



TESIS DE MAESTRÍA EN:

Procesos Biotecnológicos

Título:

“Desarrollo de procesos para la biorremediación de suelos de la Provincia de Tierra del Fuego contaminados con hidrocarburos utilizando microorganismos autóctonos”

Autora: Bioq. Mónica González Maldonado

Director de Tesis: Dr. Lucas A.M. Ruberto

Codirector de Tesis: Dr. Víctor D. Busto

Buenos Aires – Septiembre 2023

A mi hijo, que me motiva a ser cada día mejor

Agradecimientos

- A la Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Buenos Aires y a la Maestría en Procesos Biotecnológicos por mi formación académica.
- Al Departamento de Ingeniería Química-UTN -FRBA por facilitar sus instalaciones para la realización de esta tesis.
- Al Dr Lucas Ruberto, por la dirección del proyecto y por su disposición a guiarme y acompañarme durante todo este tiempo.
- Al Dr Víctor Busto, por el acompañamiento, el tiempo y la paciencia para terminar esta tesis.
- A la Ingeniera María del Carmen Gutiérrez por todo el apoyo brindado para la realización de esta tesis.
- A la Dra Susana Vázquez, por su colaboración y el asesoramiento con las técnicas de biología molecular.
- Al farmacéutico Fernando Reina por las determinaciones de los hidrocarburos.

Tabla de contenido

1	Resumen/Abstract	10
1.1	Resumen	10
1.2	Abstract	11
2	Introducción	13
2.1	Hidrocarburos del petróleo: clasificación y características	14
2.2	Contaminación con hidrocarburos del petróleo	18
2.3	Biodegradación de los hidrocarburos del petróleo	20
2.4	Técnicas de remediación de suelos contaminados	21
2.4.1	Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos	23
2.4.1.1	Atenuación natural	25
2.4.1.2	Bioaumentación	25
2.4.1.3	Bioestimulación	26
2.4.1.4	Fitorremediación	27
2.5	Factores que influyen en la biorremediación de suelos	28
2.6	Metabolismo de los hidrocarburos	29
2.6.1	Degradación aeróbica	31
2.6.2	Degradación anaeróbica	32
3	Objetivos	33
3.1	Objetivo general	33
3.2	Objetivos específicos	33
4	Materiales y métodos	34
4.1	Área de obtención del suelo	34
4.2	Caracterización del suelo	35
4.2.1	Humedad del suelo	35
4.2.2	pH del suelo	35
4.2.3	Hidrocarburos totales de petróleo (HTP)	36
4.2.4	Evaluación del número de bacterias aerobias totales (BAT) y bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH)	37
4.2.5	Actividad biológica total (ABT)	38
4.3	Ensayo de biodegradabilidad de hidrocarburos	39
4.4	Ensayo de bioestimulación de microorganismos autóctonos	39
4.5	Aislamiento y conservación de microorganismos degradadores de hidrocarburos	41
4.5.1	Caracterización microbiológica y bioquímica de los aislamientos microbianos degradadores de hidrocarburos	42
4.5.2	Identificación taxonómica de los aislamientos microbianos degradadores de hidrocarburos por biología molecular	42
4.5.3	Evaluación de la capacidad degradadora de hidrocarburos de los aislamientos microbianos	45
4.6	Análisis estadístico	46
5	Resultados y discusión	47
5.1	Caracterización del suelo	47
5.2	Ensayo de biodegradabilidad de hidrocarburos	47

5.3	Ensayo de bioestimulación de microorganismos autóctonos	50
5.3.1	Recuento de bacterias totales degradadoras de hidrocarburos y actividad biológica total	52
5.3.2	Biodegradación de los hidrocarburos totales del petróleo	58
5.4	Aislamiento y caracterización microbiológica de microorganismos degradadores de hidrocarburos	61
5.4.1	Caracterización bioquímica e identificación taxonómica por biología molecular de microorganismos degradadores de hidrocarburos	64
5.4.2	Evaluación de la capacidad degradadora de hidrocarburos de los aislamientos microbianos	68
6	Conclusiones	72
7	Anexos	74
7.1	Medio salino basal (Espeche y col., 1994)	74
7.2	Agar gasoil	75
7.3	Agar R2A	75
7.4	Solución de 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP)	75
7.5	Agar nutritivo al 50%	76
7.6	Soluciones para evaluar actividad biológica total (ABT) (Adam y Duncan, 2001)	76
7.7	Medios y coloraciones empleados en la caracterización bioquímica y microbiológica	76
8	Bibliografía	80

Índice de Figuras

Figura 1. Hidrocarburos que componen el petróleo crudo, según lo descrito por Koshlaf y Ball, (2017).	15
Figura 2. Estructuras y nomenclatura de los 16 PHA considerados como contaminantes prioritarios según la US-EPA (Koshlaf y Ball, 2017).	16
Figura 3. Estructura molecular de las resinas(Koshlaf y Ball, 2017).....	17
Figura 4. Estructura molecular de los asfaltenos (Koshlaf y Ball, 2017).....	17
Figura 5. Principales factores que afectan la biodegradación de los hidrocarburos (Gkorezis y col., 2016).	29
Figura 6. Posibles vías de utilización de los hidrocarburos por microorganismos. En las reacciones quimiotróficas una parte del hidrocarburo es utilizada en el catabolismo y otra parte para formar biomasa (Widdel y Rabus, 2001).	30
Figura 7. Tres posibles vías de degradación de los n-alcanos (Varjani S. J., 2017)	31
Figura 8. Esquema de trabajo del ensayo de biodegradabilidad in vitro de hidrocarburos.....	39
Figura 9. Armado de los sistemas microcosmos empleados en el ensayo de bioestimulación de microorganismos autóctonos.	40
Figura 10. Recuento de BAT y BDH del suelo contaminado en el ensayo de biodegradabilidad de hidrocarburos.	49
Figura 11. ABT determinada en el suelo contaminado y en el control abiótico durante el ensayo de biodegradabilidad de hidrocarburos.	49
Figura 12. Concentraciones iniciales y finales de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) determinados en el suelo contaminado y en el control abiótico en el ensayo de biodegradabilidad de hidrocarburos.	50
Figura 13. Recuento de BAT en los sistemas control de comunidad y bioestimulados, expresado en UFC/g suelo.	54
Figura 14. Recuento de BDH en los sistemas control de comunidad y bioestimulados, expresado en UFC/g suelo.	55
Figura 15. Comportamiento de la relación BDH/BAT en los sistemas control de comunidad y bioestimulados.....	56
Figura 16. Actividad biológica total (ABT) determinada por la técnica de la fluoresceína diacetato (FDA), donde se observa la diferencia de intensidades de coloración generada por la presencia de fluoresceína en el control abiótico (C) y en el suelo analizado (Mx).....	57

Figura 17. Actividad biológica total expresada en μg de fluoresceína/g suelo en los sistemas control de comunidad y bioestimulados.....	58
Figura 18. Concentración de HTP iniciales y luego de 40 días de incubación en los sistemas control de comunidad, bioestimulados y control abiótico.....	59
Figura 19. Desarrollo de colonias aisladas en placa con AGO a partir de la última dilución seriada del recuento de bacterias degradadoras.....	62
Figura 20. Aislamiento bacteriano en AGO.....	62
Figura 21. Aislamiento del hongo micelial en AGO.....	63
Figura 22. Coloración de Gram de uno de los aislamientos de bacilos gramnegativos.....	63
Figura 23. Coloración de Gram del aislamiento correspondiente al hongo micelial.....	63
Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico extraído de los 11 aislamientos. Calles: C+: control positivo, 1: PBR-1, 2:PBR-2, 3: PBR-3, 4: PBR-4, 5: PBR-5, 6: PBR-6, 7: PBR-7, 8: PBR-8, 9: PBR-9, 10: PBR-10, 11: PBR-11.....	65
Figura 25. Perfil de degradación de hidrocarburos de <i>Cadophora sp.</i> , donde se puede observar el cambio de color del DCPIP en los tubos con dodecano y gasoil en comparación con los tubos control de sustrato (CS).....	70

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen de técnicas disponibles para remediación de suelos contaminados (Lim y col, 2016).....	22
Tabla 2. Principales características de las técnicas de biorremediación utilizadas en suelos contaminados con hidrocarburos (Koshlaf y Ball, 2017).....	24
Tabla 3. Criterios de evaluación del suelo según su pH.....	36
Tabla 4. Composición de los microcosmos empleados en el ensayo de bioestimulación de microcosmos autóctonos.....	40
Tabla 5. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR del gen del ARNr 16S.....	43
Tabla 6. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de la región D1/D2 del gen del ARNr 26S.	44
Tabla 7. Diseño experimental utilizado para evaluar la capacidad degradadora de hidrocarburos de los aislamientos microbianos.	45
Tabla 8. Caracterización del suelo contaminado en términos de humedad, pH, bacterias aerobias totales (BAT), bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH), actividad biológica total (ABT) e hidrocarburos totales del petróleo (HTP). Todos los valores representan la media \pm desviación estándar (SD) de cada determinación.....	47
Tabla 9. Recuento de bacterias aerobias totales (BAT), bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) y actividad biológica total (ABT) en el ensayo de bioestimulación. Los valores presentados corresponden a los datos obtenidos de una unidad experimental (microcosmo) representativa de tres unidades experimentales a cada tiempo de muestreo.	53
Tabla 10. Pruebas bioquímicas realizadas a cada aislamiento microbiano.	64
Tabla 11. Afiliación taxonómica de los aislamientos obtenidos, basada en la comparación de la secuencia parcial del ADNr 16S (bacterias) y región D1/D2 del 26S (hongos) contra secuencias homólogas de cepas tipo y genomas de referencia presentes en bases de datos especializadas...	67
Tabla 12. Perfil de degradación de hidrocarburos de los aislamientos microbianos.....	68
Tabla 13. Composición del agar R2A en g/L.....	75

Lista de abreviaciones

ABT: Actividad Biológica Total

AGO: Agar gasoil

BAT: Bacterias aerobias totales

BDH: Bacterias degradadoras de hidrocarburos

DCPIP: 2,6-diclorofenolindofenol

FDA: Diacetato de fluoresceína

FTIR: Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

HTP: Hidrocarburos totales del petróleo

MSB: Medio salino basal

PHA: Hidrocarburos aromáticos polinucleares

UFC: Unidades formadoras de colonias

1.1 Resumen

El petróleo sigue siendo en la tercera década del siglo XXI, la fuente principal de energía para la humanidad. Durante la rutina de extracción, distribución y almacenamiento de este, ocurren derrames que contaminan el ambiente. Estos derrames traen consecuencias sobre las propiedades fisicoquímicas y la biota en las matrices afectadas, entre ellos los animales y personas que la habitan, con consecuencias que trascienden el daño apreciable a simple vista. Por eso se hace necesario remediar este daño. Existen métodos fisicoquímicos (oxidación química, remoción térmica, etc.) para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Estas técnicas resultan en general costosas y poco amigables con el medio ambiente. Por otro lado, están los métodos basados en la actividad biológica. Así, la biorremediación usa el potencial biodegradador de los microorganismos (propios del suelo o agregados) para remediar los suelos contaminados. Estos métodos son costo-efectivos y tienen bajo impacto ambiental, su efectividad es afectada por factores tales como, propiedades del suelo, concentración de hidrocarburos, pH, temperatura, nutrientes, oxígeno y humedad. La bioestimulación es una de las técnicas de biorremediación que busca aumentar la actividad metabólica de la microbiota autóctona del suelo contaminado, por medio del aporte de nutrientes, oxígeno, humedad y otras modificaciones ambientales.

El objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar la eficiencia y factibilidad de aplicar un proceso de biorremediación para la remoción de hidrocarburos en un suelo contaminado de forma crónica de Ushuaia, Provincia de Tierra del Fuego, a escala de laboratorio en microcosmos. Inicialmente se realizó un ensayo de biodegradabilidad *in vitro* con el fin de evaluar si la microbiota autóctona del suelo tenía la capacidad de biodegradar el hidrocarburo presente bajo condiciones estables de temperatura y aireación. Se demostró que el suelo poseía una microbiota degradadora de hidrocarburos capaces de eliminar parte de los hidrocarburos presentes. Conociendo que existía esta microbiota degradadora de hidrocarburos, se realizó un ensayo de bioestimulación durante 40 días utilizando microcosmos en frascos de vidrio, en los que se mantuvieron constantes la temperatura, humedad y nutrientes. Se evidenció que la bioestimulación provocó un aumento en el número de las bacterias degradadoras de hidrocarburos que se vieron favorecidas por la adición de nutrientes y la presencia de hidrocarburos.

No se encontraron diferencias significativas en la remoción de hidrocarburos comparadas con los controles, pero se evidenció una respuesta por parte de los microorganismos en el sistema

bioestimulado indicando que esta estrategia puede ser efectiva tal vez con tiempos más prolongados de estudio.

Al final del ensayo se aislaron 11 cepas degradadoras de hidrocarburos, que fueron tipificadas y a las cuales se les evaluó el perfil degradador. La identificación mostró dos *Achromobacter* sp., ocho *Pseudomonas* sp. y el hongo micelial *Cadophora* sp. Entre las *Pseudomonas* sp. se encontró que algunas son capaces de crecer en gasoil, otras en gasoil y dodecano y otra en gasoil, dodecano y hexadecano. Los *Achromobacter* sp. crecieron en gasoil y uno además en dodecano mientras que el hongo *Cadophora* sp. creció en gasoil y dodecano.

1.2 Abstract

The petroleum hydrocarbons continue to be a source of fuel and energy for humanity, during the routine of extraction, distribution and storage of this, spills occur and pollute the environment. These spills bring consequences to the environment, the animals and people who inhabit it, so it is necessary to repair them. There are chemical, physicochemical and thermal techniques to remediate soils contaminated with hydrocarbons, but they are expensive and unfriendly to the environment. Bioremediation techniques use the biodegradable potential of the soil's microorganisms to remediate contaminated soils, are cost-effective and have low environmental impact, are affected by factors such as, soil properties, hydrocarbon concentration, pH, temperature, nutrients, oxygen and humidity. Biostimulation is one of the bioremediation techniques that seeks to increase the metabolic activity of the autochthonous microbiota of the contaminated soil, through the contribution of nutrients, oxygen, humidity and other environmental modifications.

The objective of this study was to apply a bioremediation process in a soil chronically contaminated with hydrocarbons in Ushuaia, Tierra del Fuego Province, at a laboratory scale in microcosm. Initially, an in vitro biodegradability test was carried out in order to evaluate whether the autochthonous soil microbiota had the capacity to biodegrade the hydrocarbon present under stable conditions of temperature and aeration. The soil showed that it possessed a hydrocarbon degrading microbiota capable of removing some of the hydrocarbons present. Knowing that there is a hydrocarbon degrading microbiota, a biostimulation test was carried out for 40 days using microcosms in glass bottles, the temperature, humidity and nutrients were kept constant. It was shown that biostimulation increase the hydrocarbon degrading bacteria and were favored by the addition of nutrients and de presence of hydrocarbons.

No significant differences were found in the removal of hydrocarbons compared to controls, but a response by the microorganisms in the biostimulated system was evident, indicating that this strategy may be effective perhaps with longer study times.

At the end of this study, 11 hydrocarbon degrading strains were isolated, their hydrocarbon degrading profile were typified and evaluated, two were identified as *Achromobacter sp.*, eight as *Pseudomonas sp.* and a mycelial fungus as *Cadophora sp.* Among the *Pseudomonas sp.*, some were found to grow only in diesel, others in diesel and dodecane, and others in diesel, dodecane and hexadecane; the *Achromobacter sp.*, grew on diesel, and one also on dodecane; *Cadophora sp.*, grew in diesel and dodecane.

Palabras clave: biorremediación de suelos, hidrocarburos, bioestimulación, biodegradabilidad, microorganismos degradadores.

2 Introducción

Durante las últimas décadas el petróleo ha constituido gran parte de la economía mundial, contribuyendo al desarrollo socio económico y tecnológico de distintas culturas y países. Los yacimientos de petróleo se encuentran en diversas zonas del planeta. Luego de ser extraído, el petróleo crudo debe ser transportado desde el sitio de extracción hasta donde se procesa. Prácticas extractivas inadecuadas y falencias en el transporte son las principales actividades que han provocado derrames y contaminación por décadas afectando aguas y suelos (Zawierucha y Malina, 2011). Los hidrocarburos del petróleo son considerados contaminantes persistentes y peligrosos. Algunos hidrocarburos tales como el benceno y el benzopireno son reconocidos como mutagénicos y carcinogénicos (Zeiger y col, 1987; IARC, 2000). En el caso particular de los suelos, la contaminación por hidrocarburos del petróleo genera cambios fisicoquímicos y biológicos, y como consecuencia, afecta la composición de las comunidades microbianas que los habitan y el crecimiento de plantas causando pérdidas económicas y desastres ecológicos. Todos estos cambios resultan en suelos que no pueden ser utilizados para otros fines y que se transforman en pasivos ambientales (Hentati y col.,2013).

La Patagonia Argentina se destaca por la explotación de sus recursos no renovables, siendo el sitio donde se genera el 84% de la producción petrolera argentina (Ministerio del Interior, s.f.). Según datos del Instituto Argentino del Petróleo y Gas, en el año 2020 se produjeron 27.960.989 m³ de petróleo en el país, destacándose empresas como YPF S.A (12.858.550 m³), Pan American Energy LLC (6.054.089m³) y Pluspetrol S.A. (1.483.421 m³), correspondiéndole a las provincias de la Patagonia 23.499.274m³ y más específicamente a la provincia de Tierra del Fuego, 327.092 m³ de petróleo producido para el mismo año (Ministerio de Desarrollo Productivo). Pese a que la explotación de yacimientos petroleros se encuentra regulada (ley 17319 del Poder Ejecutivo Nacional), los derrames de petróleo ocurren con frecuencia afectando al medio ambiente y a las personas que habitan en él, como se pueden ver en publicaciones del Diario Patagónico (<https://www.elpatagonico.com/derrame-petroleo-a2886>) siendo indispensable desarrollar e implementar técnicas que remedien los daños producidos y brinden soluciones a los habitantes de las regiones afectadas.

2.1 Hidrocarburos del petróleo: clasificación y características

Los hidrocarburos son una importante fuente de energía y materia prima para una variedad de industrias. Desde el punto de vista ecológico, son considerados compuestos recalcitrantes y se clasifican como contaminantes prioritarios que afectan el ambiente y los seres vivos (Srivastava y col., 2019).

El petróleo es producido a partir de la descomposición y transformación de materiales orgánicos que han estado enterrados durante millones de años. Cuando se extrae, el crudo es transportado a refinerías en donde es procesado y transformado en otros productos (Varjani, 2016). Desde el punto de vista molecular, los hidrocarburos están compuestos principalmente por hidrógeno y carbono y en menor proporción por nitrógeno, azufre y oxígeno. El petróleo crudo se compone de una mezcla de compuestos que están clasificados en cuatro fracciones de acuerdo a lo establecido por Balba y col (1998) y como se ilustra en la Figura 1 según Koshlaf y Ball (2017).

- a. Hidrocarburos alifáticos (saturados): Hidrocarburos de enlaces simples, se encuentran en mayor proporción en el petróleo crudo. Incluye alcanos (parafinas) y cicloalcanos (nafteno). Son derivados del metano, contienen estructuras lineales saturadas o insaturadas o ramificadas. Cuando hay derrames de petróleo los alcanos alifáticos se volatilizan rápidamente, pero los de cadenas más largas (C₂₀-C₄₀) son más persistentes en el suelo y difíciles de degradar debido a su estructura y a su baja solubilidad en el agua.
- b. Hidrocarburos aromáticos: Tienen uno o más anillos aromáticos. Esta fracción contiene hidrocarburos volátiles como el benceno, tolueno, xileno, etc., hidrocarburos poliaromáticos, naftaleno y componentes sulfúricos aromáticos.

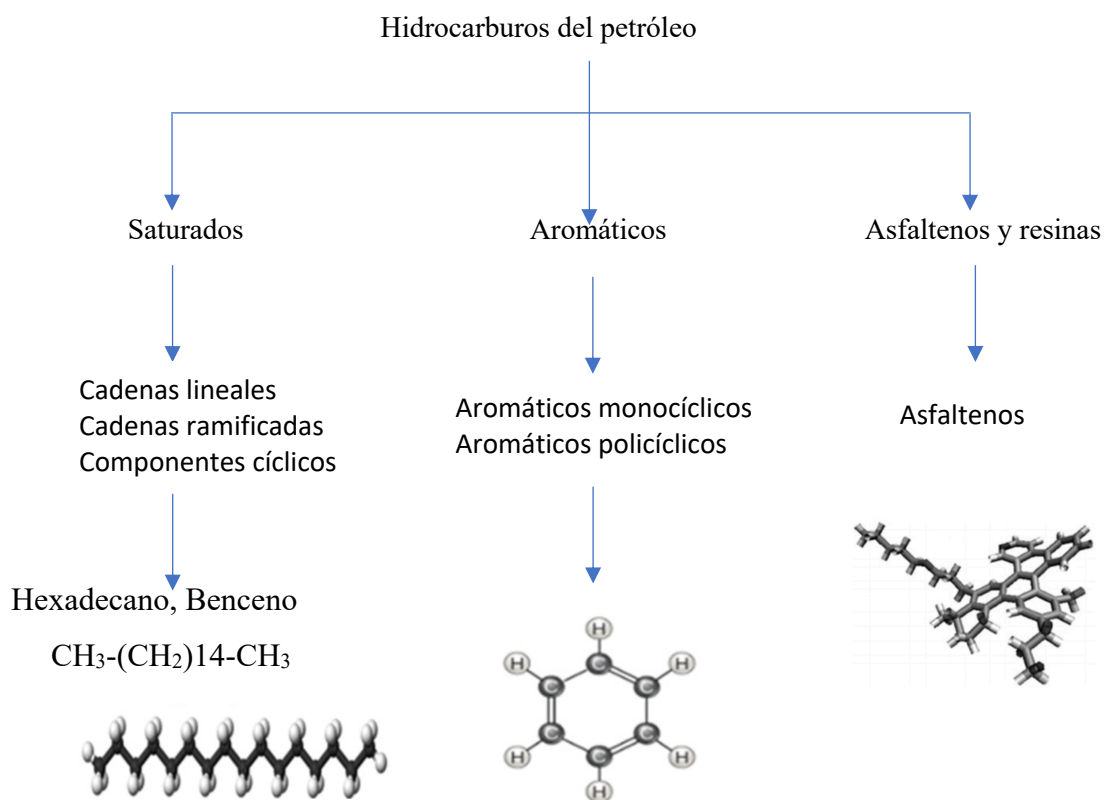


Figura 1. Hidrocarburos que componen el petróleo crudo, según lo descrito por Koshlaf y Ball, (2017).

Los hidrocarburos aromáticos polinucleares (PHA) son considerados mutagénicos y carcinogénicos (Organización Mundial de la Salud, 2010), y comprenden el 26-30% de los constituyentes del petróleo. Tienen alto peso molecular, baja reactividad química, baja solubilidad en el agua y volatilidad, y son sensibles a la luz, resistentes al calor y a la corrosión. Además, son recalcitrantes en el suelo (reduciendo su calidad y productividad), y su hidrofobicidad los hace difícil de ser degradados. La U.S. Environmental Protection Agency (US-EPA) tiene un listado de 16 PAH como contaminantes prioritarios, algunos de estos considerados carcinogénicos (Figura 2).

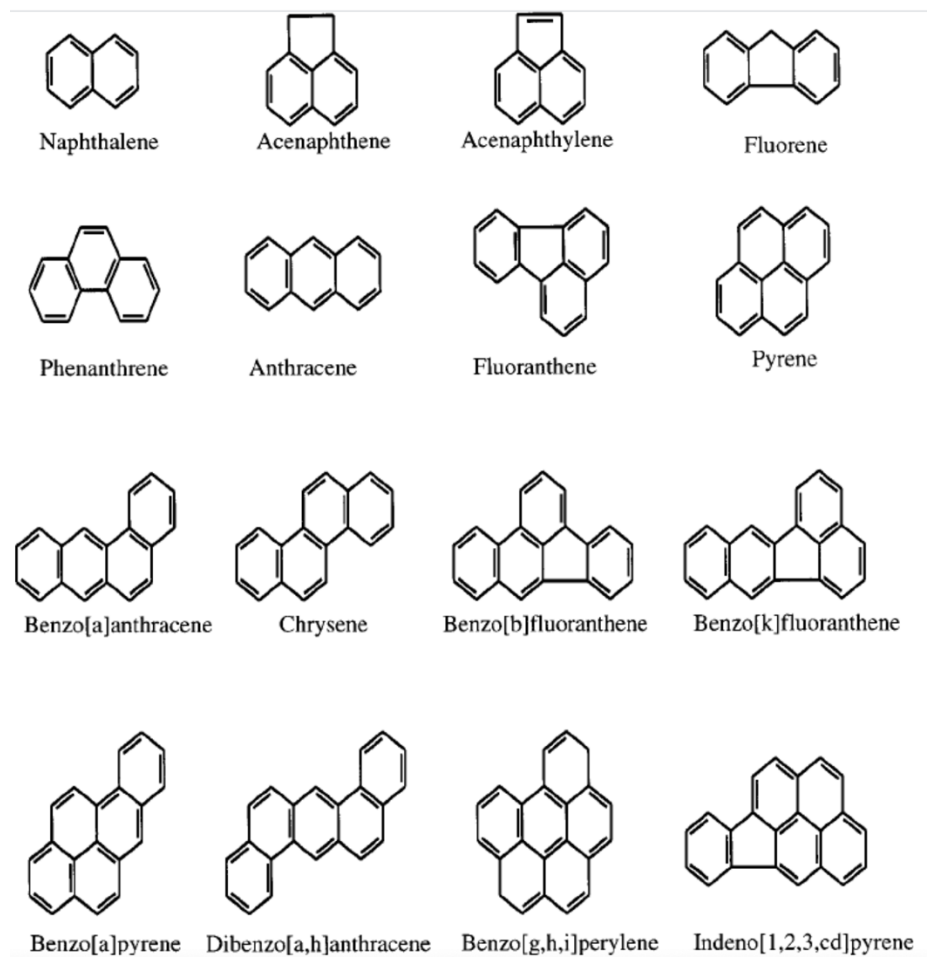


Figura 2. Estructuras y nomenclatura de los 16 PHA considerados como contaminantes prioritarios según la US-EPA (Koshlaf y Ball, 2017).

- c. Resinas: fracción del crudo constituidas por agregados de anillos aromáticos fusionados entre sí. La estructura es similar a los asfaltenos pero de menor peso molecular. Tiene numerosos grupos polares formados con nitrógeno, sulfuro y oxígeno (Figura 3).

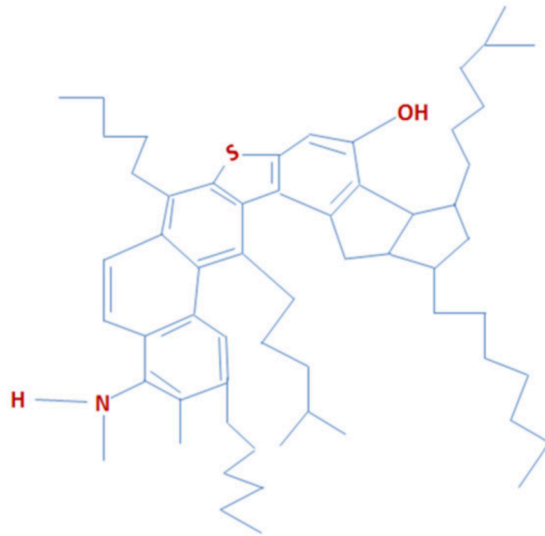


Figura 3. Estructura molecular de las resinas (Koshlaf y Ball, 2017)

- d. Asfaltenos: tienen abundantes grupos funcionales polares, son solubles en solventes aromáticos como el benceno, poseen alto peso molecular y están compuestos por una gran cantidad de anillos aromáticos. Su composición los hace resistentes a la biodegradación (Figura 4).

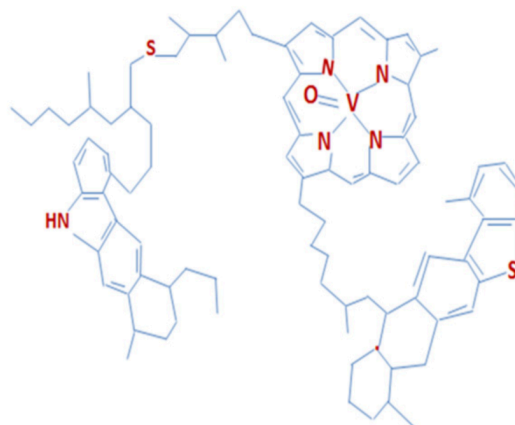


Figura 4. Estructura molecular de los asfaltenos (Koshlaf y Ball, 2017).

Las propiedades de los asfaltenos (fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres y porfirinas) y las resinas (piridinas, quinolinas, carbazoles, sulfóxidos y amidas) tienen un impacto en el comportamiento del petróleo crudo durante su producción y refinamiento. Constituyen cerca del 10% de la

composición del petróleo crudo, tienen estructuras complejas con muchos componentes polares y son considerados resistentes al ataque por parte de microorganismos (Koshlaf y Ball, 2017).

Cada fracción tiene un comportamiento químico diferente y afecta su biodegradabilidad. Las proporciones de cada fracción son dependientes de factores tales como la fuente del petróleo, historia geológica, edad, migración y alteración del crudo.

Algunos hidrocarburos de bajo peso molecular (metano, etano y etileno) son gases a temperatura y presión normal, mientras que otros son líquidos o sólidos, tienen baja polaridad, lo que les confiere baja solubilidad en agua, pero altamente solubles en solventes orgánicos (Walker y col., 2001).

Los hidrocarburos se pueden encontrar como cadenas lineales, ramificadas o anillos (Figura 1). Las propiedades de los hidrocarburos no aromáticos dependen de su peso molecular y del grado de saturación; de esta manera los alcanos son estables y no reactivos y tienen la fórmula general de C_nH_{2n+2} . Con $n < 4$ se presentan como gases, con $n=5-17$ son líquidos a presión y temperatura normal, y con $n \geq 18$ son sólidos. Los alquenos y alquinos son más reactivos debido a sus dobles y triples enlaces, y al igual que con los alcanos, los de cadenas cortas son gases y los de cadenas más largas son líquidos o sólidos.

Los hidrocarburos aromáticos pueden ser líquidos o sólidos, son más reactivos que los alcanos y son susceptibles de transformaciones químicas y bioquímicas. Los PAHs son anillos de benceno unidos entre sí, son encontrados en el petróleo crudo de depósitos naturales, estos también se generan a través de la combustión de materiales orgánicos como el carbón, petróleo y gasoil (Walker y col, 2001).

2.2 Contaminación con hidrocarburos del petróleo

Cuando el petróleo crudo es volcado al ambiente, sufre procesos de evaporación, dispersión, emulsificación, fotooxidación, biodegradación, entre otros. Algunos de estos procesos toman lugar bajo ciertas circunstancias, por ejemplo, la fotooxidación solo ocurre en lugares expuestos a la luz del sol. Algunos hidrocarburos son más resistentes a la biodegradación dependiendo del tipo de hidrocarburo, de su peso molecular y del número de anillos (en el caso de los PAH). El naftaleno es rápidamente biodegradado, mientras que los PAHs con cuatro o más anillos son degradados

más lentamente. Generalmente la biodegradación aeróbica es más rápida que la anaeróbica (Truskewycz y col., 2019).

Cerca del 80% del petróleo crudo se compone de hidrocarburos saturados y aromáticos. Algunos hidrocarburos aromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) y PHAs son tóxicos y carcinogénicos (Brzeszcz y Kaszycki, 2018), como se mencionó anteriormente.

El derrame de hidrocarburos a través de fugas de tanques subterráneos, vapores, desconexión de pozos de petróleo, entre otros, causan contaminación de la superficie del suelo, agua subterránea y el océano (Varjani, 2016).

Cuando sucede un derrame de petróleo en el suelo, se dan fenómenos como lo son el bloqueo en el suministro de agua, nutrientes, oxígeno y luz, que afecta la fertilidad del suelo, el crecimiento de las plantas y la germinación (Hentati y col, 2013). Cuando el petróleo se derrama en el agua, forma sobre la superficie una capa que bloquea el acceso a la luz solar, necesaria para la fotosíntesis y la producción de oxígeno por parte de organismos fotosintéticos. Por estas razones es considerado como altamente tóxico para el ecosistema y los seres vivos. Debido a la baja solubilidad de los hidrocarburos en el agua, la limitada adsorción, su compleja estructura molecular, y de que son reducidos por pocas enzimas, cuando hay un derrame de petróleo se producen cambios en los ecosistemas y alteran la diversidad de los microorganismos (Miranda y Restrepo, 2005).

El comportamiento que tiene el petróleo cuando hay un derrame depende de sus propiedades como la viscosidad y la cantidad vertida. En cuanto al suelo son importantes ciertas características como su composición y sus propiedades físicas (tamaño de la partícula, porosidad, contenido de materia orgánica, permeabilidad) y las propiedades físico-químicas del petróleo derramado (Koshlaf y Ball, 2017). La toxicidad depende del tipo de hidrocarburo. Si hay una alta concentración de componentes no saturados, aromáticos y ácidos, este hidrocarburo va a ser más tóxico para los microorganismos presentes en el suelo. La toxicidad sobre los sistemas biológicos en general, está dada por una alteración de la membrana plasmática debido a la liposolubilidad de los hidrocarburos. Las fracciones más livianas (por ejemplo, keroseno) produce una mayor alteración que las fracciones más pesadas (Alrumman y col., 2015).

En cuanto a los efectos secundarios de la contaminación con petróleo se han visto efectos directos e indirectos en diversas formas de vida, que van desde retraso en el crecimiento, anoxia,

hipotermia, ingestión de componentes tóxicos al momento de acicalarse, hasta anomalías en el desarrollo de animales marinos tales como, reducciones en el tamaño de la mandíbula, falta de pigmentación y cráneos sin fusionar (Van Meter y col., 2006) Los PHAs tienen potencial de inducir tumores malignos y afectan principalmente la piel y otros tejidos epiteliales, ya que tienen gran afinidad por el RNA y el DNA (Varjani, 2017).

La exposición prolongada a los hidrocarburos del petróleo puede inducir daños en el sistema nervioso central en humanos y animales que pueden traer consecuencias sobre el sistema respiratorio y el sistema endocrino desencadenando cáncer de pulmón, piel, vejiga, hígado y riñones (Gkorezis y col., 2016).

2.3 Biodegradación de los hidrocarburos del petróleo

La biodegradabilidad del petróleo depende en gran medida de la biodisponibilidad de sus componentes, es decir, a la fracción del hidrocarburo que está disponible para atravesar la membrana celular y que puede ser utilizada o transformada por los microorganismos, y a la adsorción que tenga el hidrocarburo sobre la matriz orgánica del suelo (Maletić y col., 2013). La fracción que se adsorbe a las partículas del suelo se considera como no tóxica y no está disponible para la biodegradación. La biodisponibilidad es limitada debido a la hidrofobicidad de los hidrocarburos. En el caso de las bacterias, estas acceden a los hidrocarburos secretando surfactantes (glicolípidos, fosfolípidos, lipopéptidos, ramnolípidos, etc.) que forman pequeñas gotas de hidrocarburo. Otro mecanismo utilizado por las bacterias es incrementar la hidrofobicidad de su membrana celular (Fuentes y col., 2014).

Los microorganismos capaces de metabolizar contaminantes orgánicos, los usan como fuente de energía o los convierten en subproductos no tóxicos (dióxido de carbono, agua y biomasa). Los diferentes aceptores de electrones tales como el oxígeno, nitrato, manganeso, hierro y sulfato pueden estar involucrados en la biotransformación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos. La adición de uno o dos grupos hidroxilos al hidrocarburo, es el primer paso en el catabolismo de estos. Durante la degradación de los hidrocarburos, la activación es llevada a cabo a través de enzimas tales como oxigenasas, dioxigenasas y monooxigenasas (Truskewycz y col., 2019).

Bacterias, levaduras y hongos miceliales degradadores de hidrocarburos están ampliamente distribuidos en ambientes acuáticos y en suelos. Las bacterias y las levaduras predominan en ecosistemas acuáticos, mientras que los hongos miceliales y las bacterias son los principales degradadores en los suelos (Watanabe, 2001). La degradación del petróleo crudo y sus productos

de refinación, por ser mezclas complejas, involucra no solo una especie de microorganismo si no consorcios compuesto por múltiples especies de eucariotas y procariotas (Salleh y col., 2003). Entre los microorganismos más comunes reconocidos como degradadores de hidrocarburos encontramos los géneros: *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Candida* y *Sporobolomyces* (Chandra y col., 2013).

Durante el proceso de biodegradación, los hidrocarburos son tomados por un grupo de microorganismos que los convierten en moléculas más sencillas. Estas nuevas moléculas pueden seguir siendo degradadas por el mismo microorganismo o por otros, en un proceso sintrópico (Gieg y col., 2014). Muchos de los genes involucrados en el catabolismo de hidrocarburos alifáticos están organizados en operones inducibles y en algunos casos constitutivos (Abbasian y col., 2015). Esto hace que los procesos de biodegradación llevados a cabo por un consorcio microbiano presenten múltiples, y a veces simultáneas, vías catabólicas, resultando en interacciones complejas.

En estudios realizados en ecosistemas marinos contaminados con hidrocarburos, se ha visto que cuando ocurren derrames de petróleo, que representa un ingreso significativo de C, se da una limitación de nutrientes, debido al desbalance en la proporción de carbono, nitrógeno y fósforo (relación C:N:P). Los microorganismos se adaptan a estas limitaciones usando sus propios genes o creando relaciones con otros microorganismos para disminuir el estrés producido por el hidrocarburo y degradando así cierta fracción de los hidrocarburos. Una parte importante en el proceso de biodegradación de los hidrocarburos es la resistencia de los microorganismos a altas concentraciones de este. Para ello, los microorganismos usan estrategias como aumento de la densidad de la membrana celular, producción de proteínas que reconstituyen a otras proteínas que se han desnaturalizado cuando se introducen solventes, o expresión de bombas de eflujo como lo hace, por ejemplo, *Pseudomonas putida* (Abbasian y col., 2015; Van Hamme y col., 2003).

2.4 Técnicas de remediación de suelos contaminados

Hay una variedad de técnicas para la remediación de suelos contaminados con petróleo, las cuales se clasifican en biológicas, químicas, térmicas y fisicoquímicas. Cada una tiene ventajas y desventajas, como así también diferentes tiempos de duración y eficiencia. Estas técnicas se encuentran resumidas en la Tabla 1 (Lim y col., 2016).

Tabla 1. Resumen de técnicas disponibles para remediación de suelos contaminados (Lim y col, 2016)

Clasificación	Técnica	Ventajas	Limitaciones	Eficiencia (%)	Duración
Biológica	Biorremediación	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo costo • Bajo impacto ambiental • Alto potencial para tratamientos <i>in situ</i> • No requiere tratamiento de residuos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Larga duración del tratamiento • Resultados inconsistentes y altamente dependientes del sitio contaminado • Limitado a contaminantes biodegradables. 	50-90%	Varios meses/años
	Fitorremediación	<ul style="list-style-type: none"> • Estéticamente agradable y de bajo costo operativo • Ayudan a estabilizar el suelo lo que puede evitar la erosión • Remedia grandes áreas de contaminación 	<ul style="list-style-type: none"> • Lleva mucho tiempo • Difícil de implementar una planta específica para cada derrame de petróleo • Depende de factores ambientales • Tolera bajas concentraciones de toxinas. 	50-90%	Varios meses/años
Química	Oxidación química	<ul style="list-style-type: none"> • Alta eficiencia y bajos costos operacionales • Fácil de realizar • Formación de subproductos amigables con el medio ambiente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitado por la permeabilidad del suelo, • Dependiente del pH • Destruye microflora autóctona. 	>80%	Hasta 72 horas
	Remediación electrocinética	<ul style="list-style-type: none"> • Distribución de flujo uniforme • control del movimiento • Bajo costo y bajo consumo de energía. 	<ul style="list-style-type: none"> • Depende de la desorción del contaminante • No es amigable con el medio ambiente • Consume mucho tiempo • Afecta microorganismos del suelo. 	40-70%	14-45 días
Térmica	Incineración, desorción térmica, calentamiento por microondas.	<ul style="list-style-type: none"> • Alta eficiencia, rápida • Capaz de tratar grandes volúmenes de suelo contaminado. 	<ul style="list-style-type: none"> • Altos costos • Formación de gases con efecto invernadero • Afectado por la humedad. 	>95%	Segundos a 2 horas
Fisicoquímico	Extracción por solvente	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil de implementar • Alta eficiencia y rapidez 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto costo • Consume gran cantidad de solvente • No es amigable con el medio ambiente. 	60-98%	Varias horas-10 meses

	Extracción por vapor	<ul style="list-style-type: none"> • Alta eficiencia con grandes cantidades de elementos volátiles • Rápido y de bajo costo • Aumenta el crecimiento de microorganismos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Poco efectivo cuando hay pocos elementos volátiles y suelos con baja permeabilidad al aire. 	65-95%	Varios días a meses
	Flotación	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil aplicación • Rápido y de bajo costo operacional 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere grandes cantidades de agua • No se pueden tratar suelos con contaminantes que no floten. 	65-97%	Varias horas
	Sonicación	<ul style="list-style-type: none"> • Amigable con el medio ambiente • Consume baja energía • No se adicionan químicos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto costo de equipamiento • Limitado a pequeñas áreas de tratamiento. 	20-100%	Varios segundos-45 min

2.4.1 Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

La biorremediación utiliza microorganismos (bacterias y hongos) que poseen capacidades metabólicas aptas para eliminar o degradar contaminantes ambientales en compuestos simples tales como CO₂, CH₄, H₂O, minerales y biomasa. La biorremediación se puede hacer estimulando microorganismos propios del suelo o introduciendo microorganismos degradadores ya conocidos (Salleh y col., 2003). Las vías metabólicas, los genes involucrados y los mecanismos de la degradación de los hidrocarburos ya se encuentran ampliamente descritas (Varjani y col., 2015, 2017; Van Hamme y col., 2003, Salleh y col., 2003). En lugares no contaminados con hidrocarburos, se puede encontrar hasta un 0,1% de microorganismos degradadores, y este número se puede incrementar al 10 % en ambientes contaminados pero con una diversidad menor (Varjani, 2017). Estos microorganismos nativos constituyen una herramienta que puede ser utilizada para disminuir la concentración de los hidrocarburos en los suelos afectados.

La eficiencia de remoción de contaminantes mostrada por las técnicas de biorremediación se ve afectada por factores tales como el tipo de contaminante y su concentración, la disponibilidad de nutrientes y oxígeno, el pH, características físicas y químicas del suelo, historial de contaminaciones, entre otras. Además de considerar los factores antes mencionados, la evaluación de la capacidad degradadora de la comunidad microbiana presente en el suelo contaminado es

indispensable para el diseño racional de una estrategia de biorremediación efectiva (Margesin y Schinner, 2001; Salleh y col., 2003).

Existen diferentes métodos y/o estrategias de biorremediación, que se describen en la Tabla 2 (Koshlaf y Ball, 2017).

Tabla 2. Principales características de las técnicas de biorremediación utilizadas en suelos contaminados con hidrocarburos (Koshlaf y Ball, 2017).

Método de biorremediación	Principales características	Ventajas	Limitaciones
1. Atenuación natural	Utiliza la microbiota propia del suelo bajo condiciones naturales	Buena relación costo/eficiencia	Requiere observación a largo plazo. No siempre es efectivo. No remueve la totalidad del contaminante
2. Bioaumentación	Adición de microorganismos degradadores de hidrocarburos.	Utiliza gran biomasa de microorganismos degradadores de hidrocarburos.	Requiere observación a largo plazo. No siempre es efectivo. Pobre adaptación de los microorganismos al sitio contaminado. Pueden ser inhibidos por microorganismos nativos o el mismo contaminante
Cepa aislada	Cataliza la degradación de moléculas simples o mezclas.		
Consorcio microbiano	Cataliza la degradación de mezcla de contaminantes complejos		
3. Bioestimulación	Manejo de factores ambientales (adición de nutrientes).	Más eficiente que la atenuación natural.	No siempre efectivo, se debe determinar la concentración del C:N:P y biodisponibilidad del contaminante.
Fertilizantes	Restauración del balance de nutrientes, optimización de la proporción de C:N:P		
Biosurfactantes	Estimulación de la biodisponibilidad del contaminante		
4. Fitorremediación	Aplicación de plantas y sus microorganismos asociados	Los microorganismos degradadores de hidrocarburos están en las raíces de las plantas.	Los contaminantes son tóxicos para las plantas.

Según como se apliquen, las tecnologías de biorremediación se clasifican en *in situ* y *ex situ*, y una variante conocida como *on-site*. *Ex situ* son las técnicas en las que se hace una remoción y traslado del material contaminado a otro sitio para realizar el tratamiento, mientras que en las técnicas *in situ* los tratamientos son realizados en el lugar en que ocurre la contaminación, sin remover el

material de su ubicación original (Boopathy, 2000). Los métodos *on-site* implican remover el material contaminado para su tratamiento pero realizando el mismo en el lugar, sin trasladarlo.

Las técnicas de biorremediación *in situ* tienen la ventaja de remediar el suelo sin la necesidad de excavación. Se utiliza para un amplio rango de contaminantes orgánicos, principalmente hidrocarburos, y es menos costoso que las técnicas físicas o químicas. Por otro lado, su eficiencia y homogeneidad son menores que para los tratamientos *on-site* y *ex situ* (Balba y col., 1998).

2.4.1.1 Atenuación natural

Esta técnica utiliza la microbiota propia del suelo, que tienen la capacidad de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono y energía, y de esta forma degradar y/o disminuir su concentración en el medio ambiente. Cuando ocurre la contaminación, la comunidad microbiana responde incrementando la capacidad de degradar el hidrocarburo por selección de aquellos capaces de metabolizar esos compuestos. Por otro lado, el número otros microorganismos no degradadores disminuye, reduciendo drásticamente la diversidad microbiana. Es común que ante esta situación ocurra una limitación en las tasas de degradación debido a un desbalance en la disponibilidad de nutrientes (Koshlaf y Ball, 2017), fundamentalmente N y P.

2.4.1.2 Bioaumentación

Este método puede ser aplicado en suelos que presentan una escasa microbiota degradadora de hidrocarburos. Consiste en incrementar la capacidad degradadora de la comunidad microbiana existente por agregado de cepas, consorcios, o microorganismos genéticamente modificados con la capacidad de degradar hidrocarburos. Estos inóculos deben ser introducidos en un suelo contaminado en una cantidad adecuada para que sean efectivos. Estos microorganismos son seleccionados de acuerdo con sus capacidades metabólicas para degradar hidrocarburos y/o contribuir con la solubilización de los mismos. Se utilizan preferencialmente microorganismos autóctonos previamente aislados. Estos presentan la ventaja de estar parcialmente adaptados al contexto donde serán introducidos. También pueden utilizarse microorganismos aislados de otro sitio, con un riesgo alto de que no se adapten al suelo y por ende no se logre el incremento deseado en la actividad biodegradadora (Lim y col., 2016).

Algunos hidrocarburos pueden ser metabolizados completamente por una cepa en particular. En otros casos es necesario la intervención de una múltiples microorganismos o consorcios microbianos compuesto por el miembros del mismo género o diferentes géneros (Varjani y col.,

2013). En el caso que el contaminante sea una mezcla compleja o cuando existen compuestos muy recalcitrantes y/o una baja disponibilidad de los hidrocarburos, es posible que no se logre una biodegradación significativa de los contaminantes. En esos casos, el uso de consorcios que tengan microorganismos con diversas formas de metabolizar los hidrocarburos puede ser una alternativa viable que mejore la remoción del contaminante, dado que un consorcio puede presentar miembros que participen en la biodegradación de forma directa (ataque directo al contaminante) e indirecta (por medio de la producción de micronutrientes o biosurfactantes) (Chandra y col., 2013, Zawierucha y Malina, 2011)

Los compuestos más simples dentro de los hidrocarburos son metabolizados por una amplia variedad de géneros bacterianos, mientras que los compuestos más complejos (como los PAHs, resinas y asfaltenos) son metabolizados por un número más reducido de bacterias (Varjani, 2017).

Para el diseño de una estrategia de bioaumentación es necesario decidir si: (1) se introduce una cepa o consorcio ya conocido, (2) re-inocular consorcios de bacterias autóctonas previamente aisladas del suelo contaminado, (3) usar consorcios de microorganismos aislados de otros lugares contaminados con hidrocarburos (Gkorezis y col., 2016).

2.4.1.3 Bioestimulación

La bioestimulación es una estrategia simple y por lo tanto factible de ser aplicada en diferentes contextos. Con la bioestimulación se mejoran factores ambientales, tales como humedad, temperatura y nutrientes, provocando un aumento en la actividad de los microorganismos autóctonos presentes en el suelo a tratar, acelerando las tasas de biodegradación natural de hidrocarburos (Zawierucha y Malina, 2011).

El primer paso en la biodegradación aeróbica de hidrocarburos involucra, en general, oxigenasas, de aquí que sea necesario aportar oxígeno en el proceso (Atlas y Bartha, 1992.) En situaciones donde el oxígeno es un factor limitante se suministra oxígeno por medio de aireación forzada, mezclado o por métodos químicos (utilizando compuestos que liberan oxígeno tales como el KMnO_4 , H_2O_2 o el O_3). Estos suministran el oxígeno como aceptor terminal de electrones favoreciendo el crecimiento microbiano y las tasas de biodegradación (Gkorezis y col., 2016).

Cuando ocurre un derrame de petróleo se incrementa la cantidad de carbono disponible resultando en la disminución relativa de otros elementos esenciales en el suelo para el crecimiento

microbiano, tales como, nitrógeno y fósforo. Con esta técnica se adicionan nutrientes y aceptores de electrones (fósforo, nitrógeno y oxígeno); de esta forma se estimula la microbiota autóctona del suelo que ya está habituada al contaminante. Para que sea efectiva, se debe en principio evaluar el lugar, las condiciones ecológicas y la comunidad microbiana presente, con el fin de elegir la técnica de biorremediación adecuada (Koshlaf y Ball, 2017).

Cuando se introducen nutrientes en el suelo, se busca mejorar la relación de carbono:nitrógeno:fósforo (C:N:P) y corregir el desbalance provocado por el ingreso masivo de C. La relación recomendada y de referencia para aumentar la remoción de hidrocarburos es de 100:10:1, y se obtienen mejores resultados cuando se utilizan sales de sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) y fosfato disódico (Na₂HPO₄) para lograr esta proporción. La forma en que se suministran los nutrientes es importante. Por ejemplo, cuando se utilizan fertilizantes comerciales/agronómicos puede no tener buenos resultados, por ejemplo, los que contienen sales de amonio y nitrato aumentan la concentración de sales en el suelo inhibiendo la actividad microbiana, así como un aumento en la acidez del suelo que disminuye la población microbiana degradadora (Zawierucha y Malina, 2011).

Es importante determinar el potencial de la técnica de bioestimulación aplicando estudios en laboratorio que demuestren la presencia de microorganismos degradadores y la biodegradación del hidrocarburo bajo condiciones controladas, con el fin de identificar factores limitantes. Sin embargo, estos resultados son difíciles de reproducir en el medio ambiente, debido a que los microorganismos se encuentran en condiciones ambientales no controladas (Balba y col.,1998).

2.4.1.4 Fitorremediación

La fitorremediación refiere al uso de plantas y sus microorganismos asociados para extraer, degradar y eliminar componentes tóxicos orgánicos e inorgánicos, entre ellos los hidrocarburos del petróleo, en suelos, agua y aire. Es una técnica amigable con el medio ambiente y de bajo costo. Los microorganismos asociados a las plantas incluyen las bacterias endófitas, filosféricas y rizosféricas que se pueden encontrar como patógenos o viviendo dentro de las plantas de forma simbiótica. En la rizosfera la actividad microbiana es de 10-1000 veces más alta que en el suelo circundante, de aquí la importancia y el uso de las plantas en el proceso de biorremediación (Gkorezis y col., 2016).

Las plantas toman los contaminantes a través de las raíces y son llevados a diferentes partes de la misma, una vez ahí ocurren cambios biofísicos y bioquímicos y transformaciones por medio de enzimas (Srivastava y col., 2019)

2.5 Factores que influyen en la biorremediación de suelos

La biodegradación de hidrocarburos está condicionada por factores biológicos y ambientales que varían en cada suelo. La susceptibilidad de los hidrocarburos de ser degradados está dada por: las propiedades de los microorganismos, factores ambientales y propiedades fisicoquímicas del hidrocarburo (Figura 5) (Gkorezis y col., 2016). Entre los parámetros más importantes está la naturaleza y concentración del contaminante, tipo de suelo y la presencia de microorganismos degradadores. Las condiciones ambientales, tales como, el pH del suelo, disponibilidad de oxígeno y nutrientes son factores que limitan o favorecen la biodegradación del contaminante. Una limitada biodisponibilidad de los hidrocarburos a los microorganismos puede limitar la tasa de degradación, de aquí que la interacción entre los microorganismos, el suelo y el contaminante es fundamental para el proceso. Los hidrocarburos se unen a la fracción orgánica del suelo disminuyendo su disponibilidad para los microorganismos, de esta manera, el porcentaje de esta fracción impacta en la tasa de degradación. Durante los primeros días después del derrame, la degradación del petróleo es más alta debido a que hay más disponibilidad del contaminante. Tiempo después hay secuestro de los hidrocarburos (unión a la materia orgánica, penetración en poros), baja biodisponibilidad y ocurre una reducción en la degradación del contaminante (Koshlaf y Ball, 2017).

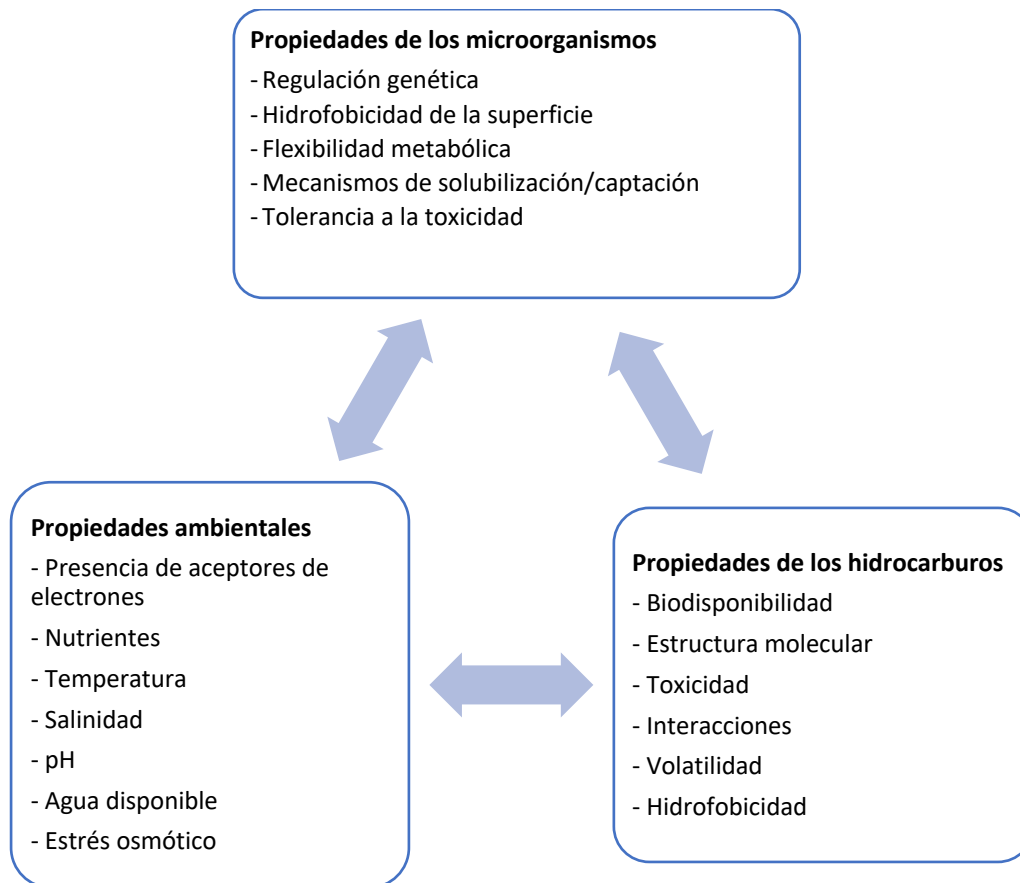


Figura 5. Principales factores que afectan la biodegradación de los hidrocarburos (Gkorezis y col., 2016).

2.6 Metabolismo de los hidrocarburos

Los hidrocarburos pueden ser metabolizados por una cepa o por un consorcio de microorganismos de iguales o diferentes géneros, de manera sintrópica. Sin embargo, se ha demostrado que los consorcios son más eficaces que cepas individuales (Deppe y col., 2005; Varjani y Upasani, 2013), así como, que los alcanos son preferidos por los microorganismos sobre los PAHs al momento de la degradación (Atlas y Bartha, 1992). Las enzimas degradadoras de hidrocarburos pueden tener localización cromosomal o plasmídica. Estudios realizados en el género *Pseudomonas* han demostrado que estas enzimas se encuentran en plásmidos, mientras que en *Acinetobacter* es una enzima cromosomal (Salleh y col., 2003). Los componentes más simples de los hidrocarburos pueden ser degradados por una amplia variedad de microorganismos, pero los componentes complejos tales como, PAHs, resinas y asfaltenos, solo por algunos de ellos y, en general, de manera complementaria. Cuando los microorganismos se enfrentan a los hidrocarburos puede pasar que los degraden o que produzcan sustancias tales como, biosurfactantes, biopolímeros,

solventes, gases y ácidos, haciendo el contaminante más disponible para la biodegradación (Varjani, 2017).

Los microorganismos metabolizan hidrocarburos para obtener energía o producir biomasa. Existen tres posibles vías de degradación (Figura 6): (1) fototrófica, anoxigénica; (2) quimiotrófica, aeróbica; y (3) quimiotrófica, anaeróbica. Si bien se considera la degradación aeróbica es la más eficiente, existen microorganismos que lo son capaces de degradar hidrocarburos de manera anaeróbica. Ambas vías catabólicas presentan distintos tipos de reacciones de oxidación, reducción, hidroxilación y dehidrogenación de los hidrocarburos (Widdel y Rabus, 2001).

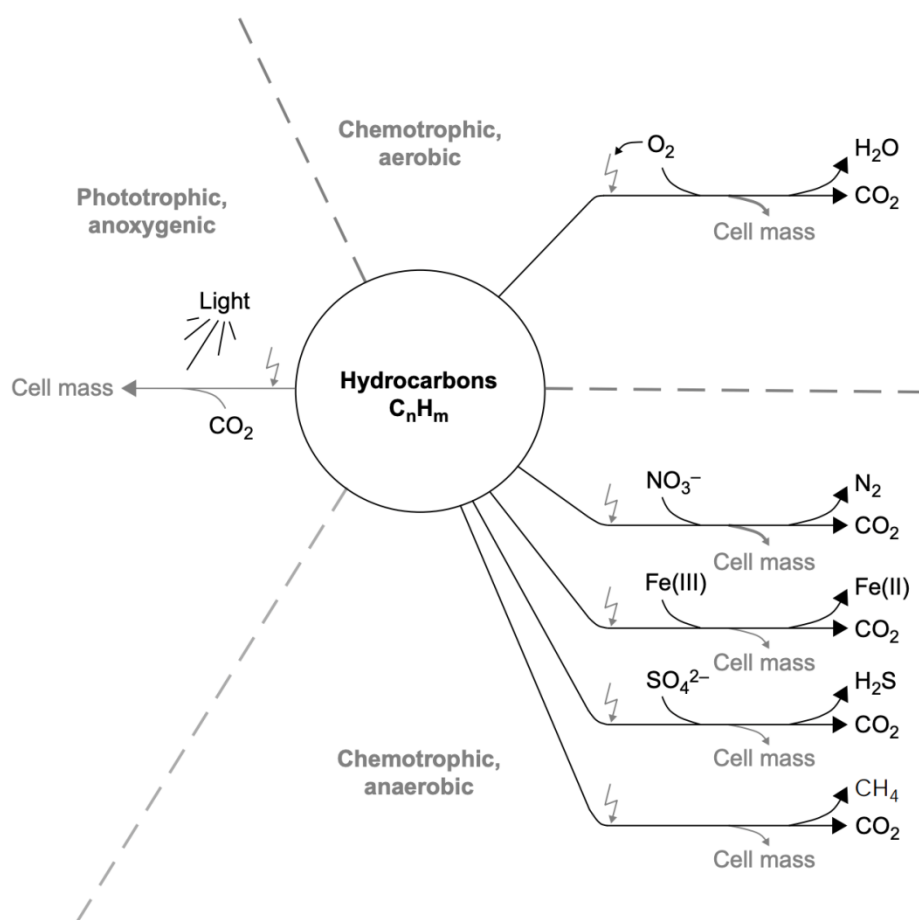


Figura 6. Posibles vías de utilización de los hidrocarburos por microorganismos. En las reacciones quimiotróficas una parte del hidrocarburo es utilizada en el catabolismo y otra parte para formar biomasa (Widdel y Rabus, 2001).

2.6.1 Degradación aeróbica

Los alcanos son mayormente degradados por oxidación mono-terminal. La oxidación del metilo terminal por monooxigenasas introducen un oxígeno molecular produciendo un alcohol primario. Este alcohol es oxidado a aldehído y luego a ácidos grasos. Después hay una β -oxidación que produce acetyl-CoA (Varjani, 2017, Abbasian y col., 2015) (Figura7).

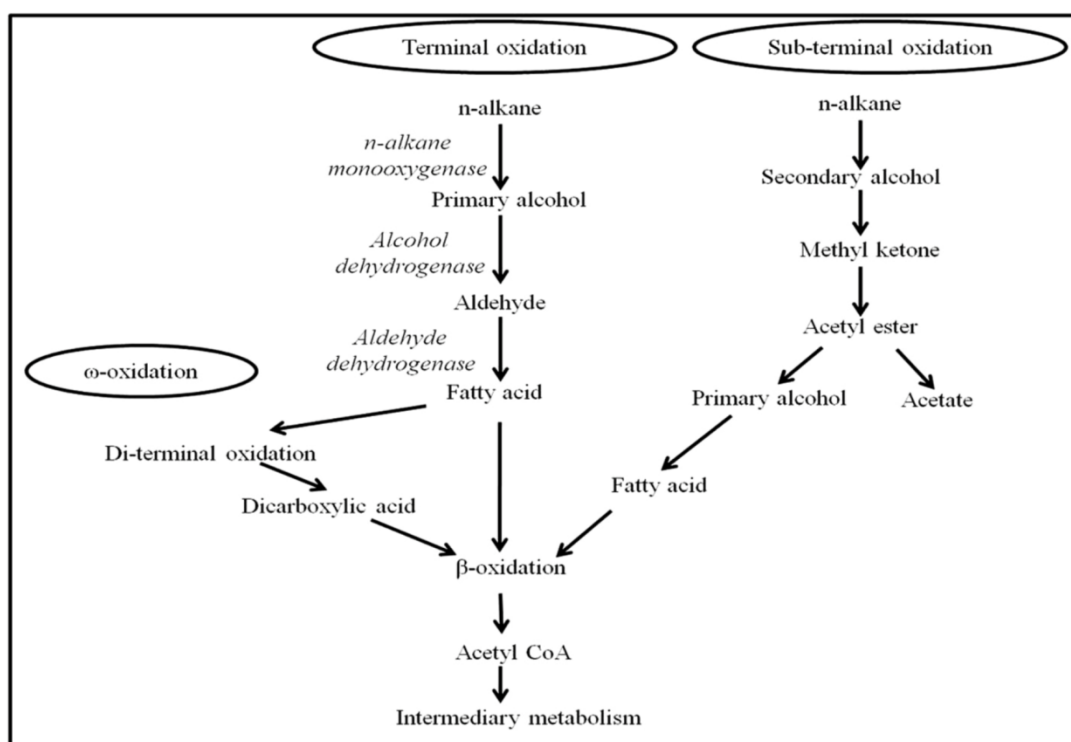


Figura 7. Tres posibles vías de degradación de los n-alcanos (Varjani S. J., 2017)

Otras dos vías de oxidación son di-terminal y sub-terminal. En la di-terminal hay una ω -oxidación (en el grupo metilo terminal) de los ácidos grasos para convertirse en ácido dicarboxílico y procesado por una β -oxidación. En la oxidación sub-terminal los alcanos son oxidados a un alcohol secundario, luego convertido a cetona y éster. Luego el éster es hidrolizado y se genera un alcohol y un ácido graso. Los hidrocarburos aromáticos son menos biodegradables que los saturados. Inicialmente hay una hidroxilación del anillo aromático, seguido de una oxidación, una apertura del anillo benceno y formación de intermediarios que entran en el ciclo de Krebs (Sakshi y col., 2020).

2.6.2 Degradación anaeróbica

Las vías metabólicas anaeróbicas utilizan como aceptores de electrones moléculas alternativas al O₂: el nitrato, nitrito, hierro ferroso, manganeso, iones sulfato, tiosulfato, óxido nitroso, iones metálicos y carbonato. Las bacterias anaeróbicas pueden degradar hidrocarburos por medio de cinco diferentes vías: (1) adición de fumarato a grupos metilos o metileno del hidrocarburo, (2) hidroxilación independiente del oxígeno de átomos de carbono terminales (para formar alcoholes secundarios o terciarios), (3) carboxilación de átomos de carbono de los anillos aromáticos, (4) hidratación de los dobles y triples enlaces de los alcanos y alquinos y (5) metanogénesis reversa (Abbasian y col., 2015).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y en particular la problemática regional que constituye la contaminación de suelos con hidrocarburos del petróleo para la región fueguina se plantea como objetivo de este trabajo el estudio de la factibilidad de aplicación de procesos biológicos y el desarrollo preliminar de los mismos para la recuperación de suelos de la Provincia de Tierra del Fuego contaminados con hidrocarburos utilizando microorganismos autóctonos como herramientas biológicas. La potencial recuperación de estos suelos redundará en un beneficio para el medioambiente, las personas que habitan y trabajan en esas zonas, las empresas involucradas en la explotación petrolera y las entidades gubernamentales encargadas de regular esa actividad y su impacto.

3.1 **Objetivo general**

Estudiar la factibilidad de aplicación de un proceso de biorremediación sobre suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo de la Provincia de Tierra del Fuego utilizando microorganismos autóctonos y desarrollarlo preliminarmente a escala laboratorio.

3.2 **Objetivos específicos**

- Analizar la factibilidad de utilizar sistemas biológicos para disminuir la concentración de hidrocarburos en el suelo problema.
- Estudiar la capacidad de biodegradación de hidrocarburos de la microbiota autóctona del suelo problema en sistemas experimentales optimizados (microcosmos) sometida a diferentes estrategias (bioestimulación).
- Realizar cultivos de enriquecimiento y seleccionar cepas o consorcios con capacidad degradadora de hidrocarburos del petróleo, y estudiar su capacidad para la degradación.
- Caracterizar la diversidad microbiológica de los suelos en cuestión mediante técnicas moleculares.

4.1 **Área de obtención del suelo**

Las muestras de suelo se obtuvieron de un establecimiento de proceso de petróleo crudo ubicado en Ushuaia, en el sur de la Provincia de Tierra del Fuego. Se tomaron muestras de zonas cercanas a los equipos de separación, en donde había goteos debido a caños corroídos. Esta contaminación persistente hace que el suelo afectado presente una contaminación crónica que aumenta la probabilidad de encontrar microorganismos degradadores y/o adaptados que toleren crecer en presencia del hidrocarburo (Ruberto y col., 2008).

El clima en Ushuaia, capital de Tierra del Fuego, varía dependiendo de la estación. Las muestras fueron tomadas en verano, en el mes de febrero donde las temperaturas pueden ir de 4,3°C a 13,2°C (<https://es.climate-data.org/america-del-sur/argentina/tierra-del-fuego/ushuaia-1924/>, 2020). Se recolectó la capa superficial del suelo, hasta 10 cm de profundidad aproximadamente. Las muestras tomadas se dispusieron en frascos de plástico y se almacenaron en heladera (a una temperatura entre 2 y 8°C). Estos suelos, previo al inicio de los análisis, fueron tamizados para retirar los componentes gruesos como piedras, en una malla de acero inoxidable (N°10) con un diámetro de poro de 2 mm, y homogeneizados utilizando una pala de jardinería sobre una bandeja para así obtener un suelo uniforme en todas sus características.

Con el objeto de caracterizar ambos suelos, se realizaron los siguientes análisis: mediciones de humedad, pH, hidrocarburos totales de petróleo (HTP), actividad biológica total (ABT), recuento de bacterias aerobias totales (BAT) y recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH).

4.2 Caracterización del suelo

4.2.1 Humedad del suelo

El agua actúa como solvente y portador de nutrientes, ioniza macro y micronutrientes y permite que la materia orgánica sea biodegradada. El método utilizado para determinar la humedad fue el gravimétrico. Éste se calculó por la diferencia de peso entre una misma muestra antes y después de haberse secado a una temperatura de 80°C en estufa hasta obtener un peso constante (Instituto Mexicano del Petróleo, 2006).

El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

1. Se pesó 1 g de suelo sobre papel aluminio.
2. Este suelo se dejó en estufa a 80°C por 24 horas.
3. Se sacó la muestra de la estufa y se colocó en desecador hasta que se enfrió.
4. Se pesó de nuevo la muestra.
5. Se calculó el porcentaje de humedad en el suelo por la diferencia de pesos:

$$\frac{Peso_{inicial} - Peso_{final}}{Peso_{inicial}} \times 100 = \% \text{ humedad}$$

4.2.2 pH del suelo

El pH es una propiedad química del suelo, importante para el desarrollo de microorganismos y plantas. Está relacionada con la concentración de iones hidrógenos activos (H^+) que se dan en la interfase líquida del suelo, por la interacción de los componentes sólidos y líquidos. El valor de pH es el logaritmo del recíproco de la concentración de iones hidrógeno, que se expresa por números positivos del 0 al 14 (Instituto Mexicano del Petróleo, 2006).

El pH del suelo se determinó por el método potenciométrico. Este método mide el potencial de un electrodo sensible a los iones H^+ presentes en una solución problema.

El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

1. Se pesó 1 g de suelo en un vaso de precipitado de 25 mL.
2. Se agregaron 10 mL de agua destilada.
3. Se agitó y se dejó reposar por 10 minutos.
4. Se ajustó el potenciómetro con las soluciones amortiguadoras.

5. Pasados los 10 minutos se midió el pH con el potenciómetro.

Los criterios de evaluación de un suelo con respecto a su pH que se siguieron se muestran en la Tabla 3 (Instituto Mexicano del Petróleo, 2006).

Tabla 3. Criterios de evaluación del suelo según su pH.

Categoría	Valor de pH
Fuertemente ácido	< 5,0
Moderadamente ácido	5.1-6.5
Neutro	6.6-7.3
Medianamente alcalino	7.4-8.5
Fuertemente alcalino	8.5

4.2.3 Hidrocarburos totales de petróleo (HTP)

El análisis de los HTP fue realizado por espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), por un método basado en la norma EPA 418.1(1986). Este método mide la vibración (estiramientos y doblamientos) que ocurre cuando una molécula absorbe energía (calor) en la región del infrarrojo (IR) del espectro electromagnético. Grupos funcionales y tipos de uniones tienen diferentes frecuencias de absorción e intensidades en el IR. Para el caso de los HTP, se mide la absorción en el rango de longitud de onda de 3200 a 2700 cm^{-1} . La cuantificación se realiza con una curva de calibración hecha con una mezcla de hidrocarburos de referencia (Instituto Mexicano del Petróleo, 2006), la cual expresa la cantidad de hidrocarburos totales del petróleo en ppm. Posteriormente esta medida se refiere a una cantidad conocida de suelo para expresarla en mg HTP/kg suelo.

Previo a su cuantificación por FTIR se hicieron extracciones de dichos hidrocarburos a partir de medios líquidos y a partir de suelo. Para cada extracción se siguió una metodología, como se describe a continuación.

Extracción a partir de medio líquido, según el método EPA 418.1 (1986) modificado:

1. Se tomaron 10 mL de la suspensión y se le adicionaron 30 mL de percloroetileno (C_2Cl_4) como solvente.
2. La mezcla se puso en ampolla de decantación, y se agitó vigorosamente durante 5 minutos.

3. Se dejaron separar las fases en la ampolla y se recogió la parte inferior que correspondió a la fase del solvente conteniendo los hidrocarburos extraídos.
4. El procedimiento se repitió otras 2 veces reservando siempre la fase inferior (volumen final de 90 mL) y se recogió en frascos de vidrio color ámbar.
5. Se adicionó sulfato de sodio y sílica gel para deshidratar y eliminar compuestos polares respectivamente.
6. Se filtró y guardó a -20°C hasta su medición.

Extracción a partir de suelo, se utilizó el método según (Martínez Álvarez y col., 2017) con ligeras modificaciones:

1. 1g de suelo + 5 mL de percloroetileno en un erlenmeyer (se hizo la extracción 3 veces por cada gramo de suelo, volumen final: 15 mL)
2. Se adicionó una punta de espátula de sulfato de sodio y sílica gel.
3. Se agitó el erlenmeyer por 3 horas a 20°C
4. Se centrifugó por 15 min a 7600g
5. Se filtró y se guardó en frascos de vidrio color ámbar, a -20°C hasta su medición.

4.2.4 Evaluación del número de bacterias aerobias totales (BAT) y bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH).

Los recuentos de BAT y BDH se llevaron a cabo haciendo diluciones seriadas de los suelos a analizar, que luego fueron sembradas en placas conteniendo medios de cultivo.

El recuento de las BAT se realizó utilizando el medio de cultivo R2A (Laboratorios Britania S.A., Argentina). Es un medio oligotrófico que permite un crecimiento moderado de una variedad grande de microorganismos permitiendo así el desarrollo de aquellos con alta y baja velocidad específica de crecimiento. Se emplea para aislar bacterias ambientales. Para el recuento de BDH se utilizó agar gasoil (AGO). Este medio se preparó a partir de un medio salino basal (MSB) (composición en g/L: 4.0 g NH_4NO_3 , 0.01 g EDTA, 0.1 g extracto de levadura, 0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g MnSO_4 , 0.01 g ZnCl_2 , 0.01 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g CuSO_4 , 1.8 g KH_2PO_4 , 7.9 g Na_2HPO_4 , pH=7.5), al que se le adiciona agar al 1,6% y gasoil al 1% como única fuente de carbono, obteniéndose de este modo un medio selectivo para bacterias que toleren o utilicen el hidrocarburo para crecer.

Para realizar los recuentos se tomó 1 g de suelo en 10mL de solución fisiológica más Tween al 0,1%, y a partir de esta dilución se hicieron diluciones seriadas en solución fisiológica estéril. De cada dilución se sembraron 0,1 mL en cada medio de cultivo (R2A y AGO). Las siembras se hicieron en superficie usando una espátula de Drigalsky, y posteriormente ambos medios se incubaron a 20°C por 10 días. Al cabo de este tiempo y en presencia de desarrollo microbiano se hicieron los recuentos y los cálculos de las unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias por gramo de suelo (Martínez Álvarez y col., 2017).

4.2.5 Actividad biológica total (ABT)

La actividad biológica total (ABT) fue evaluada con el método de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA). La fluoresceína diacetato (3'6'-diacetyl-fluorescein) está conjugada a dos radicales acetato, la cual es hidrolizada por enzimas libres o unidas a la membrana liberando fluorescencia. La medida de esta fluorescencia es directamente proporcional a la población microbiana presente, de aquí que sea usada como medida de la actividad microbiana total en un amplio rango de muestras, incluido el suelo (Adam y Duncan, 2001).

El procedimiento se siguió de acuerdo con Adam y Duncan (2001), en donde se suspendió en un tubo tipo Falcon, 1g de suelo en 15 mL de buffer fosfato más 0,2 mL de solución de FDA (1000 μg FDA mL^{-1}). A la par se armaron blancos con 1g de suelo más 15 mL de buffer fosfato, pero sin solución de FDA. Las muestras y blancos se pusieron en agitación a 100 rpm, 30°C por 20 minutos. Pasado este tiempo la reacción se detuvo con 15 mL de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v), se agitó de forma manual y se centrifugó a 2000 rpm por 3 minutos para separar las fases. Luego de centrifugar la fase acuosa fue separada y se midió su absorbancia por espectrofotometría a 490 nm.

Para cuantificar la fluoresceína se realizó una curva de calibración que relaciona los valores de absorbancia medidos a 490 nm con concentraciones conocidas de fluoresceína. Para ello, se preparó una solución stock de 2000 μg de fluoresceína mL^{-1} (0,2265 g fluoresceína en 100 mL buffer fosfato). A partir de este stock se preparó una solución de 20 μg de fluoresceína mL^{-1} (1 mL de la solución anterior en 100 mL de buffer fosfato). Con esta solución se prepararon los standards de la curva de calibración en un rango de 0 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluyendo siempre en buffer fosfato, a los cuales se les determinó la absorbancia a 490 nm mediante espectrofotometría.

Los datos obtenidos se graficaron y con el valor obtenido de la pendiente de esta recta se hicieron los cálculos para obtener la cantidad de μg de fluoresceína por gramo de suelo o mL de solución.

4.3 Ensayo de biodegradabilidad de hidrocarburos

Se realizó un ensayo *in vitro* con el fin de investigar el potencial biodegradador de la microflora autóctona frente a los hidrocarburos presentes en el suelo (protocolo presentado por Ruberto y col., 2009)

Este se llevó a cabo utilizando el suelo problema (contaminado con hidrocarburos del petróleo) y un control abiótico (suelo envenenado químicamente con cloruro de mercurio (HgCl_2)). Los sistemas se armaron por triplicado en Erlenmeyers suspendiendo 1 g de suelo en 50 mL de MSB, los cuales se incubaron en shaker durante 8 días a 25°C y 250 rpm. A los 0, 4 y 8 días se tomaron tres Erlenmeyer de cada suelo y se hicieron las determinaciones de la ABT, recuentos de BAT y BDH, mientras que al inicio y al final de ensayo (0 y 8 días) se midieron los HTP, con el fin de evaluar la evolución de los parámetros medidos en el transcurso de los días y comparar entre los dos suelos (contaminado y estéril). El esquema de trabajo se muestra en la Figura 8.

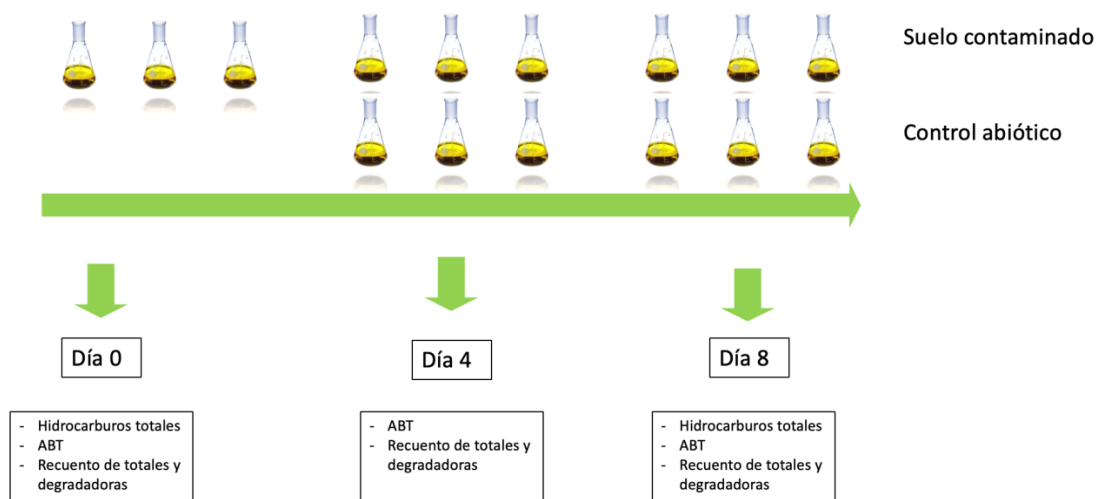


Figura 8. Esquema de trabajo del ensayo de biodegradabilidad *in vitro* de hidrocarburos.

4.4 Ensayo de bioestimulación de microorganismos autóctonos

Se utilizaron los diseños y procedimientos desarrollados por Meriniy col., (2007) y Ruberto y col., (2006).

Este ensayo se realizó en sistemas microcosmos durante 40 días manteniendo constante la temperatura (20°C), y la humedad (15%). Para efectuar la bioestimulación de los microorganismos presentes en el suelo se modificaron las concentraciones de nitrógeno y fósforo de acuerdo a la concentración inicial de carbono determinada por la cantidad de HTP presentes en el suelo, de manera de obtener relaciones iniciales de C:N:P de 100:10:1. De esta manera se evaluó la capacidad degradadora de los microorganismos autóctonos presentes en este suelo contaminado bajo condiciones favorables.

Para el armado de los sistemas microcosmos se utilizaron frascos de boca ancha en los cuales se depositaron 80g de suelo contaminado previamente tamizado y homogeneizado. La composición de los distintos microcosmos utilizados en el experimento se detalla en la Tabla 4 y se muestra en la Figura 9.

Tabla 4. Composición de los microcosmos empleados en el ensayo de bioestimulación de microcosmos autóctonos.

	Cantidad de microcosmos	Tratamiento	Objetivo
Control abiótico	1	Suelo contaminado envenenado por método químico mediante la adición de HgCl ₂ .	Evaluar la disipación de los hidrocarburos por métodos diferentes a la biodegradación como son la volatilización, fotooxidación o adsorción, ya que no contenía microorganismos viables.
Control de comunidad	3	Suelo contaminado, sin ninguna modificación.	Evaluar el potencial biodegradador de la microbiota presente en un suelo sin modificaciones.
Bioestimulado	3	Suelo contaminado adicionado con una solución de sales de nitrógeno y fósforo (KH ₂ PO ₄ y NH ₄ SO ₄).	Evaluar la degradación de hidrocarburos en condiciones de nutrientes favorables para los microorganismos presentes.



Figura 9. Armado de los sistemas microcosmos empleados en el ensayo de bioestimulación de microorganismos autóctonos.

En cada microcosmos bioestimulado se usó una solución de sales conteniendo 0,32 g de NH_4SO_4 y 0,03 g de KH_2PO_4 , con el objeto de alcanzar una relación de C:N:P de 100:10:1. Para calcular las cantidades de sales de nitrógeno y fósforo a adicionar se tuvo en cuenta la concentración inicial de HTP del suelo contaminado, el cual resultó para nuestro caso de 43200 mg HTP/Kg suelo.

La humedad fue determinada por gravimetría durante el transcurso del ensayo y se mantuvo en un valor del 15%. Para los microcosmos de comunidad y abiótico, se adicionó agua destilada estéril cuando fue necesario y en los bioestimulados la solución de sales, con el fin de mantener las condiciones de cada sistema.

A los 0, 10, 20, 30 y 40 días se realizaron muestreos de un sistema microcosmos representativo del triplicado elegido al azar con el fin de realizar recuentos de las BAT, BDH y medir la ABT. Este muestreo aleatorio se realizó con el objeto de evitar la drástica disminución de la cantidad de suelo en los sistemas microcosmos, dado que para llevar a cabo la totalidad de las determinaciones mencionadas se requiere un mínimo de 5 g de suelo por tiempo de muestreo. La cuantificación de los HTP se realizó al inicio y al final del ensayo (0 y 40 días). Estos parámetros medidos se compararon entre los distintos tratamientos y en el tiempo con el fin de evaluar la evolución de los mismos en cada sistema microcosmos.

4.5 Aislamiento y conservación de microorganismos degradadores de hidrocarburos

A partir de las placas de agar gasoil (AGO) utilizadas para los recuentos de las BDH en el ensayo de bioestimulación se aislaron colonias que parecían morfológicamente distintas. El crecimiento de estas colonias en AGO evidenciaba la capacidad de estos microorganismos de crecer a expensas de un hidrocarburo como el gasoil. Se tomaron como criterio de selección para su aislamiento la morfología de la colonia, el tipo de crecimiento, su coloración y su textura. Se utilizó una nomenclatura arbitraria utilizando letras y números para denominar a dichas cepas degradadoras de hidrocarburos.

Una vez seleccionadas y nombradas, estas colonias se aislaron en AGO, realizándose una siembra por agotamiento. Con el fin de observar si los aislamientos estaban puros, se hace un nuevo aislamiento de las colonias en AGO y en agar nutritivo al 50%. La utilización de agar nutritivo al 50% permite evidenciar la presencia y el crecimiento de otros microorganismos acompañantes ya que proporciona una cantidad suficiente de nutrientes sin ser restrictivo al

crecimiento de BDH únicamente, como es el caso del AGO. De esta manera se lograron aislar 11 colonias puras que se guardaron en crioviales conteniendo una solución de glicerol al 40% y se conservaron a -20°C en freezer, para su posterior caracterización microbiológica, bioquímica y molecular.

4.5.1 Caracterización microbiológica y bioquímica de los aislamientos microbianos degradadores de hidrocarburos.

Una vez obtenidos los aislamientos de microorganismos degradadores de hidrocarburos, éstos se caracterizaron inicialmente mediante una coloración de gram utilizando soluciones de cristal violeta, safranina, lugol y alcohol-acetona. Ésta coloración permite teñir diferencialmente a los microorganismos y clasificarlos preliminarmente como gram positivos y gramnegativos.

Posterior a la coloración de Gram se llevaron a cabo pruebas bioquímicas a los aislamientos bacterianos, que permitieron conocer algunas características metabólicas y lograr una aproximación al tipo de microorganismo aislado. Dentro de estas pruebas se evaluaron la utilización de glucosa, utilización de citrato, presencia de la enzima oxidasa y movilidad. Para ello se utilizaron medios de cultivo liofilizados, estos se prepararon según el fabricante y se dispusieron en tubos de ensayo. Los medios sólidos fueron inoculados con un ansa recta en profundidad y superficie, en el caso del caldo BHI se hizo una suspensión bacteriana, se incubaron por 24 horas a 25°C. La interpretación se realizó como se explica en el anexo de soluciones y medios de cultivo.

4.5.2 Identificación taxonómica de los aislamientos microbianos degradadores de hidrocarburos por biología molecular

Los aislamientos bacterianos se identificaron mediante la secuenciación parcial del gen ribosomal ARNr 16S y posterior comparación de su secuencia con secuencias homólogas de cepas tipo depositadas en bases de datos especializadas. El aislamiento fúngico se identificó con el mismo procedimiento, pero basado en la secuencia de la región D1/D2 del gen ribosomal ARNr 26S. El ADN genómico utilizado como templado para la amplificación de las secuencias se obtuvo a partir de biomasa de los aislamientos puros cultivados en placas conteniendo agar nutritivo al 50% e incubadas a 20°C durante 15 días.

Para la extracción del ADN genómico de los aislamientos bacterianos, se re suspendieron las células en 200µL de buffer TEG (Tris 10 mM, EDTA-Na₂ 1 mM, glucosa 50 mM, pH 8) y se adicionaron 5 µL de lisozima (300 mg/mL) y 5 µL de RNAsa (10 mg/mL) y se incubaron a 37°C durante 30 min. Luego se agregaron 5 µL de proteinasa K (20 mg/mL) y 15µL de SDS (10%) y se incubó a 50°C durante 30 minutos. Posteriormente, se purificó el ADN con un kit comercial (*Genomic DNA Purification Kit*TM, Fermentas). La concentración e integridad del ADN extraído se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRedTM, Biotium.

Posteriormente, se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento de ~1400 pb del gen del ARNr 16S usando como templado el ADN genómico extraído y los *primers* universales 27F (5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). El volumen total de la mezcla de reacción fue de 50 µL, conteniendo 1 µL de templado, 100 µM de cada dNTP, 0,3 µM de cada cebador, 1,5 mM de MgCl₂, 0,3 mg/mL de BSA y 1,5 U de Taq DNA polimerasa (Tabla 5). El programa de ciclado consistió en: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 seg, alineación a 55°C por 45 seg y extensión a 72°C por 1 min y 30 seg, con una extensión final a 72°C por 10 min. La calidad y concentración de los productos de PCR se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa 1% teñidos con GelRedTM. Los productos obtenidos se purificaron con un kit comercial (*Real Genomics HiYield PCR*, RBC) obteniéndose una concentración final de 30-40 ng/µL, los cuales se enviaron a secuenciar por el método de Sanger al servicio de secuenciación de MacroGen Inc., usando el *primer* 27F.

Tabla 5. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR del gen del ARNr 16S.

Reactivos	Volumen (µL)	Concentración final
Buffer 10x	5	1x
MgCl ₂ 25 mM	3	1,5 mM
dNTPs 1 mM	5	100 µM
Primer Fwd(10 µM)	1,5	0,3 µM
Primer Rev (10 µM)	1,5	0,3 µM
BSA 3 mg/mL (10x)	5	0,3 mg/mL
DNA (µL)	1	
Taq DNA polimerasa 5U/µL	0,3	1,5 U
Agua desionizada	Para un vol. final de 50 µL	

Para la extracción del ADN genómico del aislamiento del hongo micelial se agregó una punta de espátula de perlas de vidrio junto con el buffer TEG, se agitó en un vórtex (Genie 2™, MoBio) por 10 minutos y se siguió el mismo protocolo de extracción descrito anteriormente para los aislamientos bacterianos.

Se amplificó por PCR la región D1/D2 del gen ARNr 26S usando como templado el ADN genómico extraído y los *primers* NL-1F (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL-4R (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). El volumen total de la mezcla de reacción fue de 50 µL, conteniendo 2µL de templado, 100 µM de cada dNTP, 1µM de cada cebador, 1,5 mM de MgCl₂, 0,3 mg/mL de BSA y 2 U de Taq DNA polimerasa (Tabla 6). El programa de ciclado utilizado, la metodología de evaluación de calidad y concentración del ADN extraído, y la purificación y secuenciación del producto amplificado fueron iguales que los ya descritos para los aislamientos de bacterias. La secuenciación se realizó usando el *primer* NL-1.

Tabla 6. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de la región D1/D2 del gen del ARNr 26S.

Reactivos	Volumen (µL)	Concentración final
Buffer 10x	5	1x
MgCl ₂ 25 mM	1,5	1,5 mM
dNTPs 1 mM	5	100 µM
Primer Fwd(10µM)	5	1 µM
Primer Rev (10µM)	5	1 µM
BSA 3 mg/mL (10x)	5	0,3 mg/mL
DNA (µL)	2	
Taq DNA polimerasa 5U/µL	0,4	2 U
Agua desionizada	Para un vol. final de 50 µL	

Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit (<http://mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). El programa permitió, a partir del electroferograma, evaluar la calidad de las secuencias y determinar manualmente el inicio y el final de las secuencias a comparar. Las secuencias procesadas fueron comparadas *online* contra secuencias homólogas presentes en las bases de datos especializadas EzBioCloud (bacterias), FunCBS y UNITE (hongos), y NCBI (programa Megablast, bases de datos Nucleotide collection (nr/nt) y subset 16s ribosomal RNA, limitadas a secuencias de cepas microbianas tipo, con el fin de conocer la cepa

microbiana tipo más relacionada según el fragmento comparado de la secuencia del gen estudiado de cada aislamiento.

4.5.3 Evaluación de la capacidad degradadora de hidrocarburos de los aislamientos microbianos

Con el fin de determinar si los microorganismos aislados pueden usar otros hidrocarburos como fuente de carbono además del gasoil, se evaluó su capacidad de crecer en presencia de dodecano y hexadecano como única fuente de carbono. Para este ensayo se usó el 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) como indicador de crecimiento microbiano.

El DCPIP es un aceptor de electrones, que es azul en su forma oxidada e incoloro en su forma reducida. Durante la oxidación de los hidrocarburos los electrones son transferidos al DCPIP, evidenciándose la utilización de los hidrocarburos con el cambio de color del medio de un color azul a un tono más claro, de acuerdo al método descrito por Varjani y col, (2013), modificado.

Se preparó un inóculo con una densidad óptica (DO) de 0,5 determinado por espectrofotometría a 600 nm de cada microorganismo aislado en un tubo tipo Falcon de 50 mL de volumen con MSB. Se incubó a 20°C por 24 horas. Luego se diseñó el ensayo de acuerdo a lo descrito en la Tabla 7.

Tabla 7. Diseño experimental utilizado para evaluar la capacidad degradadora de hidrocarburos de los aislamientos microbianos.

TUBO	DCPIP (μ L)*	MEDIO SALINO BASAL (mL)	INÓCULO (μ L)	HIDROCARBURO (μ L) ⁺
CIS	500	7,5	-	-
CS	500	7,5	1000	-
CA	500	7,5	-	100
T-BDH	500	7,5	1000	100

CIS: Control de inóculo y sustrato (hidrocarburo) (por triplicado)

CS: Control de sustrato (hidrocarburo) (por triplicado)

CA: Control abiótico (por triplicado)

T-BDH: Test de cada microorganismo aislado con cada hidrocarburo individual (dodecano, hexadecano, gasoil) (por triplicado)

*La solución de DCPIP se preparó una concentración de 0,05% y se esterilizó filtrándola por membrana de 0,22 μ m.

⁺Los hidrocarburos se adicionaron a una concentración final del 1% (v/v) y se esterizaron filtrándolos por membrana de 0,22 μ m.

Este ensayo se llevó a cabo utilizando tubos de ensayo con tapa rosca estériles, los cuales se incubaron a 20°C por 30 días. Diariamente se hizo inspección visual y se agitaron los tubos para incorporar oxígeno a los cultivos. La utilización de los hidrocarburos se evidenció mediante la decoloración del DCPIP (de azul a incoloro) y se evaluó de manera cualitativa utilizando una escala de cruces (+, ++, +++) indicando el nivel de decoloración de menor a mayor.

4.6 Análisis estadístico

En el ensayo de biodegradabilidad de hidrocarburos los resultados presentados representan el promedio de tres unidades experimentales independientes. La variabilidad entre muestras es presentada como la desviación estándar (SD) del promedio. Para el caso del ensayo de bioestimulación de microorganismos autóctonos los resultados presentados corresponden a los datos obtenidos de una unidad experimental (microcosmo) representativa de tres unidades experimentales a cada tiempo de muestreo. La variabilidad de los resultados se presenta como el error típico (ET) a cada tiempo o desviación estándar (SD) de la determinación.

La significancia de los efectos causados por los distintos tratamientos aplicados al suelo fue determinada por el análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el programa de software de hojas de cálculo y paquetes estadísticos de Microsoft Excel 2019.

5 Resultados y discusión

5.1 Caracterización del suelo

Se realizó la caracterización del suelo midiendo los parámetros de humedad, pH, concentración de hidrocarburos, recuento de bacterias aerobias totales, recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos y actividad microbiana total.

Los resultados de la caracterización del suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Caracterización del suelo contaminado en términos de humedad, pH, bacterias aerobias totales (BAT), bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH), actividad biológica total (ABT) e hidrocarburos totales del petróleo (HTP). Todos los valores representan la media \pm desviación estándar (SD) de cada determinación.

Parámetro	Resultado
Humedad (%)	9,21% \pm 0,3
pH	8,30 \pm 0,15
HTP (mg TPH / Kg suelo)	43200 \pm 1113,5
BAT (UFC/g suelo)	2,82 \pm 0,57x 10 ⁸
BDH (UFC/g suelo)	7,6 \pm 12,1 x 10 ⁷
ABT (μ g fluoresceína/g suelo)	16,15 \pm 1,27

5.2 Ensayo de biodegradabilidad de hidrocarburos

La biodegradación es la capacidad de los microorganismos de transformar o mineralizar contaminantes orgánicos en sustancias menos dañinas o no peligrosas.

El suelo empleado en este estudio se consideró que tenía una contaminación crónica ya que recibió dosis pequeñas y frecuentes de hidrocarburos por goteo. Esto lleva a que la microbiota del mismo se encuentre adaptada a la presencia de este contaminante y tengan capacidad para degradar o tolerar la presencia del hidrocarburo. En este tipo de suelos generalmente se encuentran condiciones no favorables para los microorganismos como lo son la temperatura ambiental, baja cantidad de nutrientes y disponibilidad de oxígeno. La biodegradación del petróleo es influenciada por factores tales como nutrientes, oxígeno, pH, concentración y biodisponibilidad de los

contaminantes, y características físicas del suelo (Maletić y col, 2013), es por este motivo que es indispensable controlar estos factores para que la actividad de los microorganismos sea eficiente en un ensayo de biodegradabilidad *in vitro* de hidrocarburos.

El objetivo del ensayo de biodegradabilidad fue el de evaluar bajo condiciones favorables de temperatura, nutrientes y aireación, si la microbiota autóctona del suelo tenía la capacidad de tolerar, prosperar y/o biodegradar los hidrocarburos presentes. Además, permite descartar la presencia en el suelo a tratar de compuestos que inhiban la actividad biológica. Paralelamente se aplicó un control abiótico con la finalidad de evidenciar la pérdida abiótica de los hidrocarburos presentes, y de esta manera, poner de manifiesto la remoción biológica de los mismos (biorremediación).

Como se mencionó previamente, el ensayo de biodegradabilidad se llevó a cabo en Erlenmeyers conteniendo suelo contaminado y medio salino basal durante 8 días, en los que se hicieron muestreos al inicio, a los 4 y 8 días. En este ensayo se mantuvieron constantes las variables de temperatura (25°C) y aireación por agitación orbital (250 rpm).

Se partió de un suelo con una concentración inicial de hidrocarburos de 43200 mg HTP/Kg suelo. Durante los 8 días del ensayo, en el sistema conteniendo suelo contaminado sin agregado de HgCl₂, los recuentos de las BAT aumentaron a valores mayores a 1x10⁹ UFC/mL y los recuentos de las BDH aumentaron 4 log, alcanzando su pico máximo el día 8 (Figura 10), mientras que el control abiótico no tuvo desarrollo de BAT o BDH. Estos aumentos en los recuentos de bacterias del suelo contaminado fueron acompañados con incrementos en la ABT que partió de un valor de 5,02 µg fluoresceína/mL y finalizó con 18,01 µg fluoresceína/mL, mientras que el control abiótico finalizó el ensayo con 2,22 µg fluoresceína/mL (Figura 11).

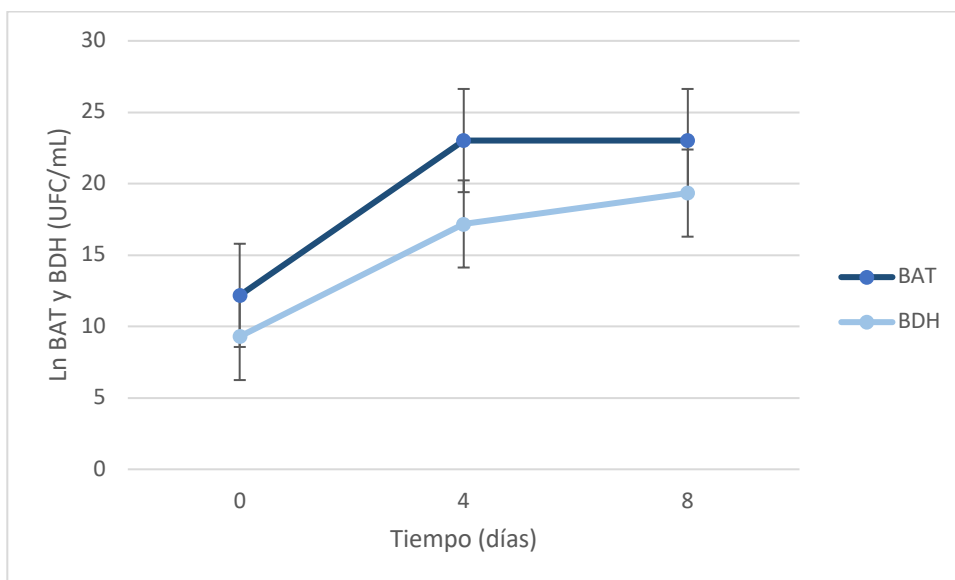


Figura 10. Recuento de BAT y BDH del suelo contaminado en el ensayo de biodegradabilidad de hidrocarburos. Todos los valores representan la media \pm desviación estándar (SD) de tres unidades experimentales independientes.

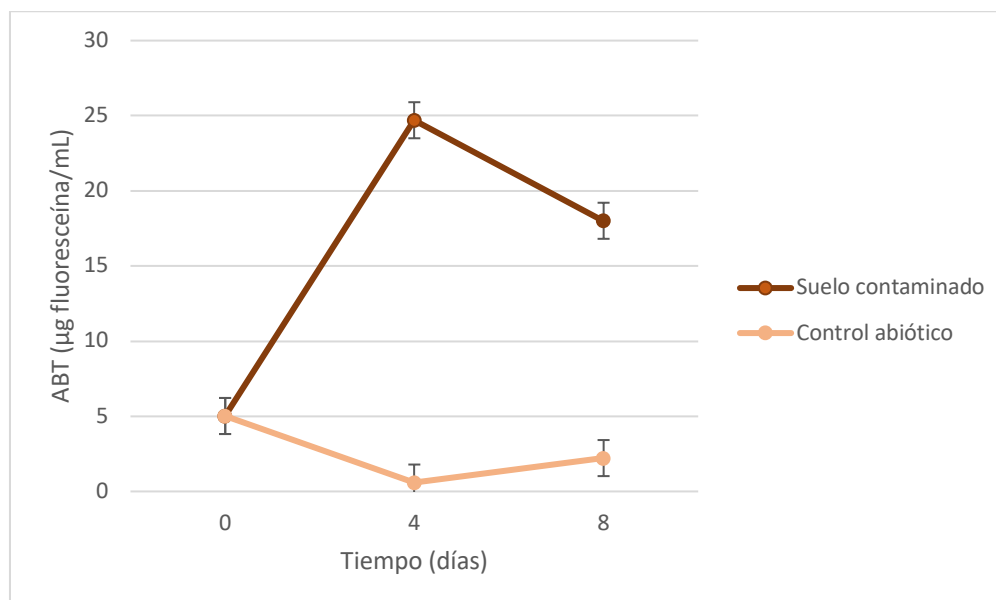


Figura 11. ABT determinada en el suelo contaminado y en el control abiótico durante el ensayo de biodegradabilidad de hidrocarburos. Todos los valores representan la media \pm desviación estándar (SD) de tres unidades experimentales independientes.

El valor de los HTP fue de 43200 mg/kg suelo al inicio del ensayo y de 25250 mg/kg suelo al final del ensayo, lo que indica una disminución del 41,5% con relación al valor inicial en los sistemas conteniendo suelo contaminado y MSB. Por otra parte, la concentración de HTP en el control abiótico al final del ensayo fue de 40670 mg/Kg suelo, mostrando una disminución del 5,9%. Esta disminución podría estar asociada a fenómenos de naturaleza abiótica, diferentes a los llevados a cabo por los microorganismos (biodegradación) (Figura 12).

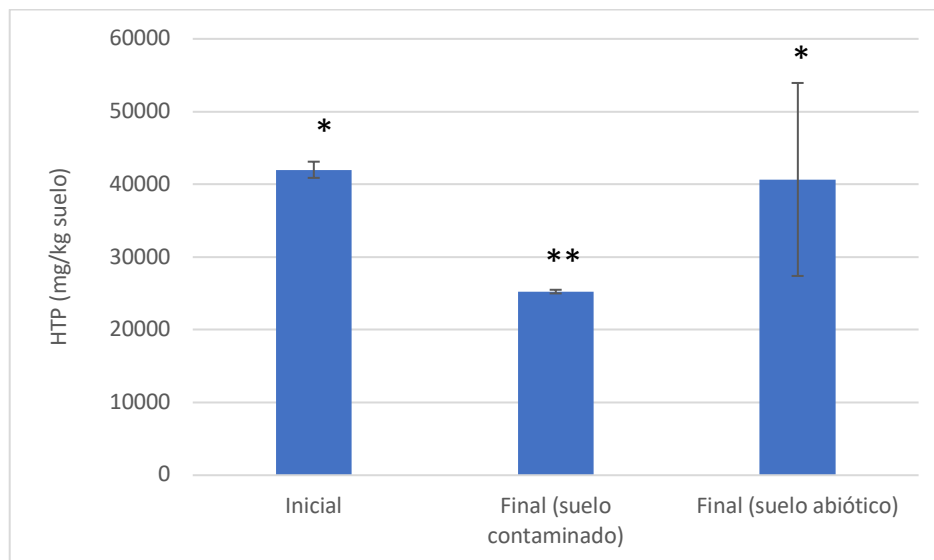


Figura 12. Concentraciones iniciales y finales de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) determinados en el suelo contaminado y en el control abiótico en el ensayo de biodegradabilidad de hidrocarburos. Todos los valores representan la media \pm desviación estándar (SD) de tres unidades experimentales independientes. Igual número de asteriscos (*) indica la ausencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos.

El incremento de la ABT junto con el incremento en el número de bacterias, tanto BAT como BDH, alcanzado en los sistemas conteniendo suelo contaminado y MSB, demostró que este suelo posee una microbiota autóctona degradadora de hidrocarburos que es capaz, al menos bajo condiciones controladas y favorables de temperatura, aireación y nutrientes, de desarrollarse y contribuir a la eliminación de los hidrocarburos contaminantes presentes en ese suelo. Por otro lado, demostró la ausencia en el suelo de compuestos capaces de inhibir la actividad biológica. Por todas estas razones, se podría considerar que este suelo contaminado es susceptible de ser tratado mediante una adecuada estrategia de biorremediación.

La eliminación de hidrocarburos en el control abiótico, sin actividad biológica, puede atribuirse a factores abióticos, fundamentalmente evaporación que podría haberse visto favorecida por la velocidad de agitación aplicada durante este ensayo, como así también por la temperatura y el tiempo de incubación de éste.

5.3 Ensayo de bioestimulación de microorganismos autóctonos

Numerosos estudios han evaluado métodos que aumentan la biodegradación de hidrocarburos en suelos en ambientes fríos, llegando a la conclusión de que la bioestimulación sería suficiente para remediar suelos comparado con el bioaumentación, observando porcentajes de remoción que van desde el 64% al 93% (Jeong y col, 2015).

La principal ventaja de la bioestimulación es que utiliza los microorganismos nativos que ya se encuentran adaptados al contaminante y pueden tolerarlo y/o degradarlo. Es fundamental evaluar el potencial biodegradador de estos microorganismos realizando estudios a escala de laboratorio en microcosmos, bajo condiciones controladas y favorables para su metabolismo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la aplicación *in situ* de esta técnica (en el sitio de contaminación), podría verse afectada por factores ambientales que determinarán la tasa real de biodegradación, la cual probablemente sea diferente de los resultados obtenidos en el laboratorio (Koshlaf y col., 2017).

Con la bioestimulación se busca mejorar las condiciones del suelo en cuanto a cantidad y calidad de nutrientes, y se pretende evaluar si es posible lograr una remoción de hidrocarburos utilizando los microorganismos propios de ese suelo. La adición de nutrientes en la bioestimulación puede hacerse adicionando sales inorgánicas simples o fertilizantes inorgánicos compuestos, tal como se ha reportado en previos estudios (Margesin y col., 1997; 2000; VanHamme y col., 2003). Las sales inorgánicas son las que tienen mayores ventajas y han demostrado mejor efectividad en procesos de biorremediación (García y col., 2011; Margesin y col., 2000).

Después de un derrame de petróleo los hidrocarburos se convierten en una fuente de carbono para los microorganismos presentes en el suelo. Cuando además se adicionan a este suelo nitrógeno y fósforo a través de sustratos fácilmente asimilables y en una proporción balanceada, se favorece el crecimiento microbiano. La proporción de C:N:P que se empleó fue de 100:10:1, que es la reportada como referencia en ensayos de bioestimulación (Martínez Álvarez y col., 2015; Vallejo, y col., 2005; Zawierucha y col., 2011).

Los métodos de recuento de microorganismos en placa son usados para monitorear los procesos de biorremediación. El recuento en placa es una técnica confiable y sensible usada para evaluar el potencial de biodegradación de los microorganismos presentes en el suelo (Sulaiman y col., 2015). El desarrollo de bacterias cultivables heterótrofas aerobias es influenciado por las propiedades del suelo y por el tipo de hidrocarburo presente. Altas cantidades de materia orgánica y suelos arcillosos, pueden disminuir la biodisponibilidad de los hidrocarburos, volviéndose menos tóxico el hidrocarburo y favoreciendo el crecimiento de los microorganismos. El pH es un factor importante que puede afectar la diversidad de microorganismos. Valores bajos (6,0-6,5) se asocian con altos recuentos de bacterias heterótrofas en comparación con valores de pH altos.

Los estudios realizados en microcosmos evalúan la tasa de biodegradación del hidrocarburo bajo determinadas condiciones controladas, y permiten encontrar una apropiada estrategia de biorremediación para aplicarlo a gran escala (Balba y col., 1998).

En este estudio se armaron sistemas microcosmos en frascos de vidrio de boca ancha por triplicado. Se consideraron tres tratamientos diferentes: control de comunidad, a los que no se les realizó ninguna modificación, los sistemas bioestimulados, a los que se les adicionaron sales, y el control abiótico, que se esterilizó químicamente con HgCl_2 . Los frascos se cubrieron con papel film y se incubaron por 40 días a 25°C . Al inicio y durante el ensayo se hicieron los análisis de humedad, recuento de bacterias aerobias totales, recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos y actividad biológica total. La determinación de hidrocarburos totales se realizó al inicio y al final del ensayo. Los microcosmos se mezclaron diariamente para homogeneizar y airear al suelo. Se mantuvieron constantes las variables de temperatura, humedad y aireación, y en el caso de los sistemas bioestimulados, los nutrientes agregados.

5.3.1 Recuento de bacterias totales degradadoras de hidrocarburos y actividad biológica total

En la Tabla 9 se muestran los recuentos bacterianos y la actividad microbiana total en cada sistema por cada día de muestreo. Del control abiótico no se muestran datos porque no se registró crecimiento de microorganismos, lo que indicó que los mismos fueron afectados de manera significativa por el HgCl_2 durante todo el ensayo. Este tratamiento nos permitió evaluar el porcentaje de pérdida de hidrocarburos por factores ajenos a la biodegradación.

Los recuentos de las BAT se expresan en el orden de 1×10^6 UFC/mL y los de las BDH en el orden de 1×10^5 UFC/mL con el objeto de hacer una comparación entre los sistemas evaluados.

De acuerdo a lo mostrado en la Tabla 9, se puede observar que en los sistemas control de comunidad, a los que solamente se les realizó la corrección de la humedad cuando fue necesario, el recuento inicial de las BAT fue de 192×10^6 UFC/g suelo y, que al cabo de 40 días de incubación, dicho recuento fue de 85×10^6 UFC/g suelo. Para el caso de las BDH el recuento inicial fue de $1,46 \times 10^5$ UFC/g suelo, culminando con un recuento de $0,4 \times 10^5$ UFC/g suelo a los 40 días. Se observa que los recuentos de las BAT disminuyeron a los 20 días y posteriormente se mantuvieron,

mientras que los recuentos de las BDH empezaron a disminuir a partir del día 10. Además, la ABT de estos sistemas fue de 4,05 µg fluoresceína/g suelo al inicio del ensayo y de 9,45 µg fluoresceína/g suelo al cabo de los 40 días, con valores más elevados entre los días de muestreo, probablemente debido a microorganismos no cultivables que aumentaron en número, o a enzimas libres que conservaron su actividad en el suelo. A pesar de esto, el valor final registrado no resultó muy distante del inicial.

Tabla 9. Recuento de bacterias aerobias totales (BAT), bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) y actividad biológica total (ABT) en el ensayo de bioestimulación. Los valores presentados corresponden a los datos obtenidos de una unidad experimental (microcosmo) representativa de tres unidades experimentales a cada tiempo de muestreo.

		Comunidad	Bioestimulado
Día 0	BAT*	192 x 10 ⁶	192 x 10 ⁶
	BDH*	1,46 x 10 ⁵	1,46 x 10 ⁵
	ABT**	4,05	4,05
Día 10	BAT	192 x 10 ⁶	46 x 10 ⁶
	BDH	1,3 x 10 ⁵	125 x 10 ⁵
	ABT	7,5	33,15
Día 20	BAT	78 x 10 ⁶	13,2 x 10 ⁶
	BDH	1,1 x 10 ⁵	110 x 10 ⁵
	ABT	11,25	31,05
Día 30	BAT	86 x 10 ⁶	15,6 x 10 ⁶
	BDH	1 x 10 ⁵	93 x 10 ⁵
	ABT	11,32	30,22
Día 40	BAT	85 x 10 ⁶	18,3 x 10 ⁶
	BDH	0,4 x 10 ⁵	89 x 10 ⁵
	ABT	9,45	42,07

*BAT y BDH expresados en UFC/g suelo

**ABT expresada en µg fluoresceína/g suelo

Por otra parte, se puede observar que en los sistemas bioestimulados, a los que se les adicionaron las sales de nitrógeno y fósforo y se les corrigió la humedad cuando fue necesario, el suelo contó con un recuento inicial de BAT de 192 x 10⁶ UFC/g suelo y, al cabo de 40 días, culminó con un recuento de 18,3 x 10⁶ UFC/g suelo, mientras que el recuento inicial de las BDH fue de 1,46 x 10⁵ UFC/g suelo y de 89 x 10⁵ UFC/g suelo al finalizar el ensayo.

Las BAT mostraron una marcada disminución desde el inicio y hasta los 20 días, lo cual podría ser debida a una etapa de adaptación de los microorganismos a la adición de las sales o a una disminución en la biodiversidad de los microorganismos. Las BDH en cambio, aumentaron en número con un pico en el recuento el día 10, terminando el ensayo con un valor más alto que el

inicial. Esto pudo deberse a que selectivamente los microorganismos degradadores aprovecharon las sales junto con el hidrocarburo presente en el suelo para crecer.

La ABT presenta un aumento al final del ensayo con respecto al valor inicial, con un pico máximo el día 40, indicando que la actividad microbiana aumentó a expensas de las BDH que fueron las que aumentaron en UFC.

Cuando comparamos el comportamiento de las BAT en ambos sistemas (Figura 13), vemos que los recuentos en los sistemas de control comunidad comenzaron a disminuir a partir del día 20 y luego se mantuvieron estables hasta el final del ensayo. En los sistemas bioestimulados se observó un descenso en el número de UFC desde el inicio y hasta los 20 días de incubación, manteniéndose en similares valores de recuentos hasta el final del ensayo, los cuales resultaron dos órdenes menores (en escala logarítmica) con relación a los controles de comunidad.

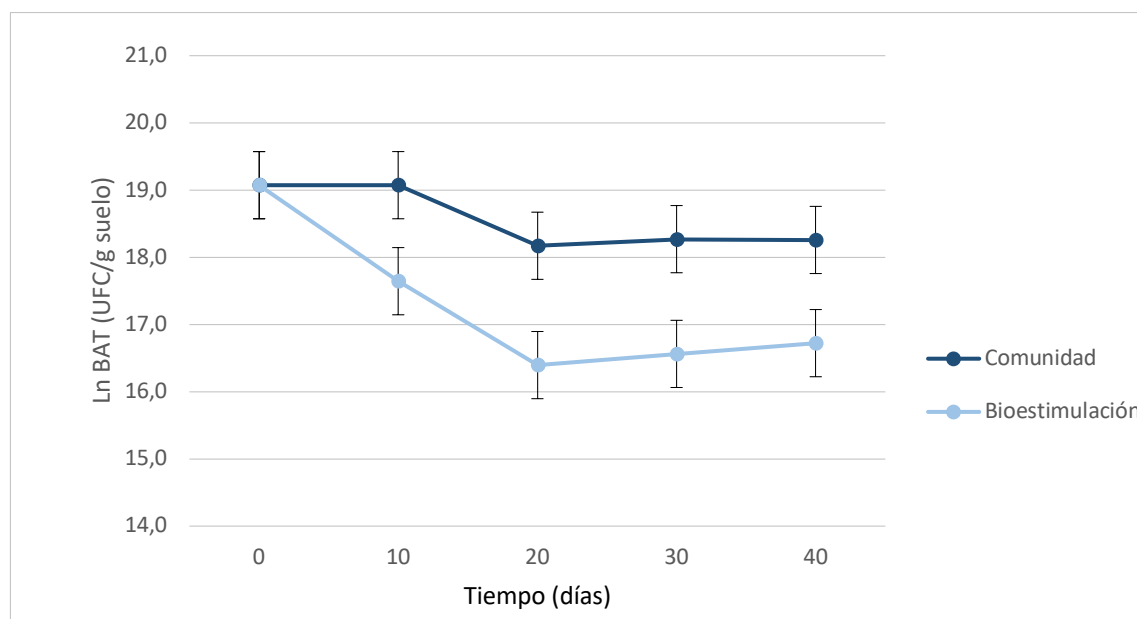


Figura 13. Recuento de BAT en los sistemas control de comunidad y bioestimulados, expresado en UFC/g suelo. Los valores presentados corresponden a los datos obtenidos de una unidad experimental representativa de tres unidades experimentales \pm error típico (ET) a cada tiempo de muestreo.

Cuando se comparan los logaritmos de los recuentos iniciales de las BAT y las BDH en los sistemas de comunidad y bioestimulados (Figuras 13 y 14), en cuanto al recuento de las BDH, ambos sistemas empiezan en el día 0 con más o menos 7 log menos que las BAT. Los recuentos de las BDH variaron poco en los controles de comunidad y tendieron a disminuir gradualmente a lo largo del ensayo, mientras que en los sistemas bioestimulados se incrementaron notablemente durante los primeros 10 días para luego mantener valores similares hasta los 40 días de incubación

(Figura 14). Estos recuentos ponen en evidencia que la adición de sales y los hidrocarburos disponibles fueron aprovechados por los microorganismos degradadores para incrementar el tamaño de su población en los microcosmos bioestimulados. Este marcado incremento inicial podría deberse a que los microorganismos utilizaron los hidrocarburos más disponibles para luego utilizar los menos disponibles. Al tratarse de un suelo contaminado crónicamente puede ocurrir que los hidrocarburos se encuentren secuestrados en la materia orgánica, o en los poros de las partículas del suelo, haciéndolos menos disponibles para los microorganismos; sumado a esto, los nutrientes empiezan a disminuir con el tiempo.

En necesario tener en cuenta que, para llevar a cabo este ensayo, se utilizó una temperatura de 20°C, la cual es una temperatura moderada que cercana a la óptima para el desarrollo de microorganismos aislados de climas fríos (sicrotolerantes) y aquella que pudo proveerse en las condiciones de laboratorio.

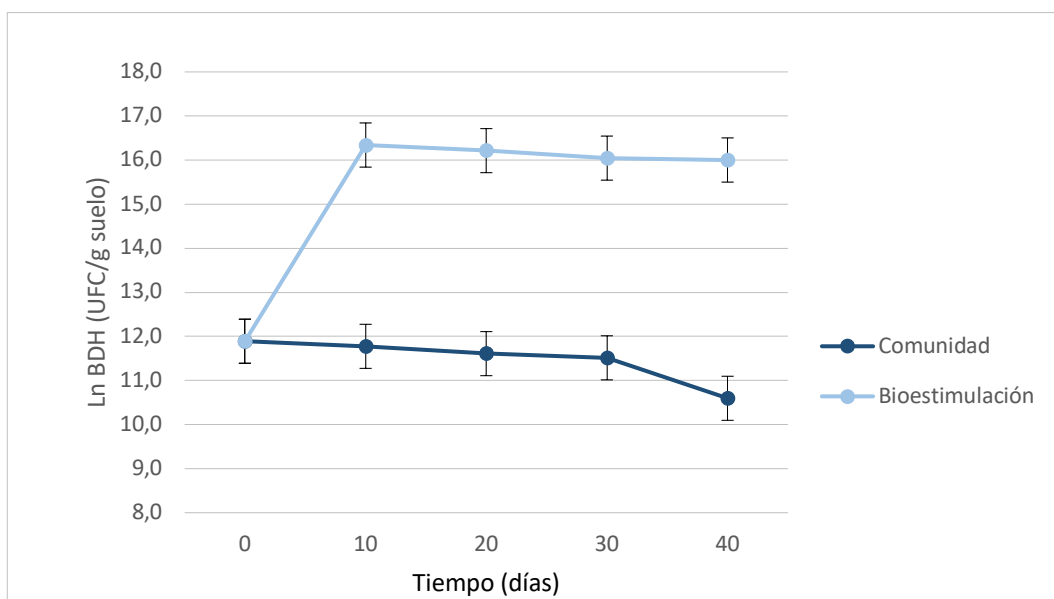


Figura 14. Recuento de BDH en los sistemas control de comunidad y bioestimulados, expresado en UFC/g suelo. Los valores presentados corresponden a los datos obtenidos de una unidad experimental representativa de tres unidades experimentales \pm error típico (ET) a cada tiempo de muestreo.

Cuando se realizó el análisis de la relación entre BDH y BAT (BDH/BAT) en ambos sistemas, los bioestimulados reflejaron un aumento de la misma hasta los 20 días, que luego disminuyó. El aumento de esta relación es debido al incremento de las BDH al tiempo que las BAT disminuyeron. Estos sistemas mostraron una relación BDH/BAT mayor que el control de comunidad, cuya relación prácticamente no varió en el tiempo y se mantuvo en valores cercanos a cero (Figura 15).

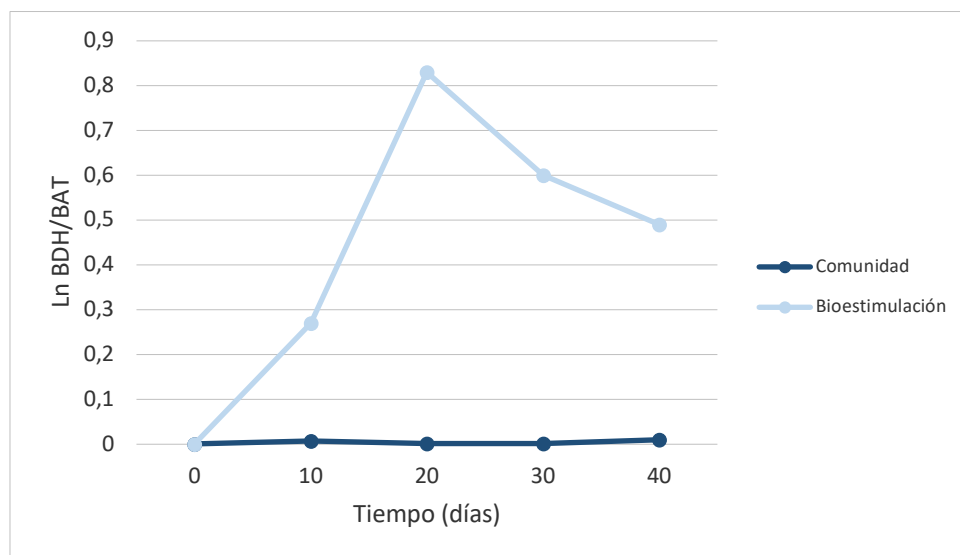


Figura 15. Comportamiento de la relación BDH/BAT en los sistemas control de comunidad y bioestimulados. Los valores presentados corresponden a los datos obtenidos de la relación BDH/BAT de una unidad experimental representativa de tres unidades experimentales a cada tiempo de muestreo.

La disminución en el recuento de las bacterias aerobias totales y degradadoras de hidrocarburos que se observa en ambos sistemas al finalizar el ensayo (Tabla 11), podría deberse a la disminución de los nutrientes del suelo (incluida la disminución de hidrocarburos biodisponibles), u otros cambios fisicoquímicos como el pH, ya que un pH entre 6,5 y 8,5 resulta el pH óptimo para los procesos de biodegradación (García y col., 2011; Margesin y col., 2000).

Por otra parte, el sistema microcosmos que actuó como control abiótico no tuvo crecimiento de microorganismos, por lo que podemos asegurar que se mantuvo sin actividad microbiana durante todo el ensayo. Esto nos permitió evaluar el comportamiento de los hidrocarburos sin la presencia de la microbiota del suelo.

La actividad enzimática presente en el suelo se considera un parámetro de evaluación biológica del suelo. Varias enzimas se usan para evaluar esta actividad. En este trabajo se utilizó la técnica de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) como medida directa de la actividad biológica del suelo. La FDA es hidrolizada por exoenzimas y enzimas unidas a la membrana liberando fluorescencia, la cual es determinada mediante espectrofotometría y se relaciona de manera directa con la actividad biológica presente en el suelo, como se ilustra en la Figura 16.

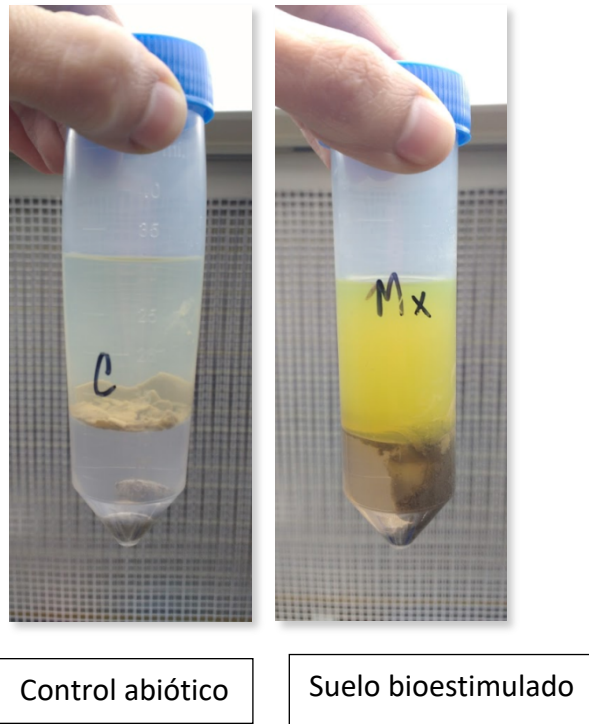


Figura 16. Actividad biológica total (ABT) determinada por la técnica de la fluoresceína diacetato (FDA), donde se observa la diferencia de intensidades de coloración generada por la presencia de fluoresceína en el control abiótico (C) y en el suelo analizado (Mx).

En la Figura 17 se puede observar cómo durante los primeros 10 días la actividad biológica se incrementó de manera significativa en los sistemas bioestimulados con respecto a los sistemas control de comunidad. Estos últimos, por el contrario, mostraron un leve ascenso los primeros 20 días el cual se mantuvo sin diferencias significativas hasta el final del ensayo.

En cuanto al control abiótico, no se registraron datos ya que no se observó actividad biológica, por tratarse éste de un suelo esterilizado químicamente.

Estos valores elevados en la ABT en los sistemas bioestimulados con respecto a los control de comunidad, se correlacionan con los recuentos de las BDH.

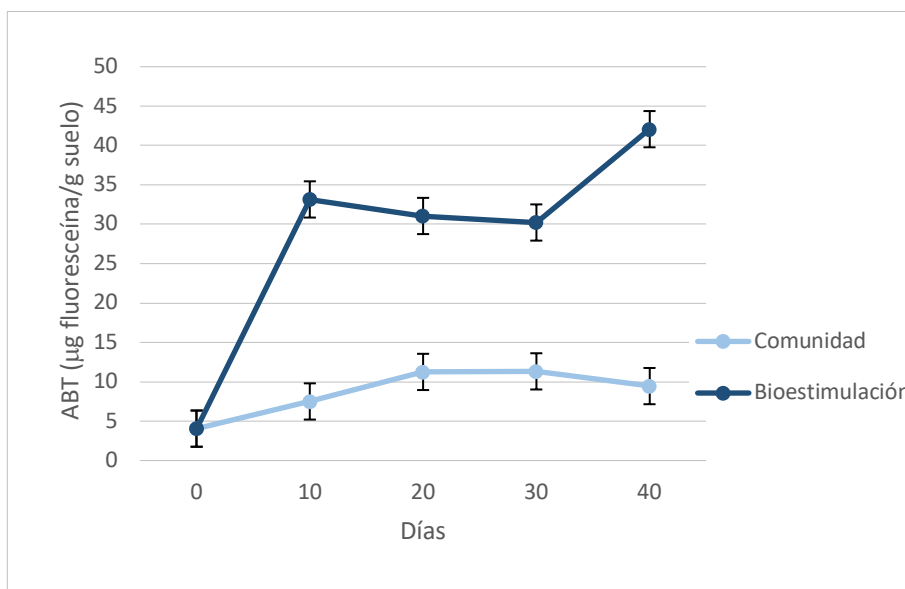


Figura 17. Actividad biológica total expresada en μg de fluoresceína/g suelo en los sistemas control de comunidad y bioestimulados. Los valores presentados corresponden a los datos obtenidos de una unidad experimental representativa de tres unidades experimentales \pm error típico (ET) a cada tiempo de muestreo.

La ABT estimada por la técnica de la hidrólisis del FDA se incrementó a los 40 días aproximadamente 10 veces respecto a su valor inicial (de 4.05 a 42.7 μg fluoresceína/g suelo) en los sistemas bioestimulados, mientras que en el control de comunidad este incremento fue mucho más paulatino, alcanzando un valor máximo entre los 20 y 30 días que fue ligeramente superior a dos veces el valor inicial. Estos resultados sugieren que las bacterias aerobias heterótrofas totales se ven afectadas en cierta medida por el tratamiento de la bioestimulación y/o la movilización de los hidrocarburos o sus metabolitos mientras que las degradadoras se ven favorecidas por la adición de nutrientes y la presencia de los contaminantes que le sirven de sustrato

5.3.2 Biodegradación de los hidrocarburos totales del petróleo

En los sistemas control de comunidad se registró una eliminación de hidrocarburos de aproximadamente un 60,2%, mientras que los sistemas bioestimulados ésta remoción fue del 61,4%. El control abiótico presentó un valor de remoción de hidrocarburos bastante elevado (53,3%) teniendo en cuenta que se mantuvo sin actividad biológica durante todo el ensayo. Esta eliminación podría deberse a otros procesos diferentes a la biodegradación, como pueden ser la volatilización de los hidrocarburos durante el mezclado periódico, o que los hidrocarburos pudieran adherirse a otras matrices en el suelo. En la Figura 18 se muestran los valores de hidrocarburos totales del petróleo determinados a los 40 días de incubación en cada sistema evaluado y en comparación con el valor inicial, expresados en mg HTP/Kg suelo.

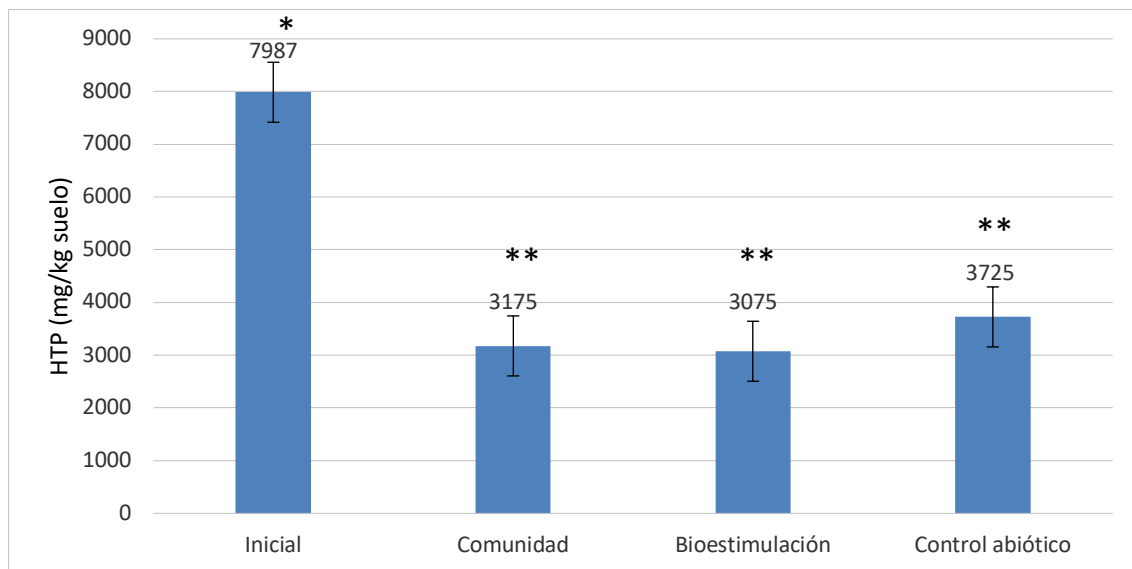


Figura 18. Concentración de HTP iniciales y luego de 40 días de incubación en los sistemas control de comunidad, bioestimulados y control abiótico. Los valores presentados corresponden a los datos obtenidos de una unidad experimental representativa de tres unidades experimentales \pm desvío estándar (SD) de la determinación al inicio y al final del ensayo. Igual número de asteriscos (*) indica la ausencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos.

Ruberto y col. (2003) reportó una pérdida abiótica del 54% en 10 días en un suelo contaminado de forma aguda con gasoil, debido a la volatilización. A pesar de esta pérdida abiótica de fracciones volátiles, una fracción de los hidrocarburos permanece en el suelo aún muchos años después.

Un proceso de bioestimulación no siempre incrementa los porcentajes de degradación de los hidrocarburos, debido a factores que pueden limitar la actividad microbiana o interactuar con los nutrientes, como lo son un valor bajo de pH del suelo ($<5,0$), bajo porcentaje de humedad, concentración de hidrocarburos (presencia de fracciones de difícil degradación), aceptores de electrones, temperatura, entre otros (Vallejo y col., 2005) o simplemente porque el tiempo de tratamiento no fue suficiente.

En este ensayo se obtuvieron porcentajes de remoción abiótica que se encuentran en el rango de los reportados por otros autores para suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, ya que una fracción importante de hidrocarburos es susceptible de volatilización. Este es un porcentaje al que debería apuntarse a disminuir, ya que los componentes volátiles de los hidrocarburos son perjudiciales para los seres vivos (Costa y col., 2012).

A pesar de que la concentración inicial de los hidrocarburos fue muy alta, se esperaría que resultara tóxico y afectara el desarrollo de algunos microorganismos. Si bien en cierta medida esto puede haber sucedido, en el tratamiento de bioestimulación se estimuló la respuesta del sistema biológico presente en el suelo contaminado, tal como se evidencia a inicio del ensayo con el incremento de

las BDH, así como también de la ABT; los porcentajes de remoción del sistema bioestimulado no son muy distantes de los del control abiótico, mostrando que una fracción de los hidrocarburos no estaría siendo biodegradado, al menos en el período evaluado. Teniendo en cuenta que la biodisponibilidad depende de la naturaleza del hidrocarburo, sería útil determinar las características de la mezcla contaminante al inicio y al final del ensayo, luego de aplicar el proceso de bioestimulación, para identificar las fracciones de los hidrocarburos que no fueron degradados, ya que, dependiendo de la composición y del peso molecular, los procesos de biodegradación suelen ser mayores o menores. Con esta información se podría orientar un proceso de biorremediación adecuado para este tipo de suelo. A diferencia de las técnicas no biológicas usadas para tratar suelos contaminados, las técnicas biológicas deben ser dirigidas a cada sitio en particular (sitio-específicas), ya que cada suelo es diferente en su composición fisicoquímica y microbiológica.

En un estudio realizado por Jiang y col. (2016), en donde se aplicó un proceso de bioestimulación a suelos contaminados de forma aguda y crónica con hidrocarburos (con mayor proporción de alifáticos que aromáticos), se necesitó de 112 días para tener un porcentaje de remoción mayor al 80% en ambos suelos. Mientras que Mair y col. (2013), reportaron a las 8 semanas de tratamiento la ausencia de diferencias en el grado de remoción de hidrocarburos entre un suelo sin nutrientes y un suelo con nutrientes, observándose dichas diferencias a las 30 semanas (210 días) de tratamiento.

Fuentes y col (2014) mencionan dos procesos de biorremediación de hidrocarburos en el Ártico. En un sitio se alcanzó al cabo de un mes un 58% de degradación y al cabo de un año un 91%, mientras que en otro sitio diferente, al mes se alcanzó un 47% de remoción y al año un 52%. La explicación para estas diferencias se basan en la diversidad de las comunidades microbianas presentes en ambos sitios. Teniendo en cuenta este antecedente, hubiera sido de mayor información conocer la diversidad microbiana del suelo en estudio con métodos independientes del cultivo, y verificar de este modo el impacto sobre la tasa de biodegradación de los hidrocarburos presentes, así como compararlo con procesos de biorremediación llevados a cabo en suelos con condiciones similares.

Si bien, en el período de incubación no se observaron diferencias significativas en las concentraciones finales de hidrocarburos a los 40 días para los sistemas evaluados, la importante respuesta de la comunidad microbiana en los sistemas bioestimulados sugiere que esta estrategia podría ser efectiva. Sin embargo, considerando la alta concentración inicial de hidrocarburos, este

suelo podría requerir de tiempos más prolongados de tratamiento. De esa manera, la tendencia observada en este experimento (mayor remoción en los sistemas bioestimulados) podría acentuarse.

5.4 Aislamiento y caracterización microbiológica de microorganismos degradadores de hidrocarburos

Al finalizar el ensayo de bioestimulación, se seleccionaron colonias con diferente morfotipo a partir de las placas con agar gasoil (AGO) de la última dilución sembrada para el recuento de bacterias degradadoras donde las colonias se encontraban más distanciadas (Figura 19), las que luego se sembraron en placas con AGO mediante estriado por agotamiento en superficie. El hecho de elegir colonias de la placa donde se sembró la dilución más elevada permite seleccionar a los microorganismos degradadores cultivables más abundantes en el suelo tratado. Luego, para verificar su pureza, estas colonias se sembraron en placas con agar nutritivo al 50% para permitir el desarrollo de cualquier microorganismo acompañante tolerante al gasoil pero que no pudiera desarrollarse en AGO.

A partir de esta técnica de aislamiento se lograron aislar un total de 11 colonias con diferente morfotipo. La tinción de gram de la biomasa de estos 11 aislamientos mostró que: 10 correspondían a bacterias (Figura 20), las cuales se tiñeron como bacilos gram negativos (Figura 22) y una correspondía a un hongo filamentoso (Figuras 21 y 23). Todos los aislamientos microbianos fueron criopreservados a -20°C en medio salino basal con glicerol al 40% para estudios posteriores y su tipificación.

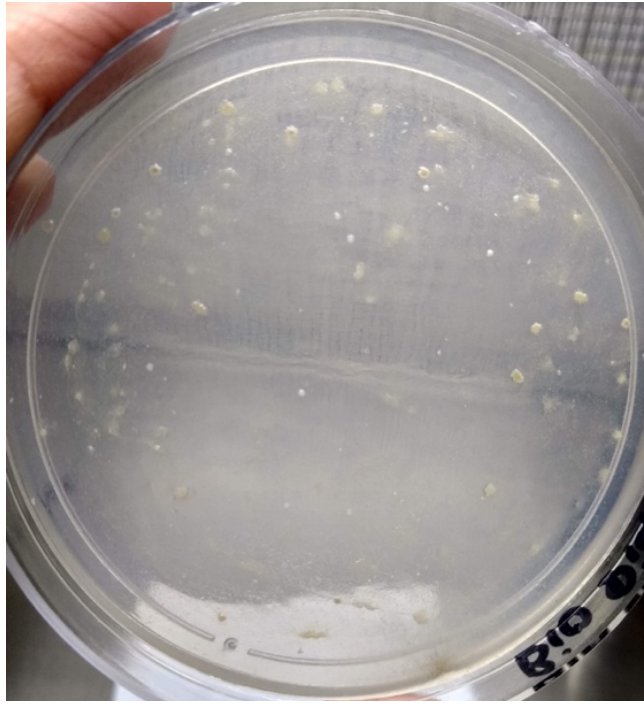


Figura 19. Desarrollo de colonias aisladas en placa con AGO a partir de la última dilución seriada del recuento de bacterias degradadoras.

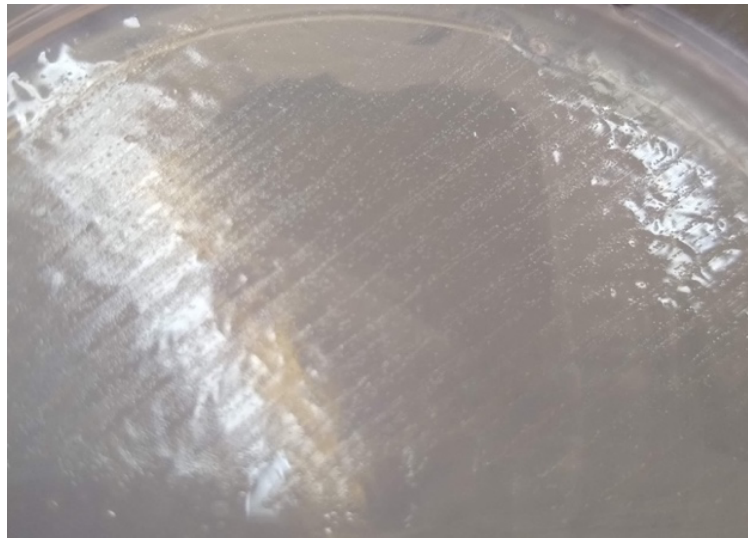


Figura 20. Aislamiento bacteriano en AGO.



Figura 21. Aislamiento del hongo micelial en AGO

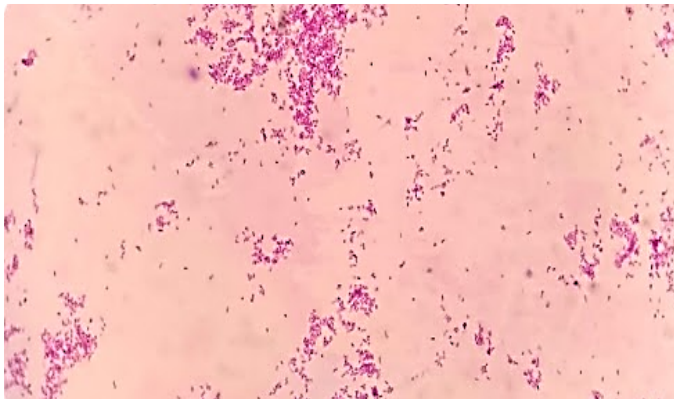


Figura 22. Coloración de Gram de uno de los aislamientos de bacilos gramnegativos

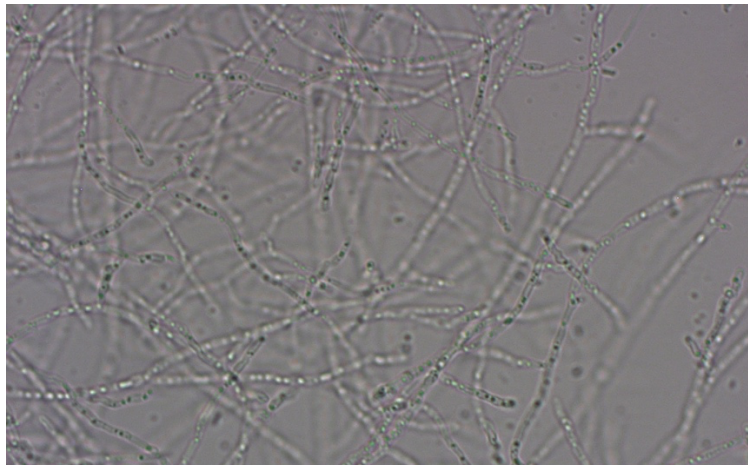


Figura 23. Examen directo del aislamiento correspondiente al hongo micelial

5.4.1 Caracterización bioquímica e identificación taxonómica por biología molecular de microorganismos degradadores de hidrocarburos

A los 11 aislamientos microbianos se les realizaron pruebas bioquímicas con el fin de obtener una aproximación al tipo de microorganismo aislado, cuyos resultados se muestran en la Tabla 10. Las 10 bacterias aisladas correspondieron todas a bacilos gramnegativos, no fermentadores y móviles, mientras que el hongo correspondió mostro ser filamentoso.

Tabla 10. Pruebas bioquímicas realizadas a cada aislamiento microbiano.

Aislamiento	GRAM	OXIDASA	MOVILIDAD	TSI	CITRATO
PBR-1	BGN	+	+	N/F	+
PBR-2	BGN	+	+	N/F	+
PBR-3	BGN	+	+	N/F	+
PBR-4	BGN	+	+	N/F	+
PBR-5	BGN	+	+	N/F	+
PBR-6	BGN	+	+	N/F	+
PBR-7	BGN	+	+	N/F	-
PBR-8	BGN	+	+	N/F	-
PBR-9	BGN	+	+	N/F	+
PBR-10	BGN	+	+	N/F	+
PBR-11	Hifas	N/A	N/A	N/A	N/A

BGN: bacilo Gram negativo

-: Negativo

+: Positivo

N/F: No fermentador

N/A: No aplica

Posterior a las pruebas bioquímicas, los aislamientos bacterianos se identificaron mediante la secuenciación parcial del gen ribosomal ARNr 16S, mientras que el aislamiento fúngico se identificó basado en la secuencia de la región D1/D2 del gen ribosomal ARNr 26S. La concentración e integridad del ADN extraído se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed™, Biotium (Figura 24).

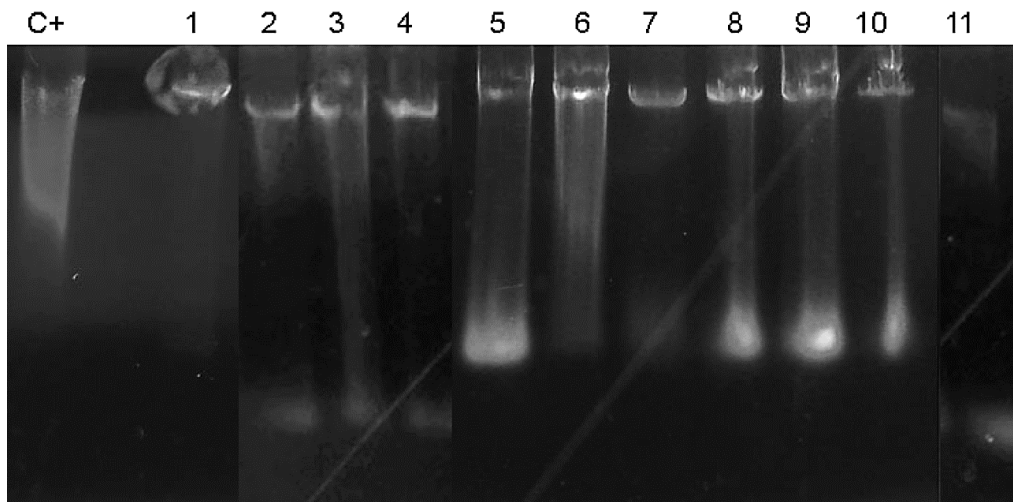


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa del ADN genómico extraído de los 11 aislamientos. Calles: C+: control positivo, 1: PBR-1, 2: PBR-2, 3: PBR-3, 4: PBR-4, 5: PBR-5, 6: PBR-6, 7: PBR-7, 8: PBR-8, 9: PBR-9, 10: PBR-10, 11: PBR-11.

La comparación de las secuencias de genes ribosomales obtenidas a partir de los aislamientos con secuencias homólogas de cepas tipo, junto a las características morfológicas y metabólicas obtenidas por tinción de Gram y pruebas bioquímicas, permitió la identificación a nivel de género de los aislamientos (Tabla 11).

De los 11 aislamientos obtenidos, dos se identificaron como *Achromobacter sp.*, ocho como *Pseudomonas sp.*, y el hongo micelial como *Cadophora sp.*

La literatura ha reportado la identificación de más de 79 géneros bacterianos con capacidad de degradar hidrocarburos, dentro de los cuales se encuentran los hallados en este estudio, *Pseudomonas sp.* y *Achromobacter sp.* *A. xylooxidans*, por ejemplo, degrada una amplia variedad de hidrocarburos monoaromáticos y poliaromáticos (Xu y col., 2018) y también se encuentran descritos como degradadores de hidrocarburos hallados en ecosistemas marinos (Salleh y col., 2003).

Las bacterias del género *Pseudomonas* son microorganismos con gran capacidad de adaptación a ambientes extremos, lo que los hace ubicuos, y se destacan por sus bajos requerimientos nutricionales y gran diversidad metabólica. El género *Pseudomonas* se divide en dos linajes: *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* (Mulet y col, 2010). Dentro de este último linaje se encuentra el grupo

P. fluorescens, al cual pertenecen las *Pseudomonas* aisladas en este trabajo, según la cepa tipo más relacionada.

Muchas de las especies de *Cadophora* se presentan como patógenos de plantas produciendo pudrición de frutas y madera (Travadon y col, 2015). Es un género ubicuo, que también se ha aislado de madera en descomposición, agua dulce, sedimento marino y suelo en la Antártida (Blanchette y col., 2004; Gonçalves y col., 2012; Rodríguez-Andrade y col., 2017; Vieira y col., 2018; Duran y col., 2019; Martorell y col., 2018).

En un estudio de Duran y col (2019), donde determinaron la diversidad fúngica del suelo en la Antártida, identificaron 19 géneros entre los que se encuentra *Cadophora*, aislamientos que, de acuerdo a su temperatura óptima de crecimiento (entre los 4 y 25°C) fueron clasificados como sicrotolerantes. La especie *C. antarctica* fue descrita por Rodríguez-Andrade y col (2017), la cual fue recuperada de una muestra de suelo contaminada con gasoil en la isla 25 de Mayo (King George Island) en la Antártida y se encuentra filogenéticamente relacionada con *Cadophora luteo-olivacea*. Estos aislamientos demuestran la capacidad de este género de crecer en condiciones extremas y bajo factores de estrés.

El aislamiento nombrado como **PBR-1** fue identificado como perteneciente al género *Pseudomonas*, y se encuentra estrechamente relacionada con la cepa tipo de *Pseudomonas extremaustralis* perteneciente al grupo de *P. fluorescens*, subgrupo *P. fluorescens* según la clasificación propuesta por Mulet y col., (2010).

Al hacer el análisis, la secuencia obtenida de este aislamiento presentó un 100% de identidad con la secuencia homóloga en el genoma de una cepa de *Pseudomonas* aislada de un cultivo líquido enriquecido con γ -hexaclorociclohexano en el que se aisló además *Sphingobium* sp. cepa TKSy se le dio el nombre de *Pseudomonas* sp. cepa TKP (Ohtsubo y col., 2014).

El aislamiento **PBR-2** también se identificó como *Pseudomonas* sp., con un 100% de identidad con *Pseudomonas* sp. cepa TKP. Las cepas tipo más cercanas son *Pseudomonas extremaustralis* y *Pseudomonas veronii*.

Los aislamientos **PBR-3, 4, 5, 6, 9 y 10** fueron también identificados como pertenecientes al género *Pseudomonas*, y estrechamente relacionados con la cepa tipo de *Pseudomonas extremaustralis*.

Los aislamientos **PBR-7** y **8** se identificaron como pertenecientes al género *Achromobacter* y se encuentran altamente relacionados con las especies *A. spanius*, *A. deleyi* y *A. kerstersii*.

El aislamiento **PBR-11** fue identificado como *Cadophora sp.*, altamente relacionado con *C. malorum* y *C. luteo-olivacea*.

Tabla 11. Afiliación taxonómica de los aislamientos obtenidos, basada en la comparación de la secuencia parcial del ADNr 16S (bacterias) y región D1/D2 del 26S (hongos) contra secuencias homólogas de cepas tipo y genomas de referencia presentes en bases de datos especializadas.

Aislamiento	Largo de la secuencia	Identificación taxonómica	Cepa tipo más relacionada	Número de acceso	% de similitud
PBR-1	1064 nt	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	AHIP01000 073	99,91%
PBR-2	731 nt	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas extremaustralis</i> <i>Pseudomonas veronii</i>	JYLL01000 074 AHIP01000 073	99,86% 99,86%
PBR-3	1122 nt	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	AHIP01000 073	99,91%
PBR-4	1083 nt	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	AHIP01000 073	99,91%
PBR-5	1063 nt	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	AHIP01000 073	100%
PBR-6	1069nt	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	AHIP01000 073	99,91%
PBR-7	1122 nt	<i>Achromobacter sp.</i>	<i>Achromobacter spanius</i> <i>Achromobacter deleyi</i> <i>Achromobacter kerstersii</i>	AY170848 HG324053 HG324052	99,91% 99,91% 99,91%
PBR-8	1081 nt	<i>Achromobacter sp.</i>	<i>Achromobacter spanius</i> <i>Achromobacter deleyi</i> <i>Achromobacter kerstersii</i>	AY170848 HG324053 HG324052	100% 100% 100%
PBR-9	1156 nt	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	AHIP01000 073	99,91%
PBR-10	1115 nt	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas extremaustralis</i>	AHIP01000 073	99,91%
PBR-11	574 nt	<i>Cadophora sp.</i>	<i>Cadophora luteo-olivacea</i> <i>Cadophora malorum</i>	MF494616 CBS117865	100% 100%

5.4.2 Evaluación de la capacidad degradadora de hidrocarburos de los aislamientos microbianos

La evaluación de la capacidad de degradación de los hidrocarburos de esta colección de microorganismos es información valiosa para el diseño de un proceso de biorremediación en el cual se contemple potenciar a la microbiota autóctona con microorganismos, también autóctonos, cultivados en el laboratorio e inoculados en el suelo a tratar. El DCPIP se utiliza en un ensayo como indicador colorimétrico que determina qué hidrocarburos degrada cada microorganismo o una mezcla de ellos. El cambio de color de la molécula de DCPIP es directamente proporcional a la utilización/degradación del hidrocarburo que se está evaluando (Varjani y Upasani, 2013). En este estudio se realizó la evaluación de la capacidad degradadora de cada aislamiento microbiano por separado.

Los hidrocarburos que se evaluaron como fuente única de carbono fueron el gasoil, el dodecano y el hexadecano en MSB con DCPIP como indicador de metabolismo microbiano. La prueba se desarrolló por triplicado en tubos de ensayo incubados a 20°C, con inspección visual diaria con el fin de observar el cambio de color. Los resultados del perfil de utilización de hidrocarburos de cada aislamiento se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Perfil de degradación de hidrocarburos de los aislamientos microbianos.

Aislamiento	Sustrato		
	Gasoil	Dodecano	Hexadecano
PBR-1	++(14)	++(14)	-
PBR-2	++(35)	+(45)	+(45)
PBR-3	++(14)	++(11)	-
PBR-4	+(35)	-	-
PBR-5	+(14)	-	-
PBR-6	+(41)	++(41)	-
PBR-7	+++ (35)	-	-
PBR-8	+++ (25)	++ (25)	-
PBR-9	+++ (35)	-	-
PBR-10	+++ (35)	-	-
PBR-11	+(41)	+++ (41)	-

Las cruces indican la intensidad de decoloración: leve (+), moderada (++), marcada (+++), o sin cambios de color (-). Los tiempos de positivización (en cantidad de días), se muestran entre paréntesis.

De acuerdo al perfil de degradación de hidrocarburos mostrado por las bacterias, los aislamientos de *Achromobacter* (PBR-7 y 8) serían cepas diferentes según los hidrocarburos que degradan (Tabla 12). Los aislamientos de *Pseudomonas* se podrían separar en tres grupos: los que solo crecen utilizando compuestos del gasoil (PBR-4, 5, 9 y 10), los que además son capaces de crecer en gasoil y dodecano (PBR-1, 3 y 6), y un único aislamiento que también es capaz de utilizar el hexadecano (PBR-2). Con las características morfológicas, moleculares y metabólicas evaluadas, no se pueden diferenciar los aislamientos dentro de los grupos mencionados, por lo que no es posible asegurar si PBR-4, 5, 9 y 10, por un lado, y PBR-1, 3 y 6, por el otro, corresponden o no a la misma cepa que fuera aislada repetidas veces. Por otra parte, el hongo micelial *Cadophora sp* (PBR-11) fue capaz de crecer utilizando el gasoil y el dodecano.

En la Figura 25 se muestra el armado del ensayo de evaluación de la capacidad de degradación de hidrocarburos para un aislamiento. Se pueden observar los tubos correspondientes al control negativo (CS) que mantienen el color original del DCPIP. Los tubos que contienen gasoil y dodecano presentan un cambio hacia tonos azules diferentes, pero más claros que el control negativo, mientras que en el hexadecano, el color se mantiene inalterable indicando que este aislamiento no utiliza al hexadecano como fuente única de carbono, aunque sí al gasoil y al dodecano.

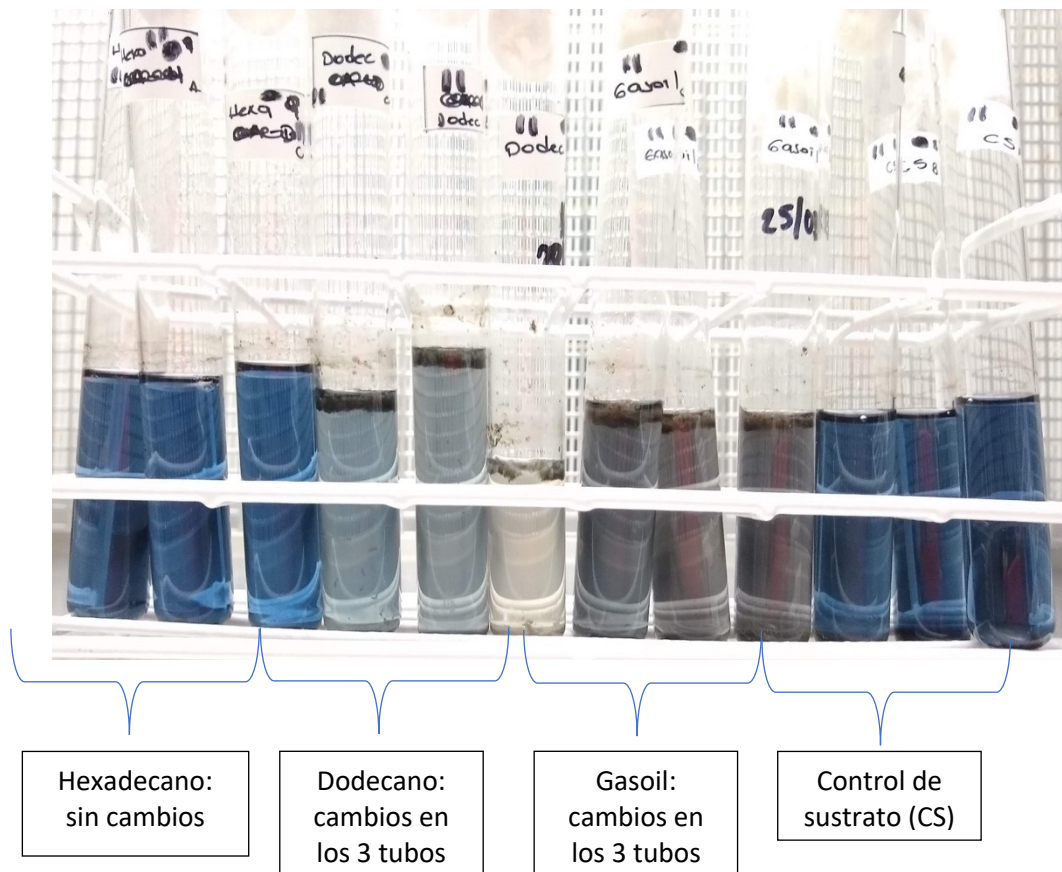


Figura 25. Perfil de degradación de hidrocarburos de *Cadophora sp.*, donde se puede observar el cambio de color del DCPIP en los tubos con dodecano y gasoil en comparación con los tubos control de sustrato (CS).

Estos resultados sugieren que, en caso de aplicar una estrategia de bioaumentación, podría pensarse en el armado de una asociación o consorcio de microorganismos simplificado combinando espectro de degradación con velocidad de degradación. En ese sentido, podría incluirse:

- PBR-1 o PBR-3, como veloces degradadores de Gasoil y Dodecano
- PBR-2 como degradador de Hexadecano
- PBR-11 como hongo filamentoso degradador de hidrocarburos

Ha sido reportado que la presencia de hongos filamentosos en suelos, incluyendo contaminados, tiene un efecto muy positivo sobre la dispersión de los microorganismos en un proceso denominado “autopistas fúngicas” (fungal highways) que permite que las bacterias alcancen fracciones del suelo que, en ausencia del hongo, les resultarían inaccesibles (Banitz y col., 2013). En el caso de la biorremediación, esto favorece la degradación del contaminante y la distribución homogénea de los microorganismos degradadores. Por esta razón la inclusión de PBR-11 sería positiva para una estrategia de bioaumentación, más allá de no aportar un espectro de degradación diferente a PBR-1 o 3.

Luego de la selección preliminar de los microorganismos a utilizar, sería necesario testear la compatibilidad entre ellos para luego construir la asociación.

6 Conclusiones

En base a los experimentos realizados y a los resultados obtenidos, se proponen las siguientes conclusiones

- El suelo contaminado investigado en este trabajo es hábitat de una población microbiana que tiene capacidad para degradar hidrocarburos tal como se evidenció en el ensayo de biodegradabilidad.
- La aplicación de un proceso de bioestimulación (adición de las sales de N y P) logró estimular significativamente la población microbiana del suelo, lo que fue demostrado por un incremento de la población cultivable degradadora de hidrocarburos junto con un aumento de la actividad biológica total. Esto sugiere que en el suelo tratado existe una limitación en la disponibilidad de esos nutrientes que reduce la actividad microbiana posible.
- Si bien las sales utilizadas en el proceso de biodegradación lograron estimular el desarrollo de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, es posible la utilización de otras fuentes de nutrientes como los fertilizantes, por lo que se podrían estudiar y evaluar si éstos son más favorables en términos de remoción de hidrocarburos y recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos con respecto a las sales inorgánicas.
- En este trabajo solo se evaluó a los microorganismos cultivables como parámetro durante el proceso de biorremediación. Este parámetro mostró incrementos significativos en los sistemas donde se aplicó algún tipo de bioestimulación y funcionó como indicador de la capacidad degradadora de la comunidad microbiana autóctona presente en el suelo tratado. Sin embargo, dado que la fracción cultivable de las comunidades microbianas de suelo representan solo un porcentaje de alrededor del 1% del total, sería interesante investigar también la evolución de los microorganismos, no cultivables durante dicho proceso, a fin de identificar a otros actores clave.
- A pesar del incremento de la actividad biológica total y degradadora causada por la bioestimulación, el porcentaje de remoción de hidrocarburos observado (61,4%) fue similar a aquel registrado en el control de comunidad (60,2%) y el control abiótico (53,3%). Esto sugeriría que esa fracción de hidrocarburos removida por factores abióticos es

significativa y que el tiempo del proceso de bioestimulación contemplado en este ensayo no sería el suficiente para lograr, o al menos evidenciar, una remoción diferencial de los hidrocarburos. Esto podría estar asociado a la una alta carga inicial de los mismos, o a la existencia de una baja biodisponibilidad de estos en el suelo. En ese sentido, un análisis cualitativo de la composición de los hidrocarburos contaminantes del suelo antes y después del proceso de bioestimulación, permitiría conocer la identidad de la fracción de hidrocarburos presente inicialmente en el suelo, la degradada biológicamente y la remanente. Esto permitiría dilucidar si tiempos más extensos del proceso mejorarían la eficiencia de la remoción de los contaminantes, o se debería evaluar la aplicación de otra estrategia.

- Se lograron aislar e identificar ocho bacterias del género *Pseudomonas*, dos del género *Achromobacter*, y un hongo filamentoso del género *Cadophora*, los cuales han sido reportados como microorganismos presentes en ambientes contaminados con hidrocarburos del petróleo.
- Las cepas aisladas, identificadas y criopreservadas demostraron capacidad para degradar varios hidrocarburos, las cuales podrían ser utilizadas de manera individual o en consorcios como herramientas biológicas para la aplicación de estrategias de bioaumentación sobre suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo.

Los medios de cultivo y soluciones empleadas se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. Las soluciones que no se podían autoclavar como los hidrocarburos y el DCPIP se esterilizaron por filtración usando membranas de 0,22 µm de diámetro de poro.

7.1 Medio salino basal (Espeche y col., 1994)

Solución 1

NH ₄ NO ₃	40 g	80 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.1 g	0.2 g
ZnCl ₂	0.1 g	0.2 g
H ₂ O csp	300 mL	600 mL

Solución 2

MgSO ₄ .7H ₂ O	2.0 g	4.0 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g	0.2 g
EDTA	0.1 g	0.2 g
H ₂ O csp	300 mL	600 mL

Solución 3

MnSO ₄	0.1 g	0.2 g
CuSO ₄	0.3 g	0.6 g
H ₂ O csp	300 mL	600 mL

Buffer fosfatos

KH ₂ PO ₄	1.8 g/L
Na ₂ HPO ₄	7.9 g/L
Extracto de levadura	0.1 g/L

pH final = 7,5

Las soluciones se esterilizaron en autoclave por separado. Cuando tuvieron una temperatura menor a 50°C, se adicionaron 30 mL de cada solución a 910 mL de buffer fosfatos.

7.2 Agar gasoil

1. Preparar una solución de agar al 1,6% en buffer fosfatos y esterilizar en autoclave.
2. Dejar enfriar a 50°C y agregar las soluciones 1, 2 y 3 estériles en las proporciones descriptas anteriormente.
3. Agregar gasoil (previamente esterilizado por filtración en membrana de 0,22 µm) a una concentración final del 1%.

Mezclar por agitación suave y dispensar el medio en placas de Petri.

7.3 Agar R2A

Se utilizó agar R2A comercial (Laboratorios Britania S.A., Argentina) que se preparó según las indicaciones del fabricante. La composición del medio se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Composición del agar R2A en g/L

Extracto de levadura	0,5
Proteosa peptona N°3	0,5
Peptona ácida de caseína	0,5
Glucosa	0,5
Almidón soluble	0,5
Piruvato de sodio	0,3
Fosfato dipotásico	0,3
Sulfato de magnesio	0,05
Agar	15

pH final: $7,2 \pm 0,2$

7.4 Solución de 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP)

Se empleó reactivo DCPIP (Sigma Aldrich) Se preparó a una concentración de 0,05% en agua destilada estéril, se esterilizó por filtración en membrana de 0,22µm de diámetro de poro y se conservó en frasco ámbar a 4 °C en heladera hasta su utilización.

7.5 Agar nutritivo al 50%

Se utilizó agar nutritivo comercial (Laboratorios Britania S.A., Argentina). Para preparar este medio se pesó el 50% de la cantidad especificada indicada en el rótulo para preparar 1 L, y se completó el otro 50% con agar-agar, quedando su composición de esta forma reducida a la mitad.

7.6 Soluciones para evaluar actividad biológica total (ABT) (Adam y Duncan, 2001)

Buffer fosfato 60mM pH 7,6

8,7 g de K_2HPO_4

1,3 g de KH_2PO_4

Disolver en 1 L de agua destilada y almacenar a 4°C.

Solución de cloroformo/metanol

666 mL de cloroformo

334 mL de metanol

Solución stock de 1000 μg FDA mL^{-1}

Disolver 0,1 g de diacetato de fluoresceína en 100 mL de acetona. Almacenar a -20°C.

Solución stock de 2000 μg fluoresceína mL^{-1}

Disolver 0,2265 g de sales de fluoresceína de sodio (Biopack S.A., Argentina) en 100 mL de buffer fosfatos 60 mM.

Solución standard de 20 μg fluoresceína mL^{-1}

1 mL de la solución stock de 2000 μg de fluoresceína mL^{-1} se colocó en matraz volumétrico de 100 mL y se enrasó con buffer fosfatos 60 mM.

A partir de esta solución standard se prepararon standards de 1 a 5 μg mL^{-1} en buffer fosfatos 60 mM.

7.7 Medios y coloraciones empleados en la caracterización bioquímica y microbiológica

TSI (Triple Sugar Iron Agar, Laboratorios Britania S.A)

Medio empleado para la diferenciación de microorganismos en base a la fermentación de hidratos de carbono como glucosa, lactosa y sacarosa, y a la producción de ácido sulfhídrico. Contiene como indicador de pH el rojo de fenol, el cual vira a amarillo en medio ácido. Cuando se produce ácido sulfhídrico se combina con el sulfato de hierro y amonio y se produce sulfuro de hierro, de color negro.

Interpretación de los resultados:

Observar el color del medio de cultivo y la producción de gas.

- Superficie alcalina/profundidad ácida (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.
- Superficie ácida/profundidad ácida (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.
- Superficie alcalina/profundidad alcalina (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.
- La presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican que el microorganismo produce gas.

Agar Citrato de Simmons (Laboratorios Britania S.A)

Medio utilizado por microorganismos en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía, produciendo alcalinidad en el medio. Contiene azul de bromotimol como indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino.

Interpretación de los resultados:

- Positivo: crecimiento bacteriano con un intenso color azul en el pico de flauta.
- Negativo: ausencia del crecimiento y permanencia del color verde del medio de cultivo.

Prueba de la Oxidasa (Laboratorios Britania S.A)

Permite la detección de la enzima citocromo-c-oxidasa en su cadena respiratoria, que está presente en algunos géneros bacterianos. La prueba se realizó con discos de oxidasa en portaobjetos de la siguiente manera: se humedeció el disco de oxidasa con una gota de agua estéril y se colocó sobre este una colonia del microorganismo en estudio, se incubó durante un minuto a temperatura ambiente. La interpretación se hizo de acuerdo a la observación del color producido:

- Positivo: observación de color rosado a fucsia en el disco y/o solución.

- Negativo: el disco permanece sin cambio de color.

Prueba de movilidad

Esta prueba puede ser realizada en medios semisólidos o líquidos. En el caso de los microorganismos no fermentadores es más útil realizarla en medio líquido con el método de la gota invertida (Koneman y col, 1997). Para esta prueba se siembran los microorganismos a estudiar en un caldo de cultivo enriquecido, que para nuestro caso se usó caldo BHI (caldo cerebro corazón, Laboratorios Britania S.A), y se incubaron por 24h a 25°C. Pasado este tiempo, se tomó una gota del caldo de cada microorganismo y se dispuso en un portaobjetos, luego se invirtió y se observó al microscopio la gota suspendida. Para calificar la movilidad como positiva, se observó que las bacterias tuvieran un movimiento direccional con cambio de dirección, diferenciándolo del movimiento browniano.

Coloración de Gram

Es un tipo de tinción diferencial utilizado para visualizar bacterias. Podemos ver la morfología bacteriana (cocos, bacilos) y nos da una primera aproximación a la diferenciación bacteriana entre gram positivas y gram negativas, diferencia dada por la pared bacteriana y su capacidad de retener el cristal violeta o no. Se utilizan los colorantes cristal violeta, lugol, safranina y una solución de alcohol-acetona como decolorante.

Procedimiento:

1. Realizar una suspensión bacteriana en solución fisiológica, poner una gota en un portaobjetos, dejar secar al aire.
2. Fijar el material pasando el portaobjetos por la llama del mechero tres veces. De esta forma el material no se lava durante el procedimiento de teñido.
3. Cubrir el portaobjetos con cristal violeta durante 1 minuto y lavar con agua.
4. Cubrir con solución de iodo (lugol) durante 1 minuto y lavar con agua.
5. Cubrir con alcohol-acetona hasta que no haya más color violeta y lavar con agua (aproximadamente 10 segundos o menos).
6. Cubrir con safranina, dejar 30 segundos y lavar con agua.
7. Dejar secar el portaobjetos al aire y observar al microscopio con objetivo de 100x.

Interpretación:

Gram positivo: bacterias de color violeta-azul oscuro.

Gram negativo: bacterias de color rosa-rojo.

8 Bibliografía

- Abbasian, F., Lockington, R., Megharaj, M. & Naidu, R. (2015). A Review on the Genetics of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbon Degradation. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 178(2), 224–250.
- Adam, G. & Duncan, H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 33 (7-8), 943-951.
- Alrumman, S. A., Standing, D. B. & Paton, G. I. (2015). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of Saud University*, 27, 31-41.
- Atlas, R. & Bartha, R. (1992). Hydrocarbon Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. *Advances in Microbial Ecology*, 287-338.
- Balba, M., Al-Awadhi, N., & Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 32 (2), 155-164.
- Banitz, T., Johst, K., Wick, L. Y., Schamfuß, S., Harms, H., & Frank, K. (2013). Highways versus pipelines: contributions of two fungal transport mechanisms to efficient bioremediation. *Environmental Microbiology Reports*, 5(2), 211-218
- Benavidez Lopez de Mesa, J., Quintero, G., Guevara Vizcaino, A., Jaimes Cáceres, D., Gutierrez Riaño, S., & Miranda García, J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. *RevistaNOVA*, 4(5), 82-90.
- Blanchette, R. A., Held, B. W., Jurgens, J. A., McNew, D. L., Harrington, T. C., Duncan, S. M., & Farrell, R. L. (2004). Wood-Destroying Soft Rot Fungi in the Historic Expedition Huts of Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), 1328–1335.
- Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74, 63-67.
- Brzeszcz, J., & Kaszycki, P. (2018). Aerobic bacteria degrading both n-alkanes and aromatic hydrocarbons: an undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility. *Biodegradation*, 29 (4), 359–407.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer, & World Health Organization. (2000). *Some industrial chemicals* (Vol. 77). World Health Organization.

- Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., & Sharma, A. (2013). Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of Microbiology*, 63 (2), 417-431.
- Costa, A. S., Romão, L. P. C., Araújo, B. R., Lucas, S. C. O., Maciel, S. T. A., Wisniewski, A., & Alexandre, M. R. (2012). Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresource Technology*, 105, 31-39.
- Del Panno, M. T., Morelli, I. S., Engelen, B., & Berthe-Corti, L. (2005). Effect of petrochemical sludge concentrations on microbial communities during soil bioremediation. *FEMS Microbiology Ecology*, 53 (2), 305-316.
- Deppe, U., Richnow, H.-H., Michaelis, W., & Antranikian, G. (2005). Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium. *Extremophiles*, 9(6), 461-470.
- Diario El Patagónico. (s.f.). www.elpatagonico.com. Recuperado el 10 de Mayo de 2021, de <https://www.elpatagonico.com/derrame-petroleo-a2886>.
- Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., & Johri, A. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 143-152.
- Durán, P., Barra, P. J., Jorquera, M. A., Viscardi, S., Fernandez, C., Paz, C., & Bol, R. (2019). Occurrence of Soil Fungi in Antarctic Pristine Environments. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7,28.
- Environmental Protection Agency. (1978). Method 418.1. Test method for evaluating total recoverable petroleum hydrocarbon (spectrophotometric, infrared).
- Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P., & Seeger, M. (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (11), 4781-4794.
- García, E., Roldán, f., & Garzón, L. (2011). Evaluación de la bioestimulación (nutrientes) en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando respirometría. *Acta biológica Colombiana*, 16(1).
- Gieg, L. M., Fowler, S. J., & Berdugo-Clavijo, C. . (2014). Syntrophic biodegradation of hydrocarbon contaminants. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 21-29.
- Gkorezis, P., Daghighi, M., Franzetti, A., D. Van Hamme, J., Sillen, W., & Vangronsveld, J. (2016). The Interaction between Plants and Bacteria in the Remediation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7:1836.
- Gonçalves, V. N., Vaz, A. B. M., Rosa, C. A., & Rosa, L. H. (2012). Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 82 (2) 459-471.
- Hentati, O., Lachhab, R., Ayadi, M., & Ksibi, M. (2013). Toxicity assessment for petroleum-contaminated soil using terrestrial invertebrates and plant bioassays. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(4), 2989-2998.
- <https://es.climate-data.org/america-del-sur/argentina/tierra-del-fuego/ushuaia-1924/>. (Abril de 2020).

- Instituto Mexicano del Petróleo. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. México, D.F.
- Jeong, S.-W., Jeong, J., & Kim, J. (2015). Simple surface foam application enhances bioremediation of oil-contaminated soil in cold conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 286, 164-170.
- Jiang, Y., Brassington, K. J., Prpich, G., Paton, G. I., Semple, K. T., Pollard, S. J., & Coulon, F. (2016). Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation. *Chemosphere*, 161, 300-307.
- Kaczynska, G., Borowik, A., & Wyszowska, J. (2015). Soil Dehydrogenases as an Indicator of Contamination of the Environment with Petroleum Products. *Water Air Soil Pollut*, 226 (11).
- Koneman, E. w., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., & Winn, W. C. (1997). *Diagnostic Microbiology*. Lippincott.
- Koshlaf, E., & Ball, A. S. (2017). Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiology*, 3(1), 25-49.
- Lim, M. W., Lau, E. V., & Poh, P. E. (2016). A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil. Present works and future directions . *Marine Pollution Bulletin*, 109 (1), 14-45.
- Mair, J., Schinner, F., & Margesin, R. (2013). A feasibility study on the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from an Alpine former military site: effects of temperature and biostimulation. *Cold Regions Science and Technology*, 96, 122-128.
- Maletić, S., Dalmacija, B., & Rončević, S. (2013). Petroleum Hydrocarbon Biodegradability in Soil – Implications for Bioremediation. *Hydrocarbon*, (págs. 43-64).
- Margesin, R., & Schinner, F. (1997). Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 47 (4), 462-468.
- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56 (5-6), 650-663.
- Margesin, R., Zimmerbauer, A., Schinner, F. (2000). Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, 40 (4), 339-346.
- Martínez Álvarez, L.M., Lo Balbo, A., Mac Cormack, W.P., Ruberto, L.A.M. (2015). Bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated Antarctic soil: Optimization of a biostimulation strategy using response-surface methodology (RSM). *Cold Regions Science and Technology*, 119, 61-67.
- Martínez Álvarez, L.M., Ruberto, L.A.M., Lo Balbo, A., Mac Cormack, W.P. (2017). Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils in cold regions: Development of a pre-optimized biostimulation biopile-scale field assay in Antarctica. *Science of the Total Environment*, 590-591, 194-203.

- Martorell, M., Ruberto, L.A.M., Fernández, P., De Figueroa, L., & Mac Cormack, W. (2018). Biodiversity and enzymes bioprospection of Antarctic filamentous fungi. *Antarctic Science*, 1-10.
- Merini L. J., Cuadrado V., Flocco C. G., Giulietti A. M. (2007). Dissipation of 2,4-D in soils of the Humid Pampa region, Argentina: A microcosm study. *Chemosphere* 68 (2), 259-265.
- Ministerio del Interior. (s.f.). www.argentina.gob.ar/interior. Recuperado el 10 de Mayo de 2021, de http://www.mininterior.gov.ar/municipios/gestion/regiones_archivos/Patagonia.pdf
- Miranda, D., & Restrepo, R. (2005). Los derrames de petróleo en ecosistemas tropicales-impactos, consecuencias y prevención. La experiencia de Colombia. *International Oil Spill Conference Proceedings*, 571-575.
- Mulet, M., Lalucat, J., García-Valdéz, E. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1513-1530.
- Ohtsubo, Y., Kishida, K., Sato, T., Tabata, M., Kawasumi, T., Ogura, Y., Nagata, Y. (2014). Complete Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. Strain TKP, Isolated from a γ -gamma-Hexachlorocyclohexane-Degrading Mixed Culture. *Genome Announcements, Journals ASM*, 2(1), e01241-13.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2010). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 92, 1
- Ministerio de Desarrollo Productivo. (Noviembre de 2021). Obtenido de https://www.argentina.gob.ar/eiti/visualizaciones/pruduccion_de_petroleo.
- Rodríguez Andrade, E., Stchingel, A., Mac Cormack, W., Cano-Lira, J. (2017). Cadophora antarctica. *Fungal Planet description sheets: 625-715. Persoonia* (39), 286-287.
- Ruberto, L. A.M., Vazquez, S. C., Mac Cormack, W. P.M. (2008). Bacteriology of Extremely Cold Soils Exposed to Hydrocarbon Pollution. En P. Dion, & C. Shekhar Nautiyal, *Microbiology of Extreme Soils*.247-274.
- Ruberto, L., Cuadrado, V., Merini, L., Rodríguez Talou, J., Lo Balbo, A., Giulietti, A., Mac Cormack, W. (2009). Natural hydrocarbon-biodegradation activity in aged contaminated soils from Neuquén, Argentina. *XLV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular*. Tucumán, Argentina.
- Ruberto, L., Vazquez, S. C., & Mac Cormack, W. P. (2003). Effectiveness of the natural bacterial fora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52 (2), 115-125.
- Ruberto, L.A. M., Vazquez, 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.
- Sakshi, & Haritash, A. K. (2020). A comprehensive review of metabolic and genomic aspects of PAH-degradation. *Archives of Microbiology*, 202, 2033-2058.

- Salleh, A. B., Ghazali, F. M., Zaliha, R. N., Rahman, A., Basri, M. (2003). Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Pollution. *Indian Journal of Biotechnology*, 2, 411-425.
- Srivastava, M., Srivastava, A., Yadav, A., Rawat, V. (2019). Source and Control of Hydrocarbon Pollution. *Hydrocarbon Pollution and its Effect on Environment*. IntechOpen.
- Travadon, R., Lawrence, D. P., Rooney-Latham, S., Gubler, W.D., Wilcox, W.F., Rolshausen, P.E., Baumgartner, K. (2015). Cadophora species associated with wood-decay of grapevine in North America. *Fungal Biology*, 119 (1), 53-66.
- Truskewycz, A., Gundry, T. D., Khudur, L. S., Kolobaric, A., Taha, M., Aburto-Medina, A., Shahsavari, E. (2019). Petroleum Hydrocarbon Contamination in Terrestrial Ecosystems—Fate and Microbial Responses. *Molecules*, 24 (18), 3400.
- United States Environmental Protection Agency. (1986). Petroleum hydrocarbon, total recoverable. Spectrophotometric infrared. Washington, DC: Government Printing Office.
- Vallejo, V., Salgado, L., & Roldan, F. (2005). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, VII(2), 67-78.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., Ward, O. P. (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 503-549.
- Van Meter, R. J., Spotila, J. R., Avery, H. W. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons affect survival and development of common snapping turtle (*Chelydra serpentina*) embryos and hatchlings. *Environmental Pollution*, 142(3), 466-475.
- Varjani Sunita, J., Rana Dolly, P., Bateja, S., Upasani Vivek, N. (2013). Isolation and Screening for Hydrocarbon Utilizing Bacteria (HUB) from Petroleum Samples. *International Journal of current Microbiology and Applied Sciences*, 2(4), 48-60.
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277-286.
- Varjani, S. J., Upasani, V. N. (2013). Comparative Studies on Bacterial Consortia for Hydrocarbon Degradation. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 2(10), 5377-5383.
- Varjani, S. J., Rana, D. P., Jain, A. K., Bateja, S., Upasani, V. N. (2015). Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 116-124.
- Vásquez-Ponce, F., Higuera-Llantén, S., Pavlov, M. S., Marshall, S. H., Olivares-Pacheco, J. (2018). Phylogenetic MLSA and phenotypic analysis identification of three probable novel *Pseudomonas* species isolated on King George Island, South Shetland, Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 695–702.

- Vieira, G., Purić, J., Morão, L.G., dos Santos, J.A., Inforsato, F.J, Sette, L., D., Sass, D. C. (2018). Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Letter in Applied Microbiology*, 67(1), 64-71.
- Walker, C., Sibly, R., Hopkin, S., Peakall, D. (2001). Major classes of pollutant. En *Principles of Ecotoxicology*. (Cuarta ed.). Taylor & Francis Group.
- Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 237-241.
- Widdel, F., & Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 259-276.
- Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Yu, H. (2018). Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. *Frontiers in Microbiolohy*, 9: 2885.
- Zawierucha, I., & Malina, G. (2011). Bioremediation of Contaminated Soils: Effects of Bioaugmentation and Biostimulation on Enhancing Biodegradation of Oil Hydrocarbons. *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol*. 187-201. Springer.
- Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W. (1987). Salmonella Mutagenicity Tests: III. Results From the Testing of 255 Chemicals. *Environmental Mutagenesis*, 9 (S9), 1-60.