También, mostró un 85 % de eliminación de gasoil en medio salino basal (MSB). Esta alta eficiencia de eliminación también fue observada por Martínková y col. (2009), quienes

reportaron un porcentaje de eliminación de benceno (2 % v/v) del 89 %, para una cepa de *Rhodococcus* en cultivo continuo a los 30 días de ensayo.

El consorcio M10, por su parte, fue aislado de suelos contaminados con gasoil provenientes de una base antártica y seleccionado a partir de sucesivos cultivos en HAPs. Este consorcio mostró una importante capacidad de crecer sobre distintos HAPs. Si bien la biomasa máxima alcanzada en los cultivos no fue muy elevada y la velocidad específica de crecimiento aparente no mostró tampoco valores altos, su capacidad de crecer a expensas tanto de HAPs como de gasoil (65 % de eliminación en MSB) y la plasticidad metabólica que debería otorgarle el hecho de ser un sistema formado por múltiples componentes (citados como degradadores de HAPs como *Pseudomonas* y *Sphingobacterium* entre otros) hizo que se lo considerara una herramienta potencialmente útil para posteriores estudios de bioaumentación. La caracterización por microscopía electrónica del consorcio M10 mostró la presencia de una visible matriz amorfa tipo exopolímero, asociada también a las células. Los exopolímeros son el componente principal de la matriz que compone los biofilms bacterianos y tienen un papel fundamental en la adhesión celular (Calde y col., 1999). Estas capacidades alientan la utilización de M10 como potencial inoculante, debido a que podría facilitar la captura del contaminante libre o adherido a partículas de suelo, aumentando la eficiencia de la degradación (Eriksson y col., 2002).

M10 mostró quimiotaxis positiva, de tipo swarming, hacia numerosos HAPs. Hasta donde tenemos conocimiento no fueron citados trabajos que muestren la presencia de esta propiedad en consorcios degradadores aislados de suelos antárticos. Fuera del área antártica, Ortega-Calvo y col. (2003) observaron quimiotaxis positiva hacia HAPs por parte de bacterias degradadoras de HAPs aisladas de la rizosfera de plantas crecidas en creosota y suelos contaminados con petróleo.

En relación a los aislamientos obtenidos de los anillos de swarming de M10, se encontró que 4 de ellos presentaron alta homología con *Pseudomonas putida*. Miembros de este género han sido reportados como dominantes en suelos contaminados con hidrocarburos alifáticos y PAHs, tanto en áreas antárticas (Aislabie y col. 2000; Ma y col. 2006) como no antárticas (Whyte y col., 1997; Kanaly y Harayama, 2000; Samanta y col., 2002). Los resultados concuerdan además con estudios previos del grupo de trabajo, los cuales han confirmado, utilizando estrategias dependientes e independientes de cultivo, que miembros del género *Pseudomonas* son componentes mayoritarios del consorcio M10 (Mestre, 2006). La cepa aislada de los anillos de

quimiotaxis sería el componente de M10 con actividad swarming más relevante, característica que la torna en un sistema biológico interesante para el estudio de la adaptación microbiana a la presencia y degradación de HAPs.

Luego de estudiar algunas propiedades claves en la eliminación de hidrocarburos, en los inóculos ADH y M10, se decidió probarlos directamente en suelos contaminados con gasoil. En el ensayo preliminar utilizando M10 en suelos crónicamente contaminados, se observó una inmediata estimulación del crecimiento de las poblaciones cultivables de BDH cuando se combinó el bioaumentación de M10 con el agregado de sales inorgánicas. El máximo de crecimiento en las BDH alcanzado a los 3 días se mantuvo hasta los 10 días de ensayo. Teniendo en cuenta este resultado y lo reportado tanto por Ruberto y col. (2003), que señaló que el agregado de una fuente de N y P podría aumentar la biodegradación de hidrocarburos en suelos antárticos contaminados y por Delille y col., (2008) que citó que el agregado de harina de pescado aumentó la eficiencia de eliminación de gasoil en suelos contaminados, se realizó un ensayo de bioestimulación y bioaumentación de suelos agudamente contaminados con gasoil en frascos inoculando tanto a M10 como a ADH. Todos los nutrientes causaron aumentos en el crecimiento de los inóculos, sin embargo bajo las condiciones ensayadas la bioestimulación pareció innecesaria ya que se observaron similares niveles de eliminación de HT en los microcosmos bioestimulados e inoculados y en los que sólo fueron inoculados. Sólo para el caso de M10 combinado con NPK se observó un valor de eliminación levemente significativo. Dado que se trabajó con un suelo estéril, es posible que, ante la ausencia de flora autóctona consumiendo nutrientes, los inóculos hayan sostenido su crecimiento a expensas de los niveles de nutrientes presentes en el suelo y de la fuente de carbono presente en los hidrocarburos. La eficiencia observada en la inoculación fue diferente a los estudios previos propios realizados con suelos que presentaban la flora natural, donde la bioestimulación emergió como un paso necesario para la optimización de la remoción de hidrocarburos (Vázquez y col., 2009). También es importante resaltar las diferentes repuestas de los inóculos, ya que mientras la capacidad degradadora de ADH se vio claramente disminuida en presencia del fertilizante NPK, el consorcio M10 mostró los mejores valores de remoción en presencia de dicho fertilizante.

Cabe mencionar también que el aporte de harina de pescado no mostró un efecto significativo sobre el crecimiento de ADH y solo causó un leve aumento transitorio al día 15 en el crecimiento de M10. Esta observación contrasta con lo observado en los ensayos de parcelas y biopilas en

donde estaba presente la microflora autóctona (Capítulo IV), ya que en ellos sí fue observado un aumento relevante en la actividad biológica y en las poblaciones cultivables. Esto último podría sugerir que una fracción significativa de los mencionados incrementos se deba a la multiplicación de poblaciones de la flora autóctona, que aprovecha la abundante presencia de nutrientes fácilmente degradables. Este resultado apoya lo comentado anteriormente para los ensayos de bioestimulación, que sugieren que fuentes complejas de N y P (como la harina de pescado), reportadas como estimulantes de la biodegradación bajo algunas condiciones, pueden favorecer la formación de biomasa en desmedro de la capacidad degradadora, derivando así el metabolismo a una fuente de carbono más accesible.

Por otro lado, el leve efecto inhibitorio de las sales inorgánicas en el crecimiento de ADH al inicio del estudio, ha sido observado previamente en ensayos en frascos con suelos contaminados en forma aguda con gasoil (Mac Cormack, 1999; Ruberto y col., 2003) y ha sido también mencionado por otros autores (Walworth y col., 2007). Este efecto inhibitorio inicial, que no se observó en el microcosmo inoculado con M10, podría deberse al hecho de adicionar todos los nutrientes en una sola maniobra al inicio del ensayo, lo que podría causar, en algunos sistemas biológicos, una inhibición del crecimiento por efectos osmóticos (Viñas y col., 2005) o por otras causas que no pueden deducirse de los ensayos realizados. Este estudio vuelve a resaltar la necesidad de optimizar la estrategia de bioestimulación para cada caso en particular, ya que los sistemas biológicos estudiados respondieron de manera diferente a las distintas fuentes de nutrientes ensayadas.

En base a los resultados obtenidos en el ensayo preliminar con el consorcio M10 combinado con sales inorgánicas, se realizó un ensayo de bioaumento de suelos crónicamente contaminados con gas oil “*on site*” utilizando el diseño experimental biopilas.

El suelo crónicamente contaminado (CC) no mostró actividad biológica deshidrogenasa hasta el día 15, a partir del cual evidenció un leve aumento de dicha actividad. Este resultado podría reflejar la respuesta de la comunidades microbianas activas al estímulo producido por la aireación y el aporte de agua, las cuales probablemente mostraron una lenta adaptación a las nuevas condiciones del microcosmo. Por otro lado, este microcosmo no evidenció estimulación de las poblaciones cultivables BH, pero sí evidenció un leve aumento de las BDH a los 15 días de ensayo. El leve aumento de la actividad deshidrogenasa podría corresponderse con el crecimiento observado en el día 15 de las poblaciones BDH. La falta de una estimulación significativa de las poblaciones cultivables fue diferente a la observado por Ruberto y col.,

(2009) quien obtuvo aumentos significativos en dichas poblaciones en suelos antárticos contaminados con hidrocarburos durante 45 días de ensayo. La escasa (y estadísticamente no significativa) reducción en la concentración de hidrocarburos (aproximadamente 19 %) obtenida en la biopila control (CC) difiere de lo observado en las biopilas del Ensayo II (Capítulo IV), en las cuales el sistema CC (cuyo suelo poseía una proporción elevada de contaminantes “frescos”) mostró una significativa reducción en los valores de HT. Como ya fue mencionado, es probable que el envejecimiento que poseían estos suelos y su permanencia por un largo periodo en tambores cerrados, sumado a los frecuentes eventos de anegación debido a las continuas lluvias que sufrieron las biopilas en este ensayo hayan limitado los procesos de remoción. En concordancia con este supuesto, el sistema CC del ensayo I en biopilas descrito en el Capítulo IV, el cual se diseñó con el mismo tipo de suelo utilizado en el presente estudio, mostró un comportamiento muy similar, con un nivel de remoción (aproximadamente 16 %) que tampoco resultó significativo comparado con el valor inicial.

La inoculación de M10 junto al agregado de sales inorgánicas mostró una recuperación significativa de la actividad biológica deshidrogenasa luego de 10 días de ensayo. Este efecto “tardío” en la respuesta de la actividad biológica total fue observado también en las poblaciones BH y BDH y podría asociarse con el tiempo que necesitó la flora autóctona para adaptarse a la presencia del consorcio M10. La relevancia que, sobre el éxito o el fracaso de un proceso de biodegradación, tienen los factores ecológicos que se ponen en marcha cuando se mezclan 2 comunidades o sistemas microbianos diferentes han sido claramente expuestos por Bouchez y col. (2000a). Este trabajo, realizado en un reactor desnitrificante secuencial, representa un acabado ejemplo de lo complejo que puede resultar el agregado de microorganismos a un sistema en donde ya está presente una comunidad microbiana estable. En este estudio, la inoculación con una bacteria desnitrificante no solo no fue eficiente, sino que además produjo la inhibición de la flora autóctona presente en el reactor. Esta contribución realza cuan crucial son las interacciones biológicas que se generan durante la aplicación del bioaumentación. Es interesante señalar que, mientras algunos autores han observado que el inóculo desaparece rápidamente del sistema experimental (Margesin y Schinner 1997b; Macnaughton y col. 1999), en este trabajo se observó que la biopila M10 mantuvo las poblaciones cultivables de BDH durante todo el ensayo. Basado en lo anteriormente descrito se podría inferir que en este diseño experimental y en las condiciones ensayadas el inóculo pudo superar las limitaciones previamente mencionadas.

Del análisis de la dinámica de las comunidades bacterianas presentes durante los primeros 39 días de ensayo, puede resaltarse el hecho de que, de manera similar a lo observado en el ensayo de biopilas I (realizada con el mismo suelo) el sistema CC a tiempo inicial se diferenció claramente del resto de los tiempos. Nuevamente, el grado de envejecimiento y forma de almacenamiento del suelo, así como el drástico cambio de condiciones sufrido al acondicionarlo para el ensayo, pueden ser responsables del acentuado y muy rápido cambio en la estructura de la comunidad bacteriana observado en ambos ensayos. En línea con este argumento, el ensayo II de biopilas, el cual fue realizado con un suelo superficial, sin almacenamiento previo y con contaminación fresca, mostró a CCt0 y CCt5 en un mismo cluster, con una similitud de cerca del 90 %. Incluso el sistema a t50 se mantuvo dentro del mismo subcluster. Esto evidencia que en el caso del suelo con contaminación “fresca”, los cambios sufridos en la estructura de la comunidad del sistema control fueron menos drásticos que los sufridos por el suelo envejecido. Este drástico cambio en CC fue acompañado con un notorio aumento de la riqueza y la biodiversidad durante todo el estudio. En cuanto al microcosmo M10, el análisis de cluster evidenció el rápido cambio que el agregado de este nutriente produjo sobre la comunidad original, fenómeno también observado en los otros ensayos en donde se utilizó HP como nutriente. Por otro lado, si bien deberán realizarse estudios adicionales para confirmarlo, el aumento inmediato de la riqueza (y por ende de la diversidad) al iniciar el ensayo con M10 podría deberse al efecto del inóculo. Este efecto pareció disminuir hacia el final del estudio.

Finalmente, se realizó un ensayo preliminar de bioaumento de suelos contaminados en forma aguda utilizando un inóculo inmovilizado.

Si bien todos los microcosmos evaluados mostraron aumentos iniciales de las poblaciones cultivables de BH y BDH, la turba (microcosmo TUR) fue el único soporte que mantuvo los valores de recuento hasta el final del ensayo. Recientemente Lei y col. (2011) han reportado una eliminación significativa del 90 % de BTEX por parte de una bacteria degradadora adherida al soporte turba. Sin embargo, la reportada eficiencia de eliminación no fue observada en el presente ensayo utilizando turba, así como tampoco con el resto de los soportes. Es posible que la ubicación de los microcosmos en un sitio reparado, con condiciones ambientales menos estrictas (temperaturas menos extremas, ausencia de viento, etc.) lejos de favorecer la actividad de la flora autóctona haya resultado perjudicial para su actividad degradadora. Sería de interés, en ensayos posteriores y a fin de evaluar la real eficiencia de la inmovilización en los suelos antárticos analizar el nivel de biomasa de MAD más eficiente para favorecer la biodegradación

de los HT , así como el destino de los componentes de la mezcla durante el ensayo, ya que tanto la turba como los copos de quitina evidenciaron un alto nivel de bacterias adheridas cuando se las analizó por microscopía electrónica.

Otro punto a tener en cuenta en este ensayo es el suelo utilizado. El mismo había sido afectado por un derrame dos meses antes del estudio, por lo cual se lo consideró a priori como un suelo agudamente contaminado. Sin embargo, la ausencia de remoción incluso en el sistema CC muestran que el suelo se comportó como tal. Evidentemente, las duras condiciones ambientales antárticas, especialmente las altas tasas de evaporación producto de los fuertes vientos, hacen que 2 meses sea un periodo suficiente para eliminar todos los componentes más volátiles y hacer que un suelo se comporte más como un suelo crónico que como uno agudo. Puede especularse también que ese tiempo sí sea insuficiente para el establecimiento de una comunidad bacteriana eficiente para degradar los hidrocarburos remanentes y, que por esa razón, la eliminación biológica en el microcosmo CC tampoco fue significativa. En este sentido, Pelletier y Brion (2005) realizaron un exhaustivo estudio acerca de la cinética de adsorción y secuestro de diferentes HAPs sobre partículas de sedimentos, con la consiguiente pérdida de la biodisponibilidad. Si bien realizado sólo sobre HAPs el estudio claramente mostró que estos compuestos hidrofóbicos presentan altas velocidades de adsorción y secuestro y el modelo desarrollado por los autores predijo que sólo una pequeña fracción de los hidrocarburos estaría disponible luego de solo un mes de haber sido puestos en contacto con el sedimento. Este estudio sugiere que los dos meses transcurridos desde el evento de contaminación podrían haber sido suficientes para convertir el suelo en estudio en un suelo con características de contaminación crónica, lo cual podría explicar, al menos en parte, los resultados observados.

De los ensayos realizados, es importante señalar que la previa caracterización de los inóculos bacterianos es indispensable para estimar la potencial aplicación de los mismos en la biorremediación de suelos contaminados. Se puede concluir que las herramientas biológicas seleccionadas (tanto la cepa ADH, como el consorcio M10) son capaces de degradar cantidades significativas de hidrocarburos de los suelos cuando no compiten con la flora autóctona. También es importante mencionar que particularmente el consorcio M10, al menos bajo ciertas condiciones experimentales (que deberán ser claramente identificadas y optimizadas en el futuro), mostró capacidad de eliminar gasoil en suelos crónicamente contaminados. Estos resultados son alentadores, ya que algunos de los ensayos previos del grupo de trabajo no habían

podido evidenciar una ventaja del agregado de inóculos bacterianos autóctonos en suelos con una larga historia de exposición previa.

Deberá de todas maneras evaluarse, pesando costo y beneficio, si la ventaja aportada por el bioaumento compensa el mayor costo derivado de la preparación del inóculo y su aplicación en un sistema de biorremediación a escala real.

De estos estudios emerge también claramente lo anteriormente mencionado por el grupo de trabajo y por otros autores acerca de la enorme complejidad y dificultad de obtener reproducibilidad en este tipo de estrategias. Evidentemente, no solo el sistema biológico utilizado condiciona la efectividad, el éxito o el fracaso del proceso, también la geometría del sistema experimental (biopilas, frascos, bateas), el tipo de nutriente utilizado, el tipo de suelo y su historia previa, la presencia de flora autóctona y muchos otros factores que interaccionan entre sí de una manera muy difícil de predecir y que debe ser evaluada para cada caso en particular.

CAPÍTULO VII

Conclusiones

VII. Conclusiones generales

Ensayos en área de clima frío (Antártida):

- ❖ Puede considerarse a la bioestimulación como una herramienta eficiente para favorecer la biorremediación de suelos crónicamente contaminados con gasoil, si bien no en todos los estudios realizados se observó un efecto positivo. Particularmente el nutriente OSEII® en el diseño experimental parcelas y la harina de pescado en las biopilas fueron los nutrientes testeados que favorecieron significativamente la eliminación de los contaminantes del suelo antártico. Las sales inorgánicas también favorecieron levemente la eliminación en uno de los diseños de biopilas.
- ❖ La bioestimulación en todos los casos generó rápidos cambios a nivel de la estructura de las comunidades bacterianas presentes en los suelos contaminados. Aparentemente los sistemas contaminados en forma aguda presentan dominancia de grupos degradadores metabólicamente muy versátiles que predominan rápidamente (estrategas r) y evolucionan hacia un estado “crónico” donde cobran más relevancia los grupos de microorganismos con una estrategia k. El único nutriente que generó cambios menores en la flora bacteriana autóctona de la tierra analizada fue el nutriente OSEII® cuando fue aplicado en un sistema experimental tipo parcela.
- ❖ Se observó repetidamente una dependencia entre el tipo de suelo, la geometría del sistema experimental utilizado y la eficiencia de biorremediación del suelo contaminado proveniente de clima frío.
- ❖ La inoculación con ADH en suelo estéril, mostró no requerir nutrientes adicionales para la degradación de gasoil del suelo antártico, sugiriendo una alta eficiencia en la asimilación de hidrocarburos, aun en presencia de una fuente de C fácilmente asimilable. Por el contrario, el consorcio M10 sólo mostró una alta eficiencia degradadora en presencia del fertilizante NPK, sugiriendo que requiere un aporte de N y P para la eficiente eliminación de hidrocarburos.

- ❖ El consorcio M10 mostró eficiencia significativa de eliminación de hidrocarburos en suelos antárticos crónicamente contaminados, sólo en presencia de un suplemento de N y P.
- ❖ La utilización de un inóculo adherido a una matriz sólida no favoreció la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos solamente 2 meses antes del estudio..
- ❖ La utilización del surfactante Brij700[®], combinado o no con la bioestimulación, no mejoró la eficiencia de eliminación de hidrocarburos ni tampoco produjo cambios significativos en la estructura de las comunidades bacterianas de las tierras analizadas.

Ensayos en área de clima templado:

- ❖ La mezcla de dos suelos de diferente origen afectó la viabilidad de las poblaciones autóctonas de ambos suelos, inhibiendo su crecimiento y en consecuencia la degradación de hidrocarburos.
- ❖ La harina de pescado fue el único nutriente que neutralizó el efecto de inhibición debido a la mezcla de suelos, ejerciendo un efecto “protector”, permitiendo el incremento de la actividad biológica y de las poblaciones cultivables.
- ❖ El efecto estimulante de la harina de pescado produjo significativos cambios en la comunidad bacteriana, con la presencia de géneros bacterianos reportados como degradadores de hidrocarburos. Sin embargo, la nueva comunidad establecida no produjo una eficiente eliminación de hidrocarburos bajo las condiciones ensayadas.
- ❖ La acción del surfactante Brij700[®], en su aplicación combinada con nutrientes tanto orgánicos como inorgánicos, no mejoró la eficiencia de eliminación de hidrocarburos en las tierras analizadas.

Para ambos sitios:

- ❖ Si bien ha sido reportado en trabajos previos el beneficio de bioestimar con fuentes de carbono fácilmente utilizables, la harina de pescado produjo principalmente una estimulación “general” del crecimiento microbiano pero no siempre resultó en un efecto positivo sobre la actividad degradadora del sistema en estudio.

- ❖ Se considera que la aplicación de estrategias de biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos puede favorecer la remoción de los contaminantes. Sin embargo la respuesta obtenida es fuertemente “sitio dependiente” y debe ser cuidadosamente analizada para cada caso en particular, no siendo posible el establecimiento de un protocolo de trabajo aplicable a todos los sitios. Además de los factores biológicos relacionados con la flora autóctona y su compleja repuesta a un inóculo externo, también la geometría del sistema elegido, la fuente de nutrientes utilizada para bioestimar y su forma de aplicación, las propiedades del suelo y su historia de contaminación, entre otros factores, han mostrado durante la realización de este trabajo ser cruciales para el éxito o el fracaso de proceso.

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFÍA

VIII. Bibliografía

- ◆ Acharya P, Ives P. 1994. Incineration at Bayou Bounfouca remediation project. *Waste Management* 14(1):13-26.
- ◆ Aislabie J, Foght J, Saul D . 2000. Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from soil near scott base, Antarctica. *Polar Biology* 23: 183-188.
- ◆ Aislabie J.M, Balks M., R., Foght J.M., Wwaterhouse E.J. 2004. Hydrocarbon Spills on Antarctic Soils: Effects and Management *Environmental Science & Technology*, 38: 1265-1274.
- ◆ Aislabie, J., Saul, D. J. and Foght, J. M. 2006. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles*. 10: 171–179.
- ◆ Alexander, M. 1999. *Biodegradation and Bioremediation*. Segunda edición. Academic Press, Inc., San Diego.
- ◆ Alexandre J M, Ute K, Thomas R. N, Kenneth N. T. y Wolf-Rainer A. 2005. Three Stages of a Biofilm Community Developing at the Liquid-Liquid Interface between Polychlorinated Biphenyls and Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(11): 7301-7309.
- ◆ Alvarez H. M, Steinb Chel A. 2002. Triacylglycerols In Prokaryotic Microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60:367–376.
- ◆ Araruna, J. T., Jr, Portes, V. L. O., Soares, A. P. L., Silva, M. G., Sthel, M. S., Schramm, D. U., Tibana, S.,and Vargas, H. 2004. Oil spills debris clean up by thermal desorption. *Journal of HazardousMaterials.* 110 (1-3): 161-171.
- ◆ Asperger O. and Kleber, H.P. 1991. Metabolism of alkanes by *Acinetobacter*. In Bowner K.L, Bergogne-Bérézin, E. & Fewson, C.A. *The biology of Acinetobacter*. New York: Plenum Press. 323-350.
- ◆ Atagana H. I., Haynes R. J. y Wallis F. M. 2003. The use of surfactants as posible enhancers in bioremediation of creosote contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution.* 142:137–149.
- ◆ Atagana H.I., Haynes R.J., Wallis F.M. 2002. Batch culture enrichment of indiginous soil microorganisms capable of catabolizing creosote components. *Water, Air and Soil Pollution.* 141: 233-246.

- ◆ Atlas R. M. y Bartha R. 1998. *Microbial Ecology: Fundamentals and applications*. 4th edition. Benjamin/Cummings Science Publishing. Menlo Park, CA.
- ◆ Atlas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45(1): 180–209.
- ◆ Baker, K. H. 1994. Bioremediation of surface and subsurface soils. En: *Bioremediation*. Baker, K. H. y D. S. Herson. (Eds). New York. McGraw-Hill. pp. 203-259.
- ◆ Bastiaens L., Springael D., Wattiau P., Harms H., DeWachter R., Verachtert H. and Diels L. 2000. Isolation of Adherent Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Degrading Bacteria Using PAH-Sorbing Carriers. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:1834–1843.
- ◆ Bej AK, Saul D, Aislabie J. 2000. Cold-tolerant alkane-degrading *Rhodococcus* species from Antarctica. *Polar Biol* 23:100-105.
- ◆ Bell T. H., Yergeau E., Martineau C., Juck D., Whyte L. G., and Greer C. W.. 2011. Identification of Nitrogen-Incorporating Bacteria in Petroleum-Contaminated Arctic Soils by Using [15 N] DNA-Based Stable Isotope Probing and Pyrosequencing. *Applied and Environmental Microbiology*. 4163–4171.
- ◆ Benavides López de Mesa J., Quintero Vizcaíno G, Guevara A L. Jaimes Cáceres D C, Gutiérrez S M. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*. 4(5): 82-90.
- ◆ Björklöf K., Salminen J., Sainio P., Jørgensen K. 2008. Degradation rates of aged petroleum hydrocarbons are likely to be mass transfer dependent in the field. *Environ Geochem Health*. 30:101–7.
- ◆ Bouchez M., Blanchet D., and Vandecasteele J. P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. 43:156-164.
- ◆ Braddock, J. F., M. L. Ruth, P. H. Catterall, J. L. Walworth y K. A. McCarthynd. 1997. Enhancement and inhibition of microbial activity in hydrocarbon-contaminated arctic soils: implications for nutrient-amended bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 31:2078-2084.

- ◆ Breedveld, G. D. y M. Sparrevik. 2001. Nutrient-limited biodegradation of PAH in various soil strata at a creosote contaminated site. *Biodegradation* 11:391-399.
- ◆ Brion D, Pelletier E, 2005. Modeling PAHs adsorption and sequestration in fresh water and marine sediments. *Chemosphere*. 61: 867–876.
- ◆ Brock D. y Madigan M. 2000. *Microbiología* (8va. edición). Prentice Hall Hispanoamericana. S.A. Mexico.
- ◆ Caldeira M. S. C., Healdá M. F., Carvalho I., Vasconcelos A. T., Bull P., Castro M. L. 1999. 4-Chlorophenol degradation by a bacterial consortium: development of a granular activated carbon biofilm reactor. *Applied microbiology*. S. C. Heald á A. T. Bull Research School of Biosciences, University of Kent, Canterbury, Kent CT2 7NJ, UK.
- ◆ Canals M. V. 2005. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, Facultad de Biología, Departamento de Microbiología.
- ◆ Castle, D. M., M. T. Montgomery and D. L. Kirchman. 2006. Effects of naphthalene on microbial community composition in the Delaware estuary. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 55–63.
- ◆ Chaîneau, C. H.; C. Yepremian, J. F. Vidalie, J. Ducreux y D. Ballerini. 2003. Bioremediation of a Crude Oil-Polluted Soil: Biodegradation, Leaching and Toxicity Assessments. *Water, Air, and Soil Pollution*. 144:419-440.
- ◆ Cheung P. y Kinkle B. K. 2005. Effects of nutrients and surfactants on pyrene mineralization and *Mycobacterium* spp. populations in contaminated soil. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1401-1405.
- ◆ Chia-Hsien Yen, Ku-Fan Chen, Chih-Ming Kao, Shu-Hao Liang, Ting-Yu Chen. 2011. Application of persulfate to remediate petroleum hydrocarbon-contaminated soil: Feasibility and comparison with common oxidants. *Journal of Hazardous Materials* 186: 2097–2102.
- ◆ Chorom M., Sharifi H. S., Motamedi H. 2010. Bioremediation of a crude oil - polluted soil by application of fertilizers. *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.* 7(4):319-326.
- ◆ Christofi, N. y Ivshina I. B. 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation *Journal of Applied Microbiology*. 93:915–929.

- ◆ Chuvilin, E. M. and Miklyaeva, E. S. 2003. An experimental investigation of the influence of salinity and cryogenic structure on the dispersion of oil and oil products in frozen soils. *Cold Reg. Sci. Technol.* 37: 89–95.
- ◆ Copotelli B. 2008. Obtención de inoculantes bacterianos y evaluación de su aplicación en procesos de biorremediación de suelos contaminados con PAH”. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP.
- ◆ Coppotelli and Ibarrolaza A. Dias R.L., Del Panno M T. Berthe-Corti L. and Morelli. I S. 2010. Study of the Degradation Activity and the Strategies to Promote the Bioavailability of Phenanthrene by *Sphingomonas paucimobilis* Strain 20006FA. *BM. Microb Ecol.*, 59: 266-276.
- ◆ Coppotelli, B.M., Ibarrolaza, A, Del Panno, M.T., Morelli, I.S. 2008. Effects of the inoculant strain *Sphingomonas paucimobilis* 20 0 06FA on soil bacterial community biodegradation in phenanthrene-contaminated soil. *Microbial Ecology* 55, 173 e183.
- ◆ Coulon F, Delille D. 2003. Effects of biostimulation on growth of indigenous bacteria in sub-antarctic soil contaminated with oil hydrocarbons. *Oil & Gas Science and Technol.* 58: 469-479.
- ◆ Cuny P, Faucet J, Acquaviva M, Bertrand C, Gilewicz M. 1999. Enhanced biodegradation of phenanthrene by a marine bacterium in presence of a synthetic surfactant. *Lett. Appl. Microbiol*, 29: 242-245.
- ◆ Curtosi, A., Pelletier, E., Vodopivec, C.L., Mac Cormack, W.P. 2007. Distribution pattern of PAHs in soil and surface marine sediments near Jubany Station (Antarctica). Possible role of permafrost as a low-permeability barrier. *Science of the Total Environment.* 383: 193-204.
- ◆ Das P., Mukherjee S. y Sen R. 2008. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chemosphere.* 72:1229-1234.
- ◆ David J. Saul, Jackie M. Aislabie, Caroline E. Brown, Lisa Harris, Julia M. Foght. 2005. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology.* 53: 141–155.

- ◆ Delille D., Coulon F. and Pelletier E. 2004. Biostimulation of Natural Microbial Assemblages in Oil-Amended Vegetated and Desert Sub-Antarctic Soils. *Microbial Ecology*. 47: 407–415.
- ◆ Delille D., Duval A. y Pelletier E. 2008. Highly efficient pilot biopiles for on-site fertilization treatment of diesel oil-contaminated sub-Antarctic soil. *Cold Regions Science and Technology*. 54: 7–18.
- ◆ Delille D., Pelletier E., Coulon F. 2007. The influence of temperature on bacterial assemblages during bioremediation of a diesel fuel contaminated subAntarctic soil. *Cold Regions Science and Technology*. 48: 74 – 83.
- ◆ Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., InfoStat versión 2011. Grupo. InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- ◆ Dias, R. L. 2006. Aislamiento y estudio de bacterias degradadoras de PAH bajo distintas condiciones de disponibilidad de sustrato. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Quilmes.
dynamics following bioaugmentation with a 3-chlorobenzoate-degrading bacterial culture.
- ◆ El Fantroussi, S. and Agathos, S. 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr Opin Microbiol*. 8: 268–275.
- ◆ El Fantroussi, S., L. Verschuere, W. Verstraete y E. M. Top. 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol*. 65:982-988.
- ◆ Eriksson M., Dalhammar G. y Mohn, W. 2002. Bacterial growth and biofilm production on pyrene. *FEMS Microbiology Ecology*. 40:21-27.
- ◆ Espeche M. E., Mac Cormack W.P. y Fraile E.R. 1994. Factors affecting growth of an n-hexadecane degrader *Acinetobacter* species isolated from a highly polluted urban river. *Int. Biodeterior. Biodegrad*. 33: 187-196.
- ◆ Fahrbach M., Kuever J., Remesch M., Huber B.E., Kämpfer P, Dott W and Hollender J. 2008. *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 58: 2215-2223.

- ◆ Fang M, Wan CK, Wong JWC. 2002. Enhancement of PAH degradation by non-ionic surfactants in composting system. In site Out Site Bioremed, 6: 73-80.
- ◆ Fierer N., Schimel J.P. y Holden P.A. 2003. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biol Biochem.* 35:167–76.
- ◆ Franzetti A., Di Gennaro P., Bestetti G., Lasagni M., Pitea D. y Collina E. 2008. Selection of surfactants for enhancing diesel hydrocarbons-contaminated media bioremediation *Journal of Hazardous Materials.* 152: 1309–1316.
- ◆ Genouw, G., F. De Naeyer, P. Van Meenen, H. Van de Werf, W, De Nijs y W. Verstraete. Implications for nutrient-amended bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 31:2078-2084.
- ◆ Genovese M., Denaro R., Cappello S., Di Marco G., La Spada G., Giuliano L., Genovese L. y Yakimov M. M. 2008. Bioremediation of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes-contaminated soil: a biopile pilot experiment. *Journal of Applied Microbiology.* 105: 1694–1702.
- ◆ Gentili A. R., Cubitto, M. A., Ferrero M., Rodriguez M. S. 2006. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 57: 222- 228.
- ◆ Gentry, T. J., D. T. Newby, K. L. Josephson y I. L. Pepper. 2001. Soil microbial population. *Biodegradation.* 12 (5):349-357.
- ◆ George I. F., Liles M. R., Hartman M. , Ludwig W., Goodm R. M. and Agathos S. N. 2009. Changes in soil Acidobacteria communities after 2, 4, 6-trinitrotoluene contamination. *FEMS Microbiol Lett.* 296: 159–166.
- ◆ González Riojas H. H., Torres Bustillos L. G., Mondaca Fernández I., Balderas Cortes J., Gortáres Moroyoqui P. 2010. Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química Viva.* 9 (3): 120-145.
- ◆ Grechishchev, S. E., Instanes, A., Sheshin, J. B., Pavlov, A. V. and Grechishcheva, O. B. 2001. Laboratory investigation of the freezing point of oil-polluted soils. *Cold Reg. Sci. Technol.* 32: 183–189.
- ◆ Gremion F, Chatzinotas A & Harms H. 2003. Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environ Microbiol* 5: 896–907.

- ◆ Hammer Ø, Harper D.A.T. y Ryan P. D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electrónica* 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.
- ◆ Hanson K.G, Desai JD, Desai AJ. 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotech. Tech.* 7: 745-748.
- ◆ Harayama, S. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 268-273.
- ◆ Harayama, S., H. Kishira, Y. Kasai, y K. Shutsubo. 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1:63-70.
- ◆ Heuer, H., Wieland, G., Schonfeld, J., Schnwalder, A., Gomes, N.C.M. & Smalla, K. 2001. Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis. In: *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications* (ed. P.A. Rochelle), pp. 177–190.
- ◆ Hicks, R., R. I. Amann y D. A. Stahl. 1992. Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom level 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2158-2163.
- ◆ Hosokawa R, Nagai M, Morikawa M, Okuyama H. 2009. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. *World J Microbiol Biotechnol.* 25:1519–1528.
- ◆ http://www.latecla.info/2/nota_1.php?noticia_id=41305.
- ◆ Hunt S. H., Werner E. M., Huang B., Hamilton M. A, y Stewart P. S. 2004. Hypothesis for the Role of Nutrient Starvation in Biofilm Detachment. *Applied and Environmental Microbiology.* 70: 7418-7425.
- ◆ Huysman F. and Verstraete W. 1993b. Water-facilitated transport of bacteria in insaturated soil columns: influence of cell surface hydrophobicity and soil properties. *Soil Biol. Biochem.* 25:83-90.
- ◆ Ivshina, I.B., Berdichevskaya, M.V., Zvereva, L.V., Rybalka, L.V., and Elovikova, E.A. 1995. Phenotypic characterization of alkanotrophic rhodococci from various ecosystems. *Mikrobiologiya.* 64: 507-513.
- ◆ Jiménez N., Viñas M., Bayona J. M., Albaiges J, y Solanas A. M. 2007. The Prestige oil spill: bacterial community dynamics during a field biostimulation assay. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77:935–945.

- ◆ Jing-Liang Li y Bing-Hung Chen. 2009. Surfactant-mediated Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Review. Materials 2:76-94.
- ◆ Johnsen A. R., Wick L. Y. and Harms H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environmental Pollution. 133:71-84.
- ◆ Johnsen A. R., Wick L.Y. y Harms H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environ Pollut. 133:71–84.
- ◆ Johnsen A., Schmidt S., Hybholt T., Henriksen S., Jacobsen C. and Andersen O. 2007. Applied and Environmental Microbiology, 73, 1474-1480.
- ◆ Jørgensen K.S., Puustinen J. y Suortti A. M. 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. Environmental Pollution 107: 245-254.
- ◆ Kaczorek E., Moszyńska S. y Olszanowski A. 2011. Modification of cell surface properties of *Pseudomonas alcaligenes* S22 during hydrocarbon biodegradation. Biodegradation. 22(2): 359–366.
- ◆ Kanaly R. A. and Harayama S. 2000. Biodegradation of High-Molecular-Wight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. Journal of Bacteriology. 182:2059-2067.
- ◆ Kanaly R. A. y Harayama S. 2000. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. J. Bacteriol. 182:2059-2067.
- ◆ Karamalidis A.K., Evangelou A.C., Karabika E., Koukkou A.I., Drainas C. y Voudrias E.A. 2010. Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet. Bioresource Technology. 101:6545–6552.
- ◆ Kästner, M. 2000. Humification: process or formation of refractory soil organic matter. En J. Klein (Ed), Biotechnology. Environmental processes II. Soil decontamination. Wiley-VCH. Weinheim. pp. 89-126.
- ◆ Kennedy, A.C. & Smith, K.L. 1998. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. Plant and Soil, 170, 75–86.
- ◆ Kennicutt M.C., Sweet S.T., Fraser W.R., Stockton W.L., Culver M. 1991. Grounding of the Bahia Paraiso at Arthur Harbor, Antarctica. 1. Distribution and fate of oil spill related hydrocarbons. Environ. Sci. Technol. 25 (3): 509–518.

- ◆ Koch I. H. 2008. Assessment of soil bacterial communities with emphasis on the phylum Acidobacteria. Tesis. Der Fakultät Für Biologie Der Ludwig-Maximilians-Universität München. Biodegradation. 5:37-46.
- ◆ Kyung-Hee S, Yeonghee A, Kyoung-Woong K. 2005. Toxic effect of biosurfactant addition on the biodegradation of phenanthrene. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24, 2768-2774.
- ◆ Ladd, J. N., R. C. Foster, P. Nannipieri y J. M. Oades. 1996. Soil structure and biological activity. *Soil Biochem*. 9:23-78.
- ◆ Lanfranconi M., Alvarez H. M., and Studdert C. A. 2003. A strain isolated from gas oil-contaminated soil displays chemotaxis toward gas oil and hexadecane. *Environmental Microbiology*. 5(10):1002-1008.
- ◆ Lee Dal-Heui, Cody Robert D., Kim Dong-Ju, Choi Sangil. 2002. Effect of soil texture on surfactant-based remediation of hydrophobic organic-contaminated soil *Environment International* 27: 681 -688.
- ◆ Lee y Tremablay. 1995. Bioremediation of oiled beach sediments. Assessment of inorganic and organic fertilizers.
- ◆ Lei L., Khodadoust A. P., Suidan M. T. And Tabak H. H. 2004. Biodegradation of sediment-bound PAHs in field-contaminated sediment. *Water Research*. 1-13.
- ◆ Lei Z., Lan-ying Z., Yong-lei A., Na L., Song G. 2011. Removing BTEX from Contaminated Groundwater by Adsorption of Peat and Degradation of Immobilized Microorganism. *Coll. of Environ. & Resource, Jilin Univ., Changchun, China. Bioinformatics and Biomedical Engineering, (iCBBE) 2011 5th International Conference*.
- ◆ Lina T., Panb P. y Cheng S. 2010. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*. 176:27–34.
- ◆ Liu, W. T., T. L. Marsh, H. Cheng y L. J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA *Appl. Env. Microbiol*. 63:4516-4522.
- ◆ Ma Y., Wang L. y Shao Z. 2006. Pseudomonas, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. *Environ. Microbiol*. 8:455-465.

- ◆ Mac Cormack W. P. 1999. Selección, caracterización y evaluación del potencial biotecnológico de bacterias sicrotróficas degradadoras de hidrocarburos. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, 192 pp.
- ◆ Mac Cormack WP, Ruberto LAM, Curtosi A, Vodopivec C, Pelletier E. 2011. Human impacts in the Antarctic coastal zones: the case study of hydrocarbons contamination at Potter Cove, South Shetland Islands”. En: Scott Coffen-Smout (Co-Editor) Ocean Year Book. Brill/Martinus Nijhoff Publishers. Dalhousie University, Nova Scotia. 25: 141-170.
- ◆ Macnaughton, S., Stephen J., Venosa, A., Davis G., Chang Y., Whyte G. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. Applied and Environmental Microbiology. 8:3566-3573.
- ◆ Madueño L., Coppotelli B. M., Alvarez H. M. y Morelli I. S. 2011. Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina. International Biodeterioration & Biodegradation 65:345-351.
- ◆ Maeda R., Ito Y., Iwata K. and Omori T. 2010. Comparison of marine and terrestrial carbazole-degrading bacteria. Current Research. Technology and Education Topics in Applied Microbiology Biotechnology. 1311-1321.
- ◆ Margesin R, Hämmerle M, Tscherko D. 2007. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil contaminate soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. Microb Ecol. 53:259 – 269.
- ◆ Margesin R., Labbe D., Schinner F., Greer C.W. y Whyte L.G. 2003. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. Appl Environ Microbiol. 69: 3085–92.
- ◆ Margesin R., Zhang D. and Busse H. 2011. *Sphingomonas alpina* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from alpine soil. Int J Syst Evol Microbiol.
- ◆ Margesin, R. and Schinner, F. 1997. Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47: 462–468.
- ◆ Margesin, R. y F. Schinner. 1997b. Laboratory bioremediation experiments with soil from a diesel-oil contaminated site: significant role of cold adapted microorganisms and fertilizers. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 70(1):92-98.

- ◆ Martínková L., Uhnáková B., Pátek M., Nešvera J., Křen V. 2009. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International* 35: 162 –177.
- ◆ Massias, D., V. Grossi, J. C. Bertrand. 2003. In situ anaerobic degradation of petroleum alkanes in marine sediments: preliminary results. *Comptes Rendus Geoscience* 335:435-439.
- ◆ Mehmannaavaz R., Prasher S. O., and Ahmad D. 2000. Cell surface properties of rhizobial strains isolated from soils contaminated with hydrocarbons: hydrophobicity and adhesion to sandy soil. *Process Biochemistry*. 36:683-688.
- ◆ Menn, F-M., J. P. Easter y G. S. Sayler. 2000. Bacterial activity enhancement and soil decontamination. In H.J.Rehm, G.Reed, A.Pühler and P.Stadler, editors, *Biotechnology. Environmental processes II. Soil decontamination*. Wiley-VCH. Weinheim. pp. 425-439.
- ◆ Mestre M. C. 2006. Caracterización bioquímica y molecular de los componentes cultivables de un consorcio bacteriano antártico capaz de degradar hidrocarburos. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. pp.85
- ◆ Miller, D.N., and Smith R.L. 2009. Microbial characterization of nitrification in a shallow, nitrogen-contaminated aquifer, Cape Cod, Massachusetts and detection of novel cluster associated with nitrikying Betaproteobacteria. *Journal of Contaminated Hydrology*. 103:182.193.
- ◆ Mishra, S., J. Jiot, R. C. Kuhad y L. Banwari. 2001. Evaluation of Inoculum to Stimulate in situ bioremediation of oily sludge-contaminated soil. *Appl. Env Microbiol*. 67:1675-1681.
- ◆ Morgan, P. y R. J. Watkinson. 1992. Factors limiting the supply and efficiency of nutrient and oxygen supplements for the in situ biotreatment of contaminated soil and groundwater.
- ◆ Morita, R.Y. 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39, 144-167.
- ◆ Mrozika A. and Piotrowska-Segetb Z. 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*. 165 (5): 363-375.

- ◆ Mulligan, C. N. 2001. An overview of in situ bioremediation processes. Proceedings of the 29 Th Annual Conference of the Canadian Society for Civil Engineering. Victoria, BC, May 30-June 2. Montreal, PQ:Canadian Society of Civil Engineering.
- ◆ Mulligan, C. N., and Yong, R. N. 2004. Natural attenuation of contaminated soils. *Environment International*. 30: 587-601.
- ◆ Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U, Santegoedes C, Schäfer H, Wawer C. 1998. Denaturing gradient electrophoresis (DGGE) in microbial ecology Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn F. *Molecular Microbial Ecology Manual* Kluwer Dordrecht. 1– 27.
- ◆ Nannipieri P., Scher J.A, Eccherini M.T.C, Ietramellara and Grenella, G.P. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European journal of soil science*. 54, 655–670.
- ◆ Nannipieri, P. and Badalucco, L. 2003. Biological processes. In: *Processes in the Soil–Plant System: Modelling Concepts and Applications* (eds D.K. Bembé & R. Nieder). The Haworth Press, Binghamton, NY, in press.
- ◆ Nannipieri, P. and Badalucco, L. 2003. Processes in the Soil–Plant System: Modelling Concepts and Applications. *European Journal of Soil Science*. 54: (4): 655–670.
- ◆ Nannipieri, P., Kandeler, E. & Ruggiero, P. 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: *Enzymes in the Environment* (eds R.G. Burns & R. Dick), pp. 1–33. Marcel Dekker, New York.
- ◆ Nikolopoulou, M. y Kalogerakis, N. 2008. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Marine Pollution Bulletin*. 56:1855–1861.
- ◆ O’Toole G. A. y Kolter R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*. 28: 449-461.
- ◆ Obuekwe C., Al-Jadi Z. K. y Al-Saleh E.S. 2009. Hydrocarbon degradation in relation to cell surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum contaminated Kuwait desert environment. *Int Biodeter Biodegrad* 63: 273–279.
- ◆ Olsen, P.E., Rice, W.A., Bordeleau, L.M., Demidoff, A.H., Collins, M.M. 1996. Levels and identities of nonrhizobial microorganisms found in commercial legume inoculant made with nonsterile peat carrier, *Can. J. Microbiol*. 42: 72.

- ◆ Ortega-Calvo J., Marchenko A., Vorobyov A. and Borovick R. 2003. Chemotaxis in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from coal-tar and oil-polluted rhizospheres. *FEMS Microbiology Ecology*. 44:373-381.
- ◆ Palleroni N. J., Port A. M., Chang H. and Zylstra G. J. 2004. Hydrocarboniphaga effusa gen. nov., sp. nov., a novel member of the ϵ -Proteobacteria active in alkane and aromatic hydrocarbon degradation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54: 1203–1207.
- ◆ Pandey G. y Jain R. 2002. Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation (Minireviews). *Applied and Environmental Microbiology*. 68:5789-5795.
- ◆ Janmejy Pandey, Archana Chauhan & Rakesh K. Jain. 2009. Review Article. Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation. *FEMS Microbiol Rev*. 33: 324–375.
- ◆ Panicker G, Aislabie J, Saul D, Bej AK. 2002. Cold tolerance of *Pseudomonas* sp 30-3 isolated from oil-contaminated soil, Antarctica. *Polar Biol*. 25: 5-11.
- ◆ Parales E. R. y Haddock J. D. 2004. Biocatalytic degradation of pollutants. *Current opinion in biotechnology*. 15: 374-379.
- ◆ Pearson A., Kraunz K.S., Sessions A.L., Dekas A.E., Leavitt W.D., and Edwards K. J. 2008. Quantifying Microbial Utilization of Petroleum Hydrocarbons in Salt Marsh Sediments by Using the ^{13}C Content of Bacterial rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(4) 1157–1166.
- ◆ Pearson K. 1926. On the coefficient of racial likeness. *Biometrika*. 18:105:117.
- ◆ Petrić I., Bru D., Udiković-KolN., Hrsak D., Philippot L., Martin-Laurent F. 2011. Evidence for shifts in the structure and abundance of the microbial community in a long-term PCB-contaminated soil under bioremediation. *Journal of Hazardous Materials*. 195: 254– 260.
- ◆ Pielou E. C. 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology* 13, 131–144.
- ◆ Pietramellara, G., Dal Canto, L., Vettori, C., Gallori, E. and Nannipieri, P. 1997. Effects of air-drying and wetting cycles on the transforming ability of dna bound on clay minerals. *Soil biology and biochemistry*, 29, 55–61.

- ◆ Pirt S. J. 1975. Parameters of growth and analysis of growth data. En: Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scientific Publications. Londres. pp. 4-15.
- ◆ Poland, J. S., Riddle, M. J. and Zeeb, B. A. 2003. Contaminants in the Arctic and the Antarctic: a comparison of sources, impacts, and remediation options. Polar Rec. 39: 369–383.
- ◆ Polti M.A, García R.O, Amoroso M. J, Abate C. M. 2009. Bioremediation of chromium (VI) contaminated soil by *Streptomyces* sp. MC1. Polti MA, García RO, Amoroso MJ, Abate CM. J Basic Microbiol. 49(3):285-92.
- ◆ Pritchard, P. H. y C. F. Costa. 1991. EPA's Alaska oil spill bioremediation project. Environ. Sci. Technol. 25:372-379.
- ◆ Rahman, N. Z, Ghazali F. M, Salleh A. B, Basri M. 2006. Biodegradation of Hydrocarbon Contamination by Immobilized Bacterial Cell The Journal of Microbiology. 354-359.
- ◆ Rashid M. H., y Kornberg A. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:4885-4890.
- ◆ RCTA XXXII - IP 4 (SCAR) 2009. Código de conducta ambiental del SCAR para las investigaciones científicas sobre el terreno en la Antártida.
- ◆ Reasoner D. y Geldreich E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Applied and Environmental Microbiology. 49:1-7.
- ◆ Reddy, K. y S. Chinthamreddy, 1999. Electrokinetic remediation of heavy metal-contaminated soils under reducing environments. Waste Manage., 19: 269-282.
- ◆ Reddy, K.J., Wang, L. and Gloss, S.P. 1995. Solubility and mobility of copper, zinc and lead in acidic environments. Plant and Soil. 171, 53-58.
- ◆ Reynolds E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy, J. Cell. Biol. 17:208–212.
- ◆ Robles IV, Fava F, Poggi HM. 2008. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and Sediments. Microbial Cell Factories, 7:5.
- ◆ Röling W. F., Milner M. G., Jones M., Lee K., Daniel F., Swannell R. J. P. y Head I. M. 2002. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. Appl. Environ. Microbiol. 68: 5537-5548.
- ◆ Ronald L. Crawford. 2002. Encyclopedia of Bioprocess Technology. Bioremediation.

- ◆ Ros M., Rodríguez I., García C., Hernández T. 2010. Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic Amendments. *Bioresource Technology*. 101: 6916–6923.
- ◆ Rosa A.P., Triguís J.A. 2007. Bioremediation process on Brazil shoreline. Laboratory experiments. *Environ Sci Pollut Res Int*. 14(7):470-6.
- ◆ Rosenberg M. 2006. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. Minireview. *FEMS Microbiol Lett*. 262:129–134.
- ◆ Ruberto A. M, Vázquez S., Lobalbo A. y Mac Cormack W. P. 2005. Psychrotolerant hydrocarbon-degrading *Rhodococcus* strains isolated from polluted Antarctic soils. *Antarctic Science*. 17 (1): 47–56.
- ◆ Ruberto L, Vazquez S.C, Dias R.L, Hernández E.A, Coria S.H, Levin G., Lo Balbo A., Mac Cormack W.P. 2010. Small-scale studies toward a rational use of bioaugmentation in an Antarctic hydrocarbon-contaminated soil. *Antarctic Science*. 22 (5), 463-469.
- ◆ Ruberto L, Vazquez S.C, Dias R.L, Hernández E.A, Coria SH, Levin G, Lo Balbo A, Mac Cormack WP. 2010. Small-scale studies toward a rational use of bioaugmentation in an Antarctic hydrocarbon-contaminated soil. *Antarctic Science*. 22 (5): 463-469.
- ◆ Ruberto L. 2009. Biodegradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en suelos expuestos a bajas temperaturas. Las bacterias antárticas como herramienta de biorremediación. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.
- ◆ Ruberto L. A. M., Vázquez S. C., Curtosi A., Mestre M. C., Pelletier E., Mac Cormack W. P. 2006. Phenanthrene Biodegradation in Soils Using an Antarctic Bacterial Consortium. *Bioremediation Journal*. 10(4):191–201.
- ◆ Ruberto L., Vazquez S. C. y Mac Cormack W. P. 2003. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 52: 115 – 125.
- ◆ Sabaté, J., M. Viñas, and A. M. Solanas. 2004. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *Int. Biodeterior. Biodegrad*. 54: 19–25.
- ◆ Samanta S. K, Singh O. V. y Jain R. K. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in biotechnology (review)*. 20:243-248.

- ◆ Sanscartier D., Zeeb B., Koch I. y Reimer K. 2009. Bioremediation of diesel-contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates. *Cold Regions Science and Technology*. 55: 167–173.
- ◆ Sanscartier D., Zeeb B., Koch I., Reimer K. 2009. Bioremediation of diesel-contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates. *Cold Regions Science and Technology* 55: 167– 173.
- ◆ Shannon C. E. 1948. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* 27, 379–423.
- ◆ Sharma M., y Anad S. K. 2002. Swarming: A coordinated bacterial activity. *Current Science*. Review articles. 83:707-715.
- ◆ Sharpley, A. N. 1991. Effect of soil pH on cation and anion solubility. *Commun. Soil. Sci. Plant Anal.* 22:1391-1399.
- ◆ Shrestha P.M., Noll M., Liesack W. 2007. Phylogenetic identity, growth-response time and rRNA operon copy number of soil bacteria indicate different stages of community succession. *Environ Microbiol.* 9:2464–74.
- ◆ Silva, R. Relación entre el metabolismo de lípidos y la adaptación a la presencia de contaminantes y a condiciones ambientales en bacterias autóctonas. 2008. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. P.
- ◆ Simpson E. H. 1949. Measurement of diversity. *Nature*. 163:688.
- ◆ Sorkoh, N. A., A. S. Ibrahim, M. A. Ghannoum y S. S. Radwan. 1993. High temperature hydrocarbon degradation by a *Bacillus stearothermophilus* from oil polluted Kuwaiti
- ◆ Stotzky, G. 1997. Soil as an environment for microbial life. In: *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York. pp. 1–20.
- ◆ Thalman A. 1968. Zur Methodik der bestimmung der dehydrogenaseaktivität im boden mittels triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) *Landwirtsch Forsch* 21:249–258.
- ◆ Thompson I.P, van der Gast C.J, Ciric L., Singer A.C. 2005. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environ Microbiol.* 7(7):909-15.
- ◆ Tiehm A. 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 258-263.
- ◆ Torsvik, V., L. Ovreas y T. F. Thingstad. 2003. Prokaryotic Diversity - Magnitude, Dynamics and Controlling Factors. *Science*. 296:1064-1066.

- ◆ Torsvik, V.L., Sørheim, R. & Goksoyr, J. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. *Journal of Industrial Microbiology*, 17, 170–178.
- ◆ USEPA. 1999. Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action and underground storage tank sites. OSWER Directive Number 9200.4-17P. Office of Solid Waste and Emergency Response. Washington, DC.
- ◆ Vacca D. J., Bleam W. F. and Hickey W. J. 2005. Isolation of Soil Bacteria Adapted To Degrade Humic Acid-Sorbed Phenanthrene. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 3797-3805.
- ◆ Van Dyke, M.I., and Prosser, J.I. 2000. Enhanced survival of *Pseudomonas fluorescens* in soil following establishment of inoculum in a sterile soil carrier, *Soil Biol. Biochem.* 32, 1377.
- ◆ Van Stempvoort D., Biggar K., Filler D.M., Johnson R.A., Armstrong J., Snape I., Mumford K., Bainbridge S., Barnes D.L. and Schnable W. 2007. Emerging technologies in environmental remediation for cold regions. In: D.M. Filler, D.L. Barnes, and I. Snape (Eds.), *Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Cold Regions*, Cambridge University Press. In Press (December).
- ◆ Vázquez, B. Nogales, Ruberto L., Hernández E., Christie –Oleza J., Lo Balbo A., Bosch R., Lalucat J. and Mac Cormack W. 2009. Bacterial Community Dynamics during Bioremediation of Diesel Oil-Contaminated Antarctic Soil. *S. Microbial Ecology*. 57 (4): 598-610.
- ◆ Vecchioli G., Del Panno M. y Panceira M. 1990. Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil. *Environmental Pollution*. 67:249-258.
- ◆ Velasco, J.A. y Volke Sepúlveda, T.L. 2003. El composteo: una alternativa ecológica para la biorremediación de suelos en México. *Gaceta Ecológica*. 66: 41-53.
- ◆ Verónica A. Barragán, Iván Aveiga, Gabriel Trueba. 2008. Microbial community composition in petroleum contaminated and uncontaminated soil from Francisco de Orellana, in the Northern Ecuadorian Amazon. *International Microbiology*. 11:121-126.
- ◆ Viñas, M., Sabaté J., Espuny M. J., and Solanas A. M. 2005. Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. *Applied And Environmental Microbiology*. 71(11): 7008–7018.

- ◆ Vogel, T.M. 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology* 7, 311-316.
- ◆ Walworth J., Pond A., Snape I., Rayner J., Ferguson S. and Harvey P. 2007. Nitrogen requirements for maximizing petroleum bioremediation in a sub-Antarctic soil *Cold Regions Science and Technology*. 48: 84 – 91.
- ◆ Ward OP, Singh A. 2004. Evaluation of current soil bioremediation technologies. In: Singh A, and Ward OP (eds). *Applied bioremediation and phytoremediation*. Soil biology series, vol 1 Springer, Berlin Heidelberg New York. XIX, 281 p. 19 illus.
- ◆ White P.A., Claxton L.D. 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutat. Res. Rev. Mutat.* 567: 227–345.
- ◆ Whyte L. G., Bourbonniere L. y Greer C. W. 1997. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. *Appl Environ Microbiol* 63:3719–3723.
- ◆ Whyte L. G., Schultz A., van Beilen J.B. 2002. Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. *FEMS Microbiol Ecol.* 41:141–50.
- ◆ Whyte, L. G., L. Bourbonniere y C. Bellrose, C. 1999. Bioremediation assessment of hydrocarbon-contaminated soils from the High Arctic. *Bioremed. J.* 3:69-79.
- ◆ Whyte, L.G., Slagman, S.J., Pietrantonio, F., Bourbonnière, L., Koval, S.F., Lawrence, J.R., Inniss, W.E. y Greer, C.W. 1999. Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by a *Rhodococcus* sp. Strain Q15. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 2961-2968.
- ◆ Wilfred F. M. Röling, Michael G. Milner, D. Martin Jones, Kenneth Lee, Fabien Daniel, Richard J. P. Swannell, and Ian M. Head. 2002. Robust Hydrocarbon Degradation and Dynamics of Bacterial Communities during Nutrient-Enhanced Oil Spill Bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (11):5537–5548.
- ◆ Wong J, Fang M, Zhao Z, Xing B. 2004. Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions. *J. Environ. Qual*, 33: 2015-2025.
- ◆ www.gtz.org.mx/sitios-contam/articulos/Bioremed_Mex2.pdf.

- ◆ Wynn-Williams D. D. 1992. Counting bacterial colony-forming units in soil. En: Wynn-Williams DD (Ed) BIOTAS Manual of methods for Antarctic Terrestrial and Freshwater Research, Section II, Scientific Committee on Antarctic Research, Cambridge, UK. 3 pp.
- ◆ Xu Y. and Lu M. 2010. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials* 183: 395–401.
- ◆ Xua Y. and Lu M. 2010. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials*. 183:395–401.
- ◆ Yang S., Jin H., Wei Z., He R., Ji Y., Li X. and Yu S. 2009. Bioremediation of Oil Spills in Cold Environments: A Review. *Pedosphere*. 19(3): 371–381.
- ◆ Yates M. V. y Yates S. R. 1990. Modelling microbial transport in soil and groundwater. *ASM News*. 56:324-7.
- ◆ Ying T., Yongming L., Mingming S., Zengjun L., Zhengao L. and Peter C. 2010. Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresource Technology*. 101: 3437–3443.
- ◆ Zhang J., Sun Z., Li Y., Peng X., Li W., Yan Y. 2009. Biodegradation of p -nitrophenol by *Rhodococcus* sp. CN6 with high cell surface hydrophobicity. *Journal of Hazardous Materials*. 163: 723–728.
- ◆ Zhou Y., Zhang Y., Zhi X., Wang X., Dong J., Chen Y., Lai R. and Li W. 2008. Description of *Sinobacter flavus* gen. nov., sp. nov., and proposal of *Sinobacteraceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58, 184–189.
- ◆ Zhu X., Venosa A. D. y Suidan M. T. 2004. Literature review on the use of commercial bioremediation agents for cleanup of oil-contaminated estuarine environments. EPA/600/R-04/075, Office of Research and Development, U.S. EPA, Cincinnati, OH, 56 pp.