



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Departamento de Microbiología, Inmunología, Biotecnología y  
Genética

Cátedra de Biotecnología, Instituto NANOBIOTEC

Tesis Doctoral

**Desarrollo y optimización de un proceso secuencial de  
biorremediación de suelos antárticos contaminados  
con hidrocarburos. Caracterización de la flora  
microbiana involucrada y de los contaminantes**

Autor: Lucas Manuel Martínez Álvarez

**Director: Dr. Walter Mac Cormack**  
**Director Adjunto: Dr. Lucas Ruberto**

**2017**

A mis padres, por dedicar toda su vida a darme las herramientas

A Maricel, por su fuerza y amor

A Gaby, Tere y mi abuela

## **Agradecimientos**

Al Dr. Walter Patricio Mac Cormack por su confianza, su compromiso, su dedicación y su ejemplo permanente.

Al Dr. Lucas Ruberto por enseñarme prácticamente todo lo que sé en este tema y por tantos momentos vividos lejos de casa.

A mis compañeros de Microbiología Antártica (Edy, Susana, Silvia, José Luis, Martha, Julia y Déborah) por su compañía diaria y su colaboración en mi formación durante todos estos años, acá y en Carlini.

A los colegas de la Cátedra de Biotecnología y del Instituto Antártico Argentino por hacer de cada día un buen día de trabajo.

A la Universidad de Buenos Aires por brindarme una educación prestigiosa, pública y de libre acceso.

A las dotaciones militares y científicas de la Base Carlini por el apoyo brindado en los veranos entre el año 2013 y el año 2017.

A mi abuelo, por inculcarme siempre esa vocación por preguntarse y querer saber.

A Juan, por su amistad para soportarme tantos años y compartir tantos buenos momentos.

A Martha por su amistad, consejo y paciencia.

A Edu por tantos almuerzos en la parrilla, bancarse que anticipe todos los chistes de Les Luthiers y ser el mejor compañero de habitación que uno puede pedir estando lejos.

Al Dr. Henk Bolhuis y el Tec. Michelle Grego por su ayuda, colaboración y amistad durante mi estadía en NIOZ (Países Bajos).

A todos aquellos con los que compartí momentos que generaron un buen recuerdo durante estos años.

Partes del presente trabajo de tesis han sido publicados bajo los siguientes títulos:

**Martínez Álvarez LM**, Ruberto LAM, Levin G, Hernández E, Vázquez S, Mac Cormack W (2011) "Hongos microtolerantes en suelos antárticos contaminados con hidrocarburos. Identificación y análisis de su posible aplicación biotecnológica". *VI Simposio Latinoamericano sobre Investigaciones Antárticas*, Lima, Perú, Octubre de 2011.

Nizovoy P, Ruberto LAM, **Martínez Álvarez LM**, Dias R, Coria S, Hernández E, Vázquez S, Mac Cormack W (2011) "Evaluación del potencial de biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos utilizando un modelo de asociación bacterias microtolerantes-planta". *VI Simposio Latinoamericano sobre Investigaciones Antárticas*, Lima, Perú, Octubre de 2011

**Martínez Álvarez LM**, Ruberto LAM, Vázquez S, Coria S, Hernández E, Dias R, Mac Cormack W (2013) "Looking for microorganisms with biotechnological potential from an Antarctic hydrocarbon-contaminated soil". *VII Congreso Latinoamericano de Ciencias Antárticas*, La Serena, Chile, Septiembre de 2013.

**Martínez Álvarez LM**, Ruberto LAM, Lo Balbo A, Hernández E, Coria S, Dias R, Vázquez S, Mac Cormack W (2013) "Biorremediación de un suelo antártico contaminado con hidrocarburos: Optimización de una estrategia de bioestimulación por la metodología de Superficie de Respuesta (RSM)". *XIII Congreso Argentino de Microbiología*, Buenos Aires, Argentina, Septiembre de 2013.

Hernández E, **Martínez Álvarez LM**, Nizovoy P, Coria S, Vázquez S, Ruberto LAM, Dias R, Mac Cormack W (2013) "Cambios en la proporción de bacterias marinas antárticas pigmentadas en la columna de agua y su relación con la radiación solar ultravioleta". *XIII Congreso Argentino de Microbiología*, Buenos Aires, Argentina, Septiembre de 2013.

**Martínez Álvarez LM**, Ruberto LAM, Nizovoy P, Hernández E, Coria S, Vázquez S, Mac Cormack W (2014) "Bioremediation of hydrocarbon-contaminated Antarctic soil: Optimization y biopile-scale field assay". *50 Edición Congreso de la Sociedad Argentina de Bioquímica y Biología molecular (SAIB)*, Rosario, Santa Fe, Noviembre de 2014.

Kuc V, Hernández E, Vázquez S, **Martínez Álvarez LM**, Coria S, Mac Cormack W, Ruberto LAM (2015) "Dinámica de la estructura de la comunidad bacteriana degradadora de hidrocarburos en cultivos de enriquecimiento con suelos antárticos contaminados con Gasoil". *VIII Congreso Latinoamericano de Ciencias Antárticas*, Montevideo, Uruguay, Octubre de 2015.

**Martínez Álvarez LM**, Ruberto LAM, Mac Cormack W (2015) "Efecto de la concentración inicial de contaminante sobre la eficiencia de remoción de hidrocarburos en un proceso de bioestimulación en biopilas de suelos antárticos". *VIII Congreso Latinoamericano de Ciencias Antárticas*, Montevideo, Uruguay, Octubre de 2015.

**Martínez Álvarez LM**, Lo Balbo A, Mac Cormack WP, Ruberto LAM (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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coldregions.2015.07.005>

**Martínez Álvarez LM, Gurevich Messina JM, Mac Cormack W, Ruberto LAM (2016)** "Hydrocarbon-contaminated soil bioremediation in Antarctica: Effectiveness of two consecutive year's field assays in Carlini Station (Arg)". *XXXIV Scientific Committee on Antarctic Research, SCAR Open Science Conference, Kuala Lumpur, Malaysia, Agosto de 2016*

**Martínez Álvarez LM (2016)** "Desarrollo de un proceso integral para la biorremediación de suelo antártico contaminado con hidrocarburos". Exposición oral en la Mesa Redonda N°1 de Microbiología polar, *Congreso Argentino y Latinoamericano de microbiología, Rosario, 2016.*

**Martínez Álvarez LM, Bolhuis H, Ruberto LAM, Mac Cormack WP (2017)** Cambios en la diversidad microbiana asociada a procesos de biorremediación por biopilas de suelos antárticos contaminados con hidrocarburos en la Base Carlini (Arg). *IX Congreso Latinoamericano de Ciencias Antárticas, Punta Arenas, Chile.*

**Martínez Álvarez LM, Ruberto LAM, Lo Balbo A, Mac Cormack WP (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*

# Índice

## Contenido

1.	Introducción general .....	1
1.1.	Contaminación por hidrocarburos .....	2
1.2.	Contaminación en Antártida .....	4
1.3.	Hidrocarburos derivados del petróleo .....	8
1.4.	Los suelos .....	10
1.5.	Técnicas de remediación de hidrocarburos en suelos .....	14
1.5.1.	Barreras inertes .....	15
1.5.2.	Barreras permeables reactivas .....	15
1.5.3.	Desorción térmica .....	16
1.5.4.	Lavado de suelos .....	16
1.5.5.	Aireación .....	17
1.5.6.	Arrastre con aire o vapor (Air sparging) .....	17
1.5.7.	Extracción por vacío (Bioslurping) .....	18
1.5.8.	Oxidación química .....	18
1.5.9.	Limpieza electrocinética .....	19
1.5.10.	Incineración .....	19
1.6.	Biorremediación .....	20
1.7.	Estrategias de biorremediación .....	22
1.7.1.	Bioestimulación .....	22
1.7.2.	Bioaumento .....	23
1.7.3.	Agregado de surfactantes .....	23
1.8.	Biorremediación a campo .....	24
1.8.1.	Landfarming .....	25
1.8.2.	Biopilas .....	26
1.9.	Biorremediación en regiones polares. Antecedentes .....	28
1.10.	Diversidad microbiana en suelos antárticos .....	30
2.	Hipótesis y objetivos .....	32
2.1.	Hipótesis .....	33
2.2.	Objetivos .....	33

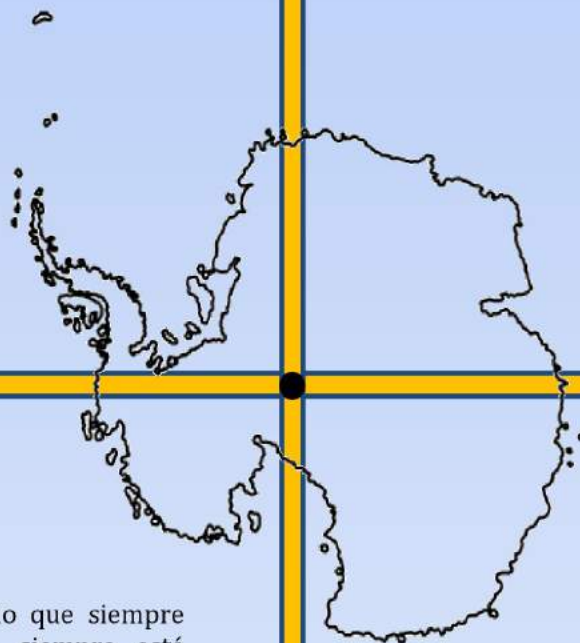
3. Optimización de la estrategia de bioestimulación usando la Metodología de Superficie de Respuesta .....	35
3.1. Introducción .....	36
3.1.1. Variables ambientales y su relevancia en procesos de biorremediación .....	36
3.1.2. Diseño experimental estadístico .....	37
3.1.3. ¿Cómo optimizar? .....	38
3.1.4. Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) .....	40
3.1.4.1. Generalidades.....	40
3.1.4.2. Codificación de variables.....	44
3.1.5. Optimización de N y P .....	46
3.2. Materiales y métodos.....	47
3.2.1. Análisis y caracterización del suelo .....	47
3.2.2. Diseño de microcosmos .....	48
3.2.3. Actividad biológica .....	49
3.2.4. Extracción y cuantificación de hidrocarburos .....	50
3.2.5. Análisis estadístico .....	51
3.3. Resultados .....	53
3.3.1. Análisis de suelo .....	53
3.3.2. Análisis estadístico .....	53
3.3.3. Concentración de hidrocarburos.....	56
3.3.4. Actividad biológica .....	58
3.3.5. Método de Superficie de Respuesta .....	60
3.4. Discusión .....	62
3.1. Conclusión .....	66
4. Aplicación de la bioestimulación pre-optimizada: Primer ensayo a campo mediante la conformación de biopilas .....	67
4.1. Introducción .....	68
4.2. Materiales y métodos.....	69
4.2.1. Análisis del suelo y caracterización .....	69
4.2.2. Diseño de las biopilas .....	69
4.2.3. Adición de nutrientes .....	71
4.2.4. Actividad biológica .....	72
4.2.5. Análisis de hidrocarburos .....	73
4.3. Resultados .....	74
4.3.1. Actividad biológica .....	74

4.3.2.	Recuentos bacterianos .....	75
4.3.3.	Seguimiento de las propiedades físicas.....	77
4.3.3.1.	Análisis del suelo .....	77
4.3.3.2.	Conductividad.....	77
4.3.3.3.	Temperatura.....	78
4.3.3.4.	Contenido de hidrocarburos .....	80
4.4.	Discusión .....	82
4.5.	Conclusión .....	88
5.	Segundo ensayo a campo con biopilas: Comparación de la eficiencia e identificación de variables clave.....	89
5.1.	Introducción .....	90
5.2.	Materiales y métodos.....	91
5.2.1.	Análisis del suelo y caracterización .....	91
5.2.2.	Diseño de biopilas y determinaciones.....	91
5.2.3.	Ensayo en mesocosmos.....	92
5.2.4.	Variables ambientales .....	93
5.2.5.	Análisis estadístico .....	94
5.3.	Resultados .....	95
5.3.1.	Actividad biológica .....	95
5.3.2.	Recuentos bacterianos .....	96
5.3.3.	Seguimiento de las propiedades físicas.....	98
5.3.3.1.	Conductividad.....	98
5.3.3.2.	Temperatura.....	100
5.3.3.3.	Degradación de hidrocarburos.....	106
5.3.4.	Análisis de variables influyentes.....	106
5.3.4.1.	Variables ambientales .....	106
5.3.4.2.	Concentración inicial del contaminante.....	111
5.4.	Discusión .....	113
5.5.	Conclusión .....	116
6.	Diversidad microbiana en suelos antárticos contaminados con gasoil.....	118
6.1.	Parte I: Aislamiento y caracterización de cepas microbianas sicrofilas degradadoras de hidrocarburos .....	119
6.1.1.	Introducción .....	119
6.1.2.	Materiales y métodos.....	121
6.1.2.1.	Obtención de las cepas.....	121



6.1.2.2.	Extracción de ADN, amplificación por PCR e identificación .....	121
6.1.2.3.	Selección y testeo de cepas con potencial biotecnológico .....	123
6.1.3.	Resultados .....	124
6.1.3.1.	Identificación de las cepas aisladas .....	124
6.1.3.2.	Evaluación del potencial biotecnológico .....	124
6.1.4.	Discusión.....	131
6.2.	Parte II. Cambios en la comunidad bacteriana durante los procesos de biorremediación a campo... ..	134
6.2.1.	Introducción .....	134
6.2.2.	Materiales y métodos.....	134
6.2.2.1.	Construcción de la biblioteca de amplicones 16S rRNA.....	134
6.2.2.2.	Normalización de la biblioteca de amplicones del 16S, pooling, desnaturalización y carga de muestra en MiSeq.....	137
6.2.2.3.	Secuenciación de los amplicones de 16S rRNA .....	138
6.2.2.4.	Procesamiento de las secuencias obtenidas .....	138
6.2.3.	Resultados .....	139
6.2.4.	Discusión.....	148
6.3.	Conclusión .....	151
7.	Resumen.....	152
7.1.	Resumen.....	153
8.	Conclusiones generales .....	156
8.1.	Conclusiones generales .....	157
9.	Bibliografía.....	159

# 1. Introducción general



“Es necesario diferenciar las cosas: lo que siempre existe sin haber nacido, y lo que siempre está comenzando sin jamás llegar a ser ”

*Platón*

### **1.1. Contaminación por hidrocarburos**

El desarrollo social, tecnológico e industrial demanda incesantemente cantidades crecientes de energía. Pese al reciente incremento en el uso de fuentes alternativas, actualmente entre el 81 y el 86% de la energía mundial proviene del petróleo y sus derivados (gasoil, nafta, gas, kerosene, etc). Se calcula que en el mundo se consumen aproximadamente 90 millones de barriles de petróleo por día (CIA, 2006). Considerando que cada barril contiene 159 litros, esto representa un manejo diario de más de 14 mil millones de litros de combustibles alrededor del mundo. Semejante logística da lugar a malos manejos, negligencias o accidentes que contaminan los diferentes ambientes naturales de nuestro planeta (suelo, mar, aire, sedimentos).

La percepción del medio ambiente como algo que es necesario preservar es particularmente reciente en la sociedad. Sin embargo, pese a la mayor conciencia respecto a su cuidado, el daño ya causado, conocido como pasivos ambientales, es muchas veces irreversible. Además, los hábitos arraigados que no contemplan la conservación de los ambientes habitados por el hombre siguen, en muchos casos, vigentes.

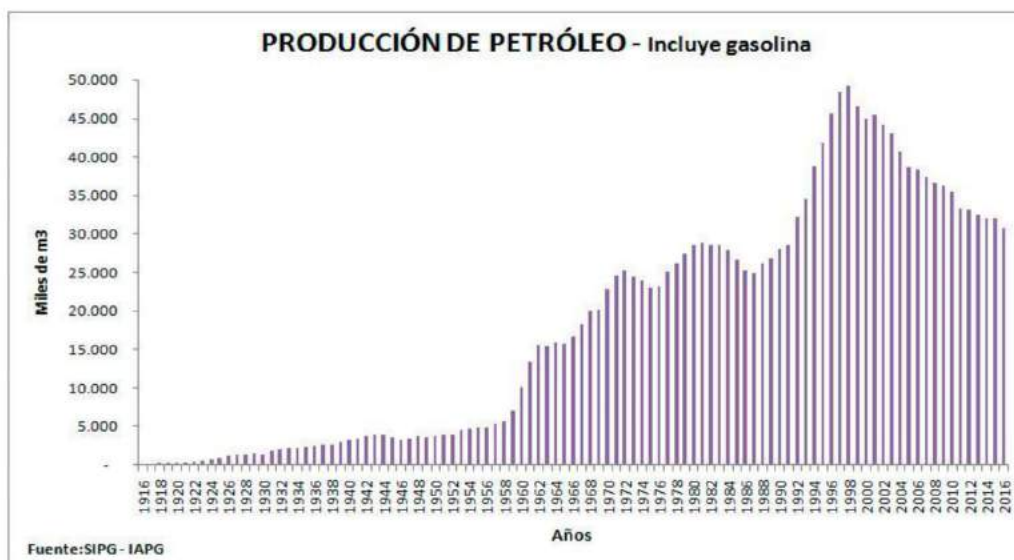
Es por ello que el mantenimiento de ecosistemas prístinos, la recuperación de aquellos ambientes contaminados y la búsqueda de fuentes de energías renovables o menos contaminantes que aquellas dependientes de derivados del petróleo, se destacan entre las prioridades de los estados, las organizaciones intergubernamentales y las empresas a nivel mundial.

Dentro de los contaminantes más ampliamente distribuidos a nivel mundial, los hidrocarburos del petróleo son definitivamente los más ubicuos en aguas y suelos del planeta. Las zonas de explotación y distribución de estos compuestos son las más afectadas por esta problemática. Refiriéndose particularmente a los suelos, los polos petroquímicos y las áreas circundantes a yacimientos petrolíferos suelen presentar altos niveles de contaminación. En particular en nuestro país, los polos petroquímicos de Ensenada, Bahía Blanca y Plaza Huincul y las áreas de explotación de la Patagonia (Caleta Olivia, Las Heras, Plaza Huincul, Loma de la Lata, Centenario) son las más impactadas por esta contaminación. Si bien menos conocidas, las actividades extractivas de petróleo también se dan, y afectan, a distintas áreas del noroeste argentino (Salta y Formosa).

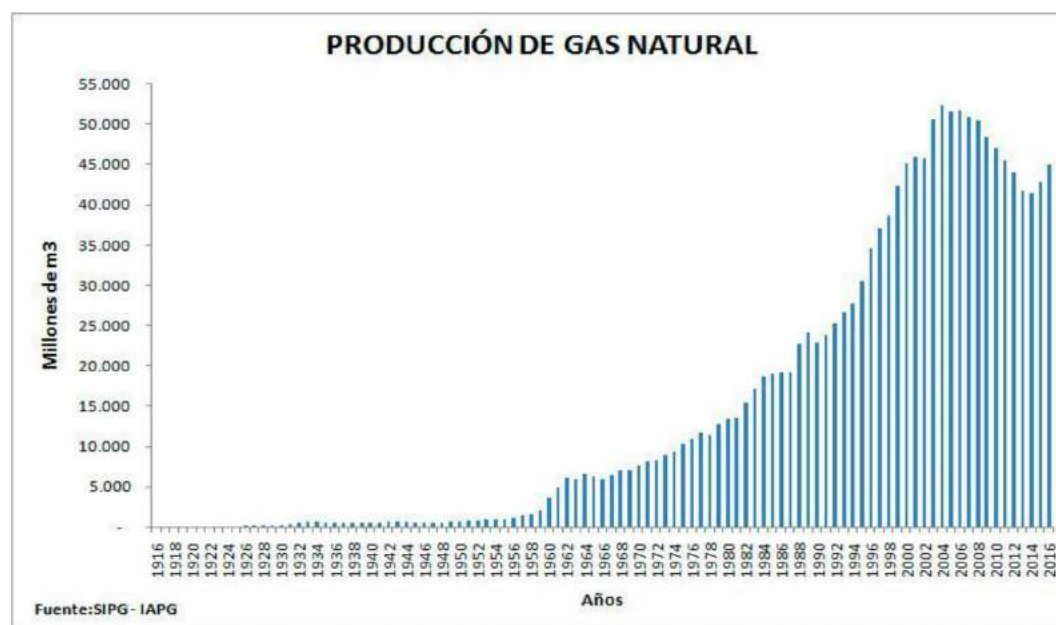
Cabe destacar que en el origen de la explotación hidrocarburífera y en la mayor parte del siglo XX, no se tenía ningún tipo de contemplación sobre el cuidado del medio ambiente. Afortunadamente, en la actualidad, la mayoría de las zonas productoras están enmarcadas en una legislación nacional y/o provincial que contempla el cuidado del medio ambiente circundante a las áreas de producción (en Neuquén Ley Provincial N°1875, Ley Provincial N°2666, en Chubut Ley XI N°35-DR N°1456/11; en Santa Cruz Ley 2567-DR N°712/02, todas

enmarcadas dentro de las Leyes nacionales N° 24.051 y N° 25.612). Dicha legislación establece que las empresas son responsables de la generación de residuos peligrosos “desde el origen hasta la tumba”, así como también establece valores máximos de concentración en suelo de distintos componentes presentes en los hidrocarburos (HTP, BTEX, HAP’s, etc).

Sin embargo, el aumento exponencial de la producción de petróleo y gas en las últimas décadas (Figura 1.1 y 1.2) determina que el problema ambiental se torne potencialmente aún más grave. A fecha de Diciembre de 2016, se encontraban en nuestro país más de 7.300 cuencas productivas, sumado a los casi 60 equipos en perforación (Instituto Argentino del Petróleo y el Gas) y al incipiente desarrollo del yacimiento de Vaca Muerta en la cuenca Neuquina, para el cual se estima una producción de 27 mil millones de barriles (Energy Information Administration, US), el cual multiplicaría por 10 las reservas de Argentina, colocando al país como segunda reserva mundial de gas de esquisto (o *shale gas*). Este vertiginoso aumento en la producción y explotación representa a su vez un inminente aumento en el pasivo ambiental, así como en los riesgos de accidentes y derrames.



**Figura 1.1.** Producción de petróleo (en miles de m³) en la República Argentina desde 1916 a la actualidad.



**Figura 1.2.** Producción de gas natural (en millones de m<sup>3</sup>) en la República Argentina desde 1916 a la actualidad.

### 1.2. Contaminación en Antártida

La Antártida es el continente más austral y aislado del Planeta. También es el más frío, seco y ventoso y con la mayor altura media de la Tierra. El continente es básicamente un desierto, con un promedio de precipitaciones menor a 200 mm anuales en las zonas costeras, y aún menor tierra adentro. En este continente se registró la menor temperatura de la historia del planeta en agosto de 2010, llegando a -93.2 °C en una zona encontrada entre Dome Argus y Dome Fuji, a una altitud de 3.900 m de altura (81.8°S 59.3°E). La temperatura promedio durante el invierno ronda los 63°C bajo cero y solo el 0,36% de su superficie (45.000 km<sup>2</sup>) se encuentra libre de hielo. Además, el punto más cercano con otro continente se encuentra a no menos de 1.000 km de distancia (Ushuaia, Arg.).

Como se mencionó anteriormente, la contaminación por hidrocarburos afecta suelos y aguas en todo el mundo. Lamentablemente, el continente antártico y las islas sub-antárticas no se encuentran exentos de esta problemática. Allí, las zonas en donde se emplazan las bases científicas (en su mayoría en áreas costeras libres de hielo) están particularmente expuestas a un alto riesgo de contaminación por combustibles derivados del petróleo (Aislabe y col., 2006; Vázquez y col., 2009; De Jesus y col., 2015).

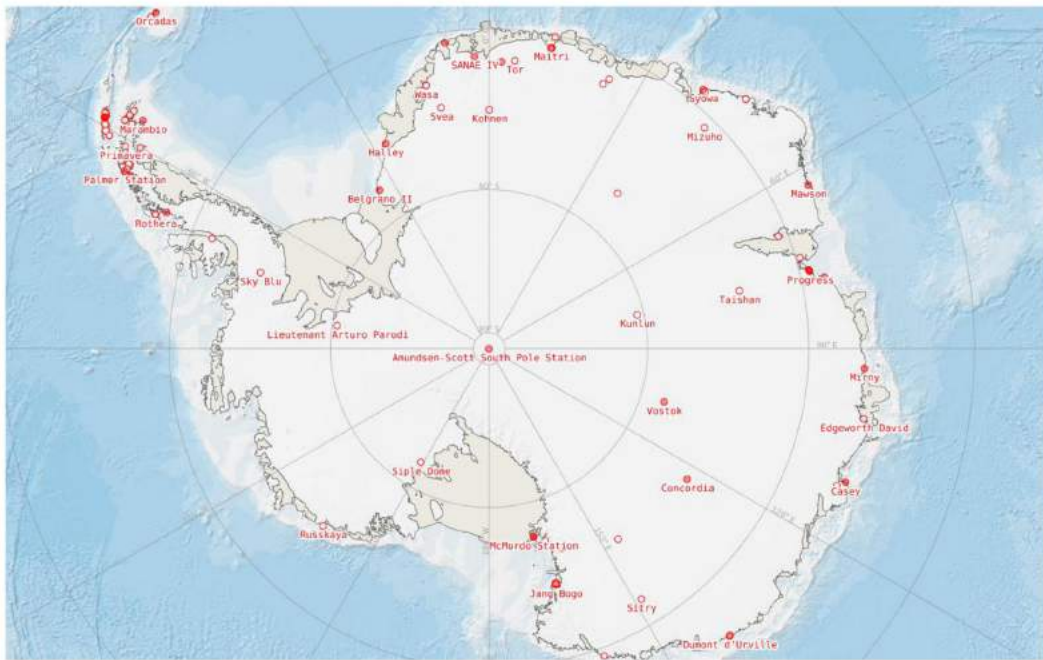


Figura 1.3. Mapa de Antártida, incluyendo las bases allí situadas. Fuente: SCAR Antarctic Digital Database.

• Bases permanentes. ○ Bases temporales.

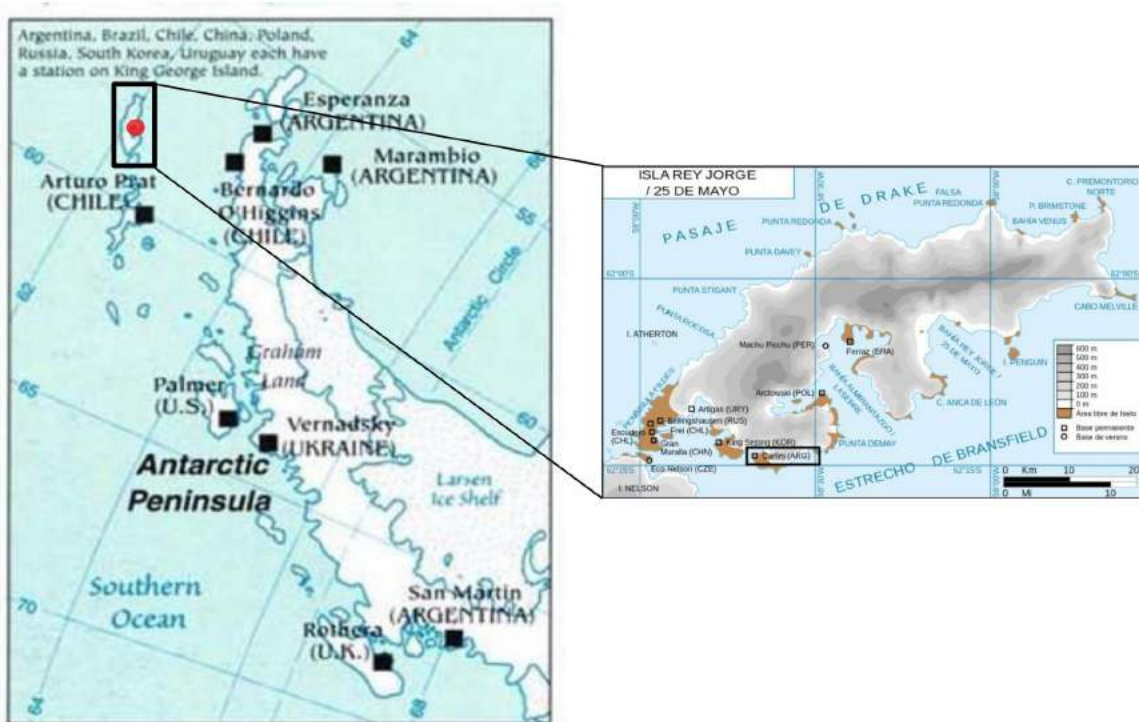


Figura 1.4. Península Antártica, incluyendo las bases allí situadas y el detalle de la Isla 25 de Mayo, sitio de la Base Carlini. Fuente: SCAR Antarctic Digital Database. (●) Base Carlini

Actualmente se encuentran en Antártida 40 bases permanentes y 42 bases de verano. De esas 82 bases, 13 corresponden a la República Argentina: 6 permanentes (Orcadas, Carlini, Esperanza, Marambio, San Martín, y Belgrano II) y 7 transitorias o de verano (Cámara, Decepción, Primavera, Petrel, Melchior Brown y Matienzo). Todas ellas utilizan casi únicamente Gas Oil Antártico (GOA) para la generación de calor y electricidad, así como también para el movimiento de vehículos. Otro tipo de combustible, el Jet Propellant (JP), es a su vez frecuentemente utilizado en dichas bases como combustible de aviones y helicópteros usados para transporte de personal, víveres y equipamiento. Para su utilización en un ambiente tan remoto, estos combustibles deben ser transportados hasta allí y almacenados bajo condiciones ambientales y meteorológicas muy rigurosas (Figuras 1.5 y 1.6), y muchas veces en un contexto logístico que no es el ideal para su manejo. En consecuencia, ese transporte y almacenamiento lleva muchas veces a la generación de pequeños o medianos eventos de contaminación que implican un peligro y daño concreto para el ecosistema antártico. Dado que la mayoría de las bases antárticas previamente mencionadas se ubican en zonas costeras libres de hielo, los suelos en estos sitios pueden ocasionalmente verse impactados por estos contaminantes.



**Figura 1.5.** Tanques de almacenamiento de gasoil (20.000 l) en la base Carlini, expuestos a rigurosas condiciones meteorológicas.



**Figura 1.6.** Tambores de 200 l conteniendo GOA, nafta y JP1 en Base Marambio, expuestos a -50 °C.

Tanto la descarga y aprovisionamiento de combustible, como su manipulación y utilización en bases antárticas, pueden producir (y producen) derrames que contaminen de manera crónica los suelos y aguas costeras, impactando negativamente sobre el medio ambiente. Numerosos casos de este tipo han sido reportados en bases antárticas de muchos países a lo largo de los años (Snape y col., 2006; Ferguson y col., 2008; Ruberto y col., 2009; Schafer y col., 2009; Raymond y col., 2017).

Sin embargo, también pueden ocurrir eventos de contaminación de gran magnitud en el continente antártico. A modo de ejemplo se puede mencionar el hundimiento del buque polar argentino “ARA Bahía Paraíso”, en enero de 1989 tras chocar con una roca frente a la base estadounidense Palmer, en la isla Anvers del archipiélago Palmer. Este evento produjo el derrame de 600.000 litros de combustible al mar, cubriendo una superficie de 100 km<sup>2</sup>, y representa sin dudas uno de los eventos de contaminación más masivos en el continente antártico. Por otro lado, el marcado aumento que se está registrando en el desarrollo de actividades turísticas en Antártida a partir de la mayor cantidad de cruceros disponibles, representa otro potencial riesgo medio ambiental, ya que varios accidentes han ocurrido con este tipo de actividad, como el hundimiento del buque turístico “MS Explorer” ocurrido en noviembre de 2007 en el estrecho de Bransfield (Figura 1.7). Este buque fue el primer crucero diseñado expresamente para navegar por aguas heladas de Antártida, y el primero en hundirse en ese continente, liberando al océano antártico aproximadamente 185 m<sup>3</sup> de gasoil marítimo, 24 m<sup>3</sup> de aceite lubricante y 1,2 m<sup>3</sup> de petróleo (ATCM 2008).





**Figura 1.7.** El accidente del transporte polar *Bahía Paraíso* en 1989 y del *MS Explorer* en 2007 son dos de los accidentes navales más importantes ocurridos en Antártida.

Debido a las razones mencionadas anteriormente, y según el Protocolo de protección del medio ambiente antártico firmado en Madrid (1991): “...se establece la protección del medio ambiente antártico y los ecosistemas dependientes y asociados, así como del valor intrínseco de la Antártica, incluyendo sus valores de vida silvestre y estéticos y su valor como área para la realización de investigaciones científicas, en especial las esenciales para la comprensión del medio ambiente global, deberán ser consideraciones fundamentales para la planificación y realización de todas las actividades que se desarrollen en el área del Tratado Antártico...”. Refiriéndose de manera más específica a la problemática de la contaminación por hidrocarburos, durante la 3ra reunión consultiva del Tratado Antártico realizada en 1964 en Bruselas se estableció “...la urgencia para encontrar una solución a la problemática de la contaminación por hidrocarburos en el Océano Antártico y sus alrededores, en busca de prevenir un daño mayor a la vida salvaje en el área concerniente al Tratado Antártico...” (ATCM 1964).

Este protocolo fue firmado por todos los estados que son parte del Tratado Antártico, por el cual se comprometieron a buscar estrategias para la recuperación de suelos y aguas contaminadas, así como también a mitigar los impactos antrópicos sobre los ecosistemas antárticos. Debido a las características mencionadas que presenta este continente, el desarrollo de dichas estrategias representa un importante desafío científico, de infraestructura y de logística.

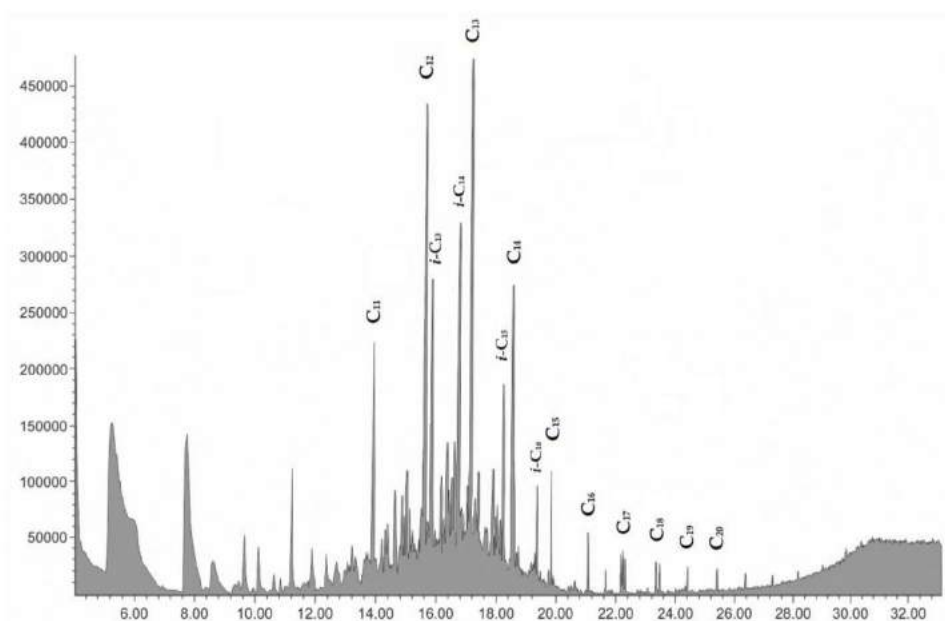
### **1.3. Hidrocarburos derivados del petróleo**

Los hidrocarburos se definen como compuestos orgánicos formados principalmente por átomos de carbono e hidrógeno, pudiendo tener trazas de azufre, nitrógeno y oxígeno. De acuerdo a su estructura química, pueden clasificarse en **alifáticos** (cadenas carbonadas

abiertas), **cíclicos** (cadenas carbonadas cerradas, que forman un ciclo) y **aromáticos** (cadenas cerradas que presentan aromaticidad por la presencia de dobles enlaces resonantes en su estructura). Entre ellos, los compuestos alifáticos son los más ampliamente distribuidos a nivel mundial ya que son la base mayoritaria de los combustibles utilizados habitualmente (diésel, kerosene, nafta). Por ende, también son los más relevantes respecto a la contaminación que generan, dados los grandes volúmenes en que son transportados y almacenados, aumentando la probabilidad de eventos de derrame, y su masividad.

En relación a los combustibles, el gasoil (principal combustible utilizado en la logística antártica) es definido como una mezcla compleja de hidrocarburos producida por la destilación del petróleo crudo. Contiene hidrocarburos lineales que van predominantemente desde el  $C_9$  hasta el  $C_{20}$ , con una temperatura de ebullición que se encuentra entre los 163 y 357 °C (EPA, TSCA). Una definición europea (CONCAWE, 1985) extiende ese rango hasta el  $C_{28}$  y una temperatura de ebullición de 390 °C. Además, el gasoil es considerablemente menos volátil y posee una mayor densidad que la nafta o gasolina, por lo cual provee de una mayor capacidad energética por unidad de volumen.

Es importante destacar que en locaciones de clima frío, como la Antártida, el gasoil se encuentra enriquecido en cadenas alifáticas más cortas, o incluso adicionado con kerosene u otros compuestos anticongelantes, de manera de evitar que la exposición a muy bajas temperaturas ocasione la solidificación del mismo o de parte de sus componentes. Es por eso, que en general el GOA presenta un patrón cromatográfico con preponderancia de los compuestos entre  $C_9$  y  $C_{15}$ , y bajos aportes de los compuestos  $>C_{16}$  (Figura 1.8).



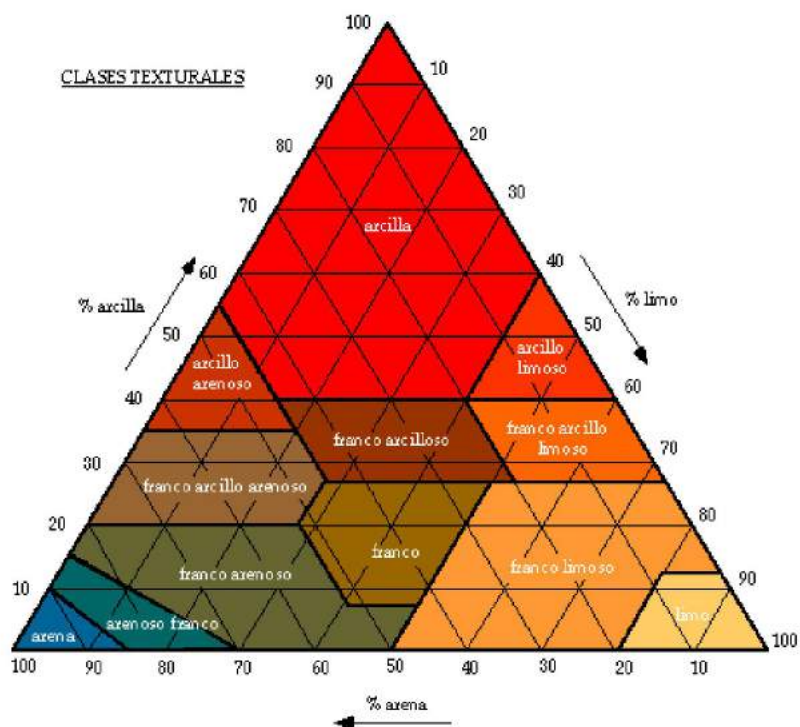
**Figura 1.8.** Cromatograma de gasoil obtenido por GC-FID. Se identifican los compuestos de cadena mediana ( $C_n$ ), así como algunos isoprenos ( $iC_n$ ).

#### 1.4. Los suelos

Según la Food y Agriculture Organization (FAO) de las Naciones Unidas, se define como suelo al medio natural para el crecimiento de las plantas. En un sentido más fisicoquímico, también lo define como la parte superficial de la corteza terrestre que es biológicamente activa y que proviene de la desintegración de rocas y de los residuos generados por todos los seres vivos que sobre ella habitan. Se encuentra dividido en capas (horizontes) compuestas de distintos materiales de origen mineral, materia orgánica y poros rellenos de aire o agua. El suelo es el producto del clima, el tiempo y la topografía que producen diferentes texturas, consistencias, colores y propiedades físicas, químicas y biológicas a partir de los cuales son clasificados y caracterizados.

Las partículas componentes del suelo se distribuyen en un continuo de tamaños, agrupándose en distintas fracciones. Estas agrupaciones son las que originan la clasificación que se realiza de los suelos de acuerdo al tamaño de sus partículas. La primera distinción que se realiza para este propósito, es definir que aquellas partículas mayores a 2 mm (grava, piedras) no se incluyen en la clasificación del suelo, sino que se consideran como el "esqueleto" del mismo. En cambio, las partículas menores a 2 mm se dividen a su vez en 3 categorías (Figura 1.9): **arena**, la cual comprende a aquellas partículas de suelo tamizado de entre 2 mm y 50  $\mu\text{m}$ ; **limo** entre 50 y 2  $\mu\text{m}$  y **arcilla** menor a 2  $\mu\text{m}$ . Tanto las arcillas como los limos se determinan indirectamente mediante la velocidad de sedimentación en agua.

Los primeros estudios realizados sobre suelos antárticos datan de 1916 (Jensen, 1916) en los cuales se analizaron las muestras colectadas en las expediciones realizadas por Shackleton entre 1907 y 1909. Desde entonces, y por más de 100 años se han analizado muestras de suelos del continente blanco (McCraw, 1960; McCraw, 1967; Bockheim, 1982; Soil Survey Staff, 1999; IUSS, 2007). Las características de estos suelos son muy particulares, debido a las condiciones climáticas del continente, la existencia y extensión de la capa de permafrost (capa de suelo permanentemente congelado, pero no permanentemente cubierto de hielo o nieve), la disponibilidad de agua en el suelo y la presencia de plantas vasculares. Además, dichas características también son dependientes de la región que se considere, ya que a modo de ejemplo, los suelos ornitogénicos presentan características muy distintivas debido al impacto biológico que genera la fauna local.



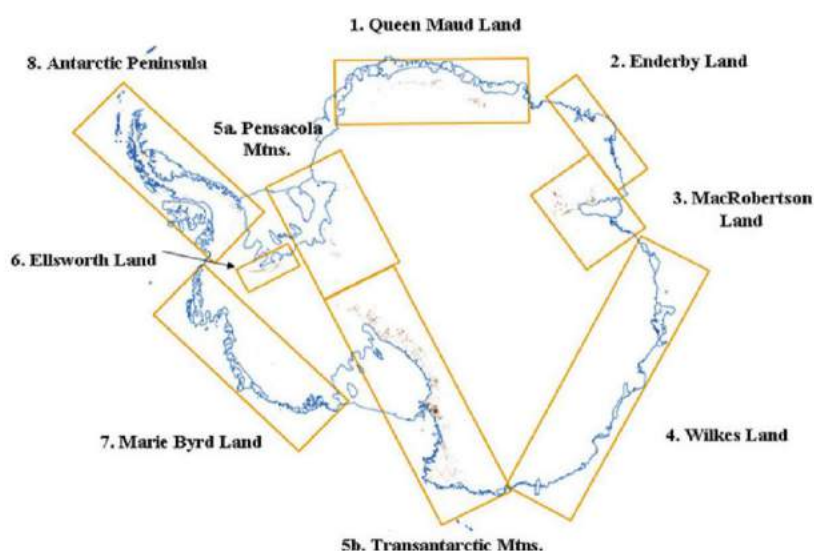
**Figura 1.9.** Diagrama triangular de las clases texturales en las que se divide el suelo de acuerdo al tamaño de partículas. Fuente: United States Department of Agriculture (USDA)

La mayoría de las bases antárticas se encuentran ubicadas en zonas costeras (sólo 3 se encuentran tierra adentro), por lo que el impacto de la contaminación antrópica suele ocurrir sobre suelos que no presentan cobertura de hielo (Figura 1.10). Por otro lado, una gran parte de los suelos circundantes a bases científicas presentan características similares, que incluyen bajo contenido de materia orgánica (debido principalmente a la falta de vegetación), bajo contenido general de nutrientes (Nitrógeno, Fósforo, Potasio) y de agua.

El suelo en el cual está centrado el presente trabajo de tesis, proviene del área circundante a los tanques de almacenamiento de GOA ubicados en la Base Argentina Carlini (62°14'18"S 58°40'05"W), ubicada en Caleta Potter, Isla 25 de Mayo (King George Island), Islas Shetland del Sur. El suelo prístino obtenido en este sitio presentó una textura arenosa, conteniendo un 1,8 % de arcilla, 3,8 % de limo y 94,4 % de arena. Los valores de carbono orgánico total, el nitrógeno total Kjeldhal y el fósforo extractable total fueron 10,21 g kg<sup>-1</sup> (1,02 %), 0,32 g kg<sup>-1</sup> y 5,0 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente. El pH fue 6,8 mientras que el contenido de humedad ascendió a 10 %.

La contaminación con hidrocarburos impacta químicamente sobre estos suelos al proporcionar un gran contenido de compuestos ricos en carbono ya que, como se dijo

previamente, los suelos antárticos son pobres en nutrientes. La principal consecuencia del gran aporte de carbono proporcionado por el derrame de hidrocarburos es un desbalance en la relación C:N:P en ese suelo, que afecta a la flora microbiana residente (Ferguson y col., 2003; Vázquez y col., 2009; van Dorst y col., 2016). Por un lado, sólo una parte de las bacterias y microorganismos en el suelo son capaces de tolerar el impacto del contaminante (esto es, a su vez, dependiente de la dosis de contaminación). Por otro lado, aquellos que son capaces de tolerar el contaminante y degradarlo, requieren de N y P para poder metabolizarlo. El desbalance en la relación C:N:P provocado por el derrame de hidrocarburos consiste en el aporte de una gran cantidad de C metabolizable por la flora microbiana, pero sin las cantidades necesarias de los otros nutrientes (N y P). Este desbalance finalmente redundará en una reducción de la capacidad metabólica y de biodegradación de los contaminantes, favoreciendo de esta manera la permanencia de los mismos en el suelo.



**Figura 1.10.** Áreas libre de hielo (suelo descubierto) por región en Antártida. Adaptado de Bockheim (2015).

Otra característica que vale la pena destacar respecto a estos suelos contaminados, es el tipo de contaminación a la cual fue sometido. Cuando el contaminante es vertido por primera vez sobre el suelo genera una **contaminación de tipo aguda**, que se da sobre suelos prístinos que reciben de manera súbita una gran cantidad del contaminante. En este suelo se encontrarán generalmente muy pocos microorganismos adaptados a degradar el contaminante, los cuales tendrán muy poca tolerancia al mismo, generando un marcado descenso en el número y diversidad de los grupos bacterianos de ese suelo (Mac Cormack y Ruberto, 2003). El aspecto positivo de este tipo de contaminación es que al ser un evento reciente, los hidrocarburos en

suelo tendrán un gran componente de compuestos volátiles, y por otro lado no se encontraran envejecidos (proceso conocido como *ageing*, Liu y col., 2012; Tang y col., 2012). Esto último redundará en que no estén adsorbidos fuertemente a las partículas que forman parte de la estructura del suelo.

Por otro lado, se encuentran los suelos en los que los eventos de contaminación sucedieron hace ya un tiempo (envejecidos) o que son frecuentemente impactados por hidrocarburos derivados del petróleo, recibiendo probablemente pequeñas pero constantes dosis. El manejo, uso y distribución de los combustibles en las bases antárticas puede llevar a derrames accidentales que contaminen la misma matriz edáfica en reiteradas ocasiones. Estos suelos **contaminados en forma crónica** contienen proporciones significativas de microorganismos ya adaptados a la presencia del contaminante, y con capacidad de tolerarlos y degradarlos, permitiendo realizar procesos de índole biológicos para recuperarlos de una manera eficiente.

Esto los diferencia de aquellos suelos contaminados de forma aguda, sumado al hecho de presentar un bajo número de hidrocarburos volátiles y estar enriquecidos en la fracción pesada y/o recalcitrante del gasoil. Este tipo de contaminantes está fuertemente adsorbido a las partículas del suelo y por ende su biodisponibilidad es muy baja.



**Figura 1.11.** Cañerías de transporte de GOA, en la Base Carlini. La manipulación del combustible puede producir pequeños y constantes derrames que contaminen crónicamente el suelo.

El tratamiento de suelos contaminados de Antártida, implica importantes diferencias (tipos de tratamiento, logística y costos asociados) de acuerdo a si se busca la descontaminación de dichos suelos en el lugar de origen o si se planea trasladarlos para su tratamiento. En el caso en

que los suelos no sean removidos y se les aplique un tratamiento en el lugar donde sufrieron la contaminación, el tratamiento se denomina "*in-situ*". Por el contrario, si se decide o es necesario removerlo para su descontaminación, el proceso se denomina "*ex-situ*". Esa remoción y traslado suele estar acompañado de un incremento marcado en los costos del tratamiento y del esfuerzo logístico necesario. En muchos casos, ese incremento en los costos resulta prohibitivo para la factibilidad de la descontaminación de los suelos, y por ende, se escoge una estrategia a aplicar en el lugar, que resulta generalmente en costos mucho menores, o simplemente se permite que los procesos naturales ocurrientes en el suelo contengan y reduzcan la concentración del contaminante. Este fenómeno se describe como **atenuación natural** o "*do-nothing*" (del inglés, no hacer nada). Además, existe una alternativa que involucra la remoción del suelo para tratarlo en las cercanías del lugar donde fue impactado por el contaminante. Esta estrategia se conoce como "*on-site*" e implica la colocación del suelo en áreas circundantes, y generalmente su aislamiento del resto del ambiente mediante el uso de capas de arcillas, geomembranas o geotextiles para conformar o un sistema en landfarmings (**Sección 1.8.1**) o en biopilas (**Sección 1.8.2**). Esta estrategia presenta la ventaja de involucrar costos más reducidos que los tratamientos "*ex-situ*", aumentando su factibilidad, además de incrementar la eficiencia de remoción del contaminante superando los valores obtenidos usualmente por la remediación "*in-situ*". Además, una vez tratado, el suelo puede ser devuelto a su sitio de origen sin grandes costos de traslado asociados.

### **1.5. Técnicas de remediación de hidrocarburos en suelos**

Las técnicas de remediación de hidrocarburos derivados del petróleo en suelos han ido evolucionando a lo largo de los años. Hasta la década de 1980, las técnicas utilizadas involucraban el mero uso de "*vertederos*", lo cual implicaba el traslado del suelo contaminado desde su sitio de origen hacia un sitio de disposición final sin la aplicación de ningún tipo de tratamiento. Hacia mediados de los 80, y tras la aplicación de leyes y enmiendas cruciales en EEUU a través de la Environmental Protection Agency (EPA), se planteó la necesidad y preferencia de otros métodos de remediación de suelos que representen soluciones más permanentes y menos costosas. Estas leyes (conocidas como *Superfund*) establecían como sus puntos principales: i) la prohibición del uso de sitios de abandono de residuos peligrosos; ii) la responsabilidad civil de aquellas personas responsables de esa generación de residuos; iii) el establecimiento de un fondo común para el financiamiento de la recuperación de aquellos sitios contaminados con residuos de los que no se conocía el originante y; iv) la incorporación de impuestos a las industrias contaminantes de forma de sustentar la aplicación de tratamientos (Public Law 96-510, Congreso de los Estados Unidos). Como consecuencia, se avanzó

significativamente en el desarrollo y uso de técnicas que trataban el suelo, y reducían la concentración del contaminante. Sin embargo, hay que tener en cuenta la extensión de suelos a tratar, así como los costos asociados a dichos tratamientos. En ese sentido, se han desarrollado numerosas estrategias físicas, químicas y biológicas para ese fin. El resumen de estas técnicas se incluye en la Tabla 1.1.

### **1.5.1. Barreras inertes**

El uso de barreras tiene como único objetivo la retención del contaminante en el subsuelo, impidiendo que este se siga diseminando. La estrategia radica en la instalación de barreras de materiales impermeables (y de preferencia, inertes) en el suelo, de manera de frenar la migración de la contaminación. Generalmente es el método de elección cuando el tratamiento de descontaminación es económica, técnica o logísticamente inviable. Para la construcción de estas barreras se suele utilizar lechada u hormigón, la inyección de cemento o de agentes químicos bajo el perímetro de la zona contaminada, o membranas sintéticas (geomembranas de alta densidad) que impiden la escorrentía (*run off*) del contaminante.

Lugar de aplicación: **in-situ**

Velocidad de degradación: **nula o muy lenta (atenuación natural)**

Costo económico: **muy bajo**

### **1.5.2. Barreras permeables reactivas**

Las barreras permeables reactivas (BPR) constituyen una estrategia de descontaminación que radica en la intercepción de aguas subterráneas para eliminar o adsorber los contaminantes presentes en ella, mediante procesos físicos, químicos o biológicos. El paso del agua a través de dicha barrera se logra muchas veces "encausando" el flujo mediante el uso de muros de contención que fuercen a las aguas a pasar por las barreras reactivas.

El tratamiento de estas aguas contaminadas se da a través de dos procesos: i) adsorción o retención por compuestos adsorbentes o precipitantes que retienen el contaminante en su superficie o que los precipitan en forma de sólidos de manera de retenerlos en la barrera; ii) degradación, ya sea por métodos químicos como biológicos. Dentro de los químicos, hay ciertos compuestos que se pueden utilizar que transforman compuestos nocivos en sustancias inocuas (como por ejemplo, el hierro granulado para tratar compuestos clorados). También se puede estimular el crecimiento de microorganismos (Mumford y col., 2013) que metabolicen los contaminantes que llegan a la barrera permeable. Para esto, es necesario proveer nutrientes y oxígeno.



Lugar de aplicación: **in-situ**

Velocidad de degradación: **lenta**

Costo económico: **medio**

### **1.5.3. Desorción térmica**

Este tratamiento consiste en calentar el suelo a temperaturas de entre 250 y 600 °C para provocar la evaporación de compuestos orgánicos volátiles. Esa evaporación genera la separación física de los contaminantes, que luego son captados por un equipo de recuperación de gases y son transformados nuevamente en líquidos o sólidos para su degradación final. Altos contenidos de agua en los suelos a tratar dificultan su tratamiento con esta técnica y elevan marcadamente su costo. Este hecho, sumado a los costos asociados al transporte que representan las estrategias *ex-situ*, torna su aplicabilidad en Antártida muy reducida.

Lugar de aplicación: **ex-situ**

Velocidad de degradación: **rápida**

Costo económico: **medio**

### **1.5.4. Lavado de suelos**

El lavado de suelos involucra la extracción del suelo para ser tratado en instalaciones específicas en donde se reduce su nivel de contaminación mediante el agregado de agua y agentes tensioactivos, además de un proceso mecánico que separa los componentes del suelo de acuerdo a su tamaño. Esta estrategia disuelve los contaminantes en el agua debido a las propiedades surfactantes de los agentes químicos utilizados y a la manipulación del pH, por lo que en rigor se trata de una tecnología de transferencia de contaminantes de una matriz a otra. La mayor ventaja que presenta este método es la posibilidad de reducir la cantidad de matriz contaminada a tratar debido a que las fracciones más pequeñas del suelo (limo y arcilla) siempre se encuentran más contaminadas debido a su mayor capacidad absorbente. De esta forma, la separación granulométrica de las partículas del suelo concentra los contaminantes en un volumen menor, deshaciéndose de las partículas más grandes (más fácilmente depurables). Sin embargo, durante este tratamiento se generan grandes cantidades de aguas contaminadas, sumado al hecho de que altos contenidos de arcilla y limo disminuyen su eficiencia.

Lugar de aplicación: **ex-situ**

Velocidad de degradación: **rápida**

Costo económico: **medio**

### 1.5.5. Aireación

Consiste en la excavación y remoción del suelo para favorecer la eliminación pasiva de los contaminantes. El suelo excavado se vierte en una fina capa sobre una superficie impermeable, esperando que los hidrocarburos derivados del petróleo se volatilicen. Para aumentar la velocidad de este tratamiento, se suele recurrir al arado o mezcla periódica del suelo a tratar. El agregado de agua también beneficia la disminución del contaminante al favorecer su desorción. Además, al extender el suelo, se aumenta su temperatura y se expone a la acción de los vientos, aumentando la tasa de volatilización. La gran ventaja de este método radica en su bajo costo de implementación, sin embargo, como el lavado de suelos, simplemente transfiere los contaminantes de una matriz (suelo) a otra (atmósfera). No obstante, los hidrocarburos tienen un tiempo de residencia muy bajo en atmósfera, y reaccionan fácilmente con los radicales hidroxilo atmosféricos, degradándose relativamente rápido. Por otro lado, la implementación de esta técnica requiere grandes superficies de terreno dedicadas al proceso.

Lugar de aplicación: **on-site/ex-situ**

Velocidad de degradación: **lenta**

Costo económico: **muy bajo**

### 1.5.6. Arrastre con aire o vapor (Air sparging)

Esta metodología se fundamenta en la Ley de Henry (Ley de partición de los gases). En ella se busca desplazar el equilibrio aire/líquido para favorecer la remoción del contaminante por una corriente de aire o vapor. Consiste en la inyección de aire por debajo del nivel freático usando canales excavados tanto horizontales como verticales. El aire es de esta forma burbujeado en la zona saturada, volatilizando los compuestos más insolubles, que se suelen extraer luego mediante un sistema de extracción de vapores. Los gases extraídos son recogidos y separados para su ulterior tratamiento. Esta estrategia funciona con altos caudales de aire para mantener el contacto entre aguas subterráneas y suelos. Además, el oxígeno provisto puede favorecer el desarrollo microbiano, aumentando la biodegradación.

La corriente de aire puede ser calefaccionada para aumentar la volatilización de los compuestos y por ende aumentar su eficiencia. Sin embargo, sólo remueve aquellos compuestos contaminantes que posean una presión de vapor superior a 0,5 mm Hg, por lo que las fracciones pesadas de los derivados del petróleo no serán volatilizados por esta técnica.

Lugar de aplicación: **in-situ**

Velocidad de degradación: **media**

Costo económico: **bajo**

### 1.5.7. Extracción por vacío (Bioslurping)

El bioslurping consiste en la extracción por vacío del aire del suelo. El vacío parcial generado allí será acompañado por venteo del suelo (Bioventing) para la remediación simultánea del suelo y las aguas subterráneas contaminadas con derivados del petróleo. Como consecuencia, se requerirá separar ambas fases una vez extraídas. Gracias a este mecanismo, se pueden extraer aquellos hidrocarburos que sean menos densos que el agua, y se encuentren flotando en aguas subterráneas. Adicionalmente, esa entrada de aire mediante bioventing puede favorecer el desarrollo de microorganismos capaces de degradar el contaminante, acelerando los tiempos de proceso. En contraste con la técnica del arrastre por aire o vapor, en el bioventing los caudales de aire proporcionados son bajos, solamente para proporcionar oxígeno y mantener la actividad microbiana.

Lugar de aplicación: **in-situ**

Velocidad de degradación: **media**

Costo económico: **bajo**

### 1.5.8. Oxidación química

En este tratamiento se busca transformar aquellos compuestos contaminantes que son susceptibles de ser oxidados, en otros más inocuos (idealmente CO<sub>2</sub> y agua). Para alcanzar dicho objetivo, se utilizan oxidantes fuertes como el ozono (O<sub>3</sub>), el permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>) o el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Estos compuestos son inyectados o aportados como solución desde la superficie, a través de pozos a distintas alturas sin que sea necesario bombear los productos de la oxidación. Sin embargo, se observan mejores resultados en sistemas cerrados en los cuales estos subproductos de la oxidación vuelven a ser inyectados al suelo a tratar. Esta técnica brinda muy buenos resultados, sobre todo cuando la contaminación se encuentra a profundidades considerables, pero el tratamiento de grandes volúmenes de suelos redundará en un respectivo aumento de los costos, y en la inyección de grandes cantidades de oxidante que pueden afectar compuestos no relacionados con los hidrocarburos.

Lugar de aplicación: **in-situ**

Velocidad de degradación: **rápida**

Costo económico: **medio**

### **1.5.9. Limpieza electrocinética**

Esta técnica consiste en la aplicación de corriente eléctrica de baja intensidad (para no elevar costos ni perjudicar a los organismos habitantes del suelo) entre dos electrodos a cada lado del material contaminado, para provocar la migración de las especies con carga. Los contaminantes se mueven hacia los electrodos por electroósmosis o por electromigración. La primera representa la movilización del líquido (movimiento del agua causado por el campo eléctrico), mientras que la segunda implica el movimiento de los contaminantes en forma iónica a favor del campo eléctrico. Los contaminantes se adhieren a los electrodos y son separados en un proceso posterior.

La ventaja de este método es que no resulta influenciado por la textura, composición o permeabilidad del suelo, pero presenta un elevado costo energético, lo que genera un encarecimiento intrínseco. Además, solo es útil para un limitado grupo de compuestos, y se ve afectado por la precipitación de sales.

Lugar de aplicación: **in-situ**

Velocidad de degradación: **media**

Costo económico: **alto**

### **1.5.10. Incineración**

Este proceso es llevado a cabo luego de la excavación del suelo y transporte a los incineradores. Posteriormente, se quema el suelo a temperaturas de entre 900 y 1200 °C en presencia de oxígeno. Esta combinación, volatiliza los contaminantes y posteriormente favorece su oxidación térmica para generar compuestos más pequeños, ligeros y menos tóxicos, idealmente CO<sub>2</sub> y agua. Cabe destacar que los metales no son destruidos en este proceso. Los gases residuales generados por la combustión deben ser tratados para evitar la liberación de desechos nocivos, mientras que los gases limpios de vapor y CO<sub>2</sub> pueden ser liberados por chimeneas. El suelo es destruido durante el proceso resultando en un perjuicio para el ambiente, que pierde parte de su matriz natural.

Lugar de aplicación: **ex-situ**

Velocidad de degradación: **rápida**

Costo económico: **alto**

**Tabla 1.1.** Resumen de las características de las técnicas fisicoquímicas de remediación de suelos.

<b>CARACTERÍSTICAS DE LAS TECNOLOGÍAS DE TRATAMIENTO DE SUELOS</b>			
<b>Técnica</b>	<b>Lugar de aplicación</b>	<b>Velocidad de degradación</b>	<b>Costo económico</b>
Barreras inertes	In situ	Nula o muy lenta	Bajo
Barreras reactivas	In situ	Lenta	Medio
Desorción térmica	Ex situ	Rápida	Medio
Lavado de suelos	Ex situ	Rápida	Medio
Aireación	Ex situ	Lenta	Bajo
Arraste con aire o vapor (air sparging)	In situ	Media	Bajo
Bioslurping	In situ	Media	Bajo
Oxidación química	In situ	Rápida	Medio
Limpieza electrocinética	In situ	Media	Alto
Incineración	Ex situ	Rápida	Alto

### **1.6. Biorremediación**

Buena parte de los métodos enunciados previamente requieren de la excavación y transporte del suelo a tratar, o de una infraestructura demandante para su tratamiento *in-situ*. Ambos requerimientos son de especial difícil cumplimiento o alcance en el continente antártico, en donde las extremas condiciones climáticas y lejanía se tornan en un desafío muy particular. Por un lado, cualquier excavación y transporte de matriz contaminada redundan en una logística compleja y un gran costo asociado, además de que, en muchos casos, genera una alteración irreversible del ambiente, reduciendo la factibilidad de la remediación. Por otro lado, la instalación de una infraestructura adecuada para su tratamiento en el lugar de contaminación se torna muy difícil por las extremas condiciones ambientales. Adicionalmente, los costos asociados al transporte e instalación de los medios necesarios para ello también causan que su aplicabilidad sea escasa.

En este contexto, el beneficio biotecnológico de utilizar las capacidades catabólicas de los microorganismos (y entre ellos, principalmente las bacterias) para la disminución o eliminación de un contaminante de una determinada matriz (ya sea suelo, agua o sedimento) resulta una herramienta imprescindible para llevar a cabo procesos de remediación. Este aprovechamiento de las capacidades catabólicas de los seres vivos, en su mayoría microorganismos, es lo que se denomina biorremediación y la primera referencia a este término data de 1930, cuando Tausz y

Donath (1930) introducen la idea. Dentro de las posibilidades de su utilización, y por lo mencionado previamente, la aplicación de estrategias de biorremediación “on-site” proveen una relación costo-beneficio sumamente atractiva para la restauración de suelos.

El uso de la biorremediación como estrategia presenta numerosas ventajas respecto a las estrategias previamente descritas. Entre las ventajas a enumerar según la EPA (2004) se encuentran:

- No produce desechos significativos en cantidad y, en general tampoco en su toxicidad
- Resulta en una herramienta de poca demanda de energía
- Es, en comparación, más económica que todas las otras estrategias posibles
- Puede funcionar como complemento de otras técnicas, o secuencialmente a ellas
- Causa una perturbación mínima en el sitio de operación
- Resulta en operaciones sencillas y de bajos requerimientos

Sin embargo, cabe mencionar que el uso de estrategias de biorremediación generalmente conduce a periodos de tratamiento mucho más prolongados que los de índole fisicoquímica. Además, a través del uso de sistemas biológicos, no se logra una remoción completa del contaminante sino que siempre hay una fracción recalcitrante que no es degradada en el proceso (Aislabe y col., 2006; Cébron y col., 2015). Pese a estos factores, la biorremediación es sin duda la estrategia más atractiva debido a su bajo costo, a ser amigable con el medio ambiente y a la interesante relación costo/beneficio que presenta para la recuperación de pasivos ambientales, aumentando significativamente la factibilidad de desarrollarla (Bhatnagar y Kumari, 2013; Lim y col., 2016).

Además de la utilización exclusiva de microorganismos, hay que agregar la posibilidad del empleo de plantas (fitorremediación) y los microorganismos asociados a su rizósfera (rizorremediación). Además de su rol directo en la degradación de componentes orgánicos, el uso de plantas presenta la doble ventaja de mejorar la microflora rizosférica a través de sus exudados y micorrizas, y favorecer la degradación aeróbica por parte de la flora microbiana del suelo, gracias al incremento en la concentración de oxígeno que genera en la zona radicular (Zhou y col., 2012).

Otra alternativa de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos que ha ido en ascenso en los últimos años es la utilización de compostaje con residuos orgánicos (EPA 1998). La utilización de compost o enmiendas orgánicas a un suelo contaminado con derivados del petróleo acelera la degradación microbiana de compuestos orgánicos xenobióticos, resultando en una estrategia de costo módico que a su vez lidia con la problemática actual de la generación y tratamiento de residuos.

Independientemente del método a utilizar para eliminar la contaminación de un suelo, hay una miríada de factores que influyen sobre la eficiencia final y los costos de un proceso de biorremediación. Entre esos factores se destacan: i) las características fisicoquímicas del suelo, incluyendo su composición, cantidad de nutrientes, biodisponibilidad de oxígeno, contenido de humedad; ii) la cantidad de suelo a tratar, ya que grandes cantidades generalmente acarrearán un requerimiento de infraestructura o logística muy demandante, que encarecen su realización; iii) las características del contaminante (tanto estructura química y concentración inicial como el valor final al que se quiere llegar) ya que la duración del tratamiento y su factibilidad dependerán en buena parte de la capacidad de ser degradado por los organismos habitantes del suelo.

## **1.7. Estrategias de biorremediación**

### **1.7.1. Bioestimulación**

Dentro de las estrategias de biorremediación, la **bioestimulación** es la más frecuentemente utilizada, y la que ha reportado mejores resultados y eficiencia en la remoción de hidrocarburos derivados del petróleo en suelos (Thomasin-Lacroix y col., 2002; Coulon y col., 2003; Delille y col., 2004; Greer, 2009; Kauppi y col., 2011; Tyagi y col., 2011; Dong y col., 2015). En esencia, la bioestimulación busca aprovechar las capacidades catabólicas de la comunidad de microorganismos ya habitantes del suelo, al adecuar los factores ambientales que resultan limitantes para el desarrollo microbiano y la degradación del contaminante. En general, los factores más incidentes sobre los cuales suele indagar la bioestimulación, involucran la disponibilidad de macronutrientes (N y P), por lo cual generalmente se vincula a la bioestimulación con la fertilización o el agregado de estos macroelementos al suelo (Zhou y col., 1995; Walworth y col., 2007). Si bien la concentración de N y P, y por ende la optimización de la relación C:N:P en suelo, han sido habitualmente referenciadas como las principales variables que afectan la remoción de hidrocarburos cuando se implementan estrategias de bioestimulación (Gómez y Sartaj, 2014; Martínez Álvarez y col., 2015), también hay casos en los que otras características necesitan ser estudiadas. Entre ellas se puede mencionar al contenido de agua en el suelo (humedad), el pH, la disponibilidad de oxígeno y la temperatura.

### 1.7.2. Bioaumentación

El **bioaumentación** por su parte, consiste en la inoculación de la matriz contaminada con microorganismos, o grupo de microorganismos (consorcios), que poseen la capacidad catabólica de degradar parcial o totalmente el contaminante presente en dicha matriz. Suele aplicarse cuando la velocidad de degradación del contaminante en la matriz sin inocular no es suficiente para que se remueva en tiempos convenientes.

La utilidad y eficiencia del uso del bioaumentación como método de biorremediación es controversial. Muchas veces, el microorganismo o grupo de microorganismos que se inoculan, no logran establecerse en la matriz contaminada, y no son detectables luego de un cierto tiempo de tratamiento (Goldstein y col., 1985; Bouchez y col., 2000a; Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010). Esto es debido principalmente a que la microflora presente en el suelo ya se encuentra adaptada a las particulares condiciones ambientales e interacciones biológicas presentes en dicho suelo (Brown y col., 2016) y no permite que los microorganismos inoculados se establezcan en el suelo. Por otro lado, de acuerdo a la bibliografía, en la mayoría de los casos la utilización de bioaumentación como técnica de biorremediación suele presentar resultados menos satisfactorios que los obtenidos con bioestimulación. En algunos casos, esta dificultad se supera por medio de la adecuación de variables (bioaumentación + bioestimulación), mientras que en otros se suelen usar cepas que presentan la capacidad de producción de surfactantes, con lo que se busca aumentar la biodisponibilidad de los hidrocarburos para el resto de la comunidad microbiana (Bodour y col., 2003; Zhang y col., 2011; Nowicka y col., 2013). Es el caso, por ejemplo, de algunos miembros del género *Rhodococcus*, que producen biosurfactantes que permanecen adheridos a la membrana o a la pared celular, favoreciendo la degradación de compuestos orgánicos (Mac Cormack y Fraile, 1997; Dean-Ross y col., 2001; Aislabie y col., 2006).

En el continente antártico sin embargo, hay que tener en cuenta que sólo se puede disponer para la realización de una estrategia de bioaumentación, de cepas de microorganismos autóctonos de la zona a tratar, ya que el Protocolo de Protección Ambiental de Madrid (1991) impide la introducción de especies alóctonas. En cualquier caso, la conclusión más generalizada es que la adecuación de las variables ambientales suele ser el método más efectivo para la remediación de suelos, incluso en Antártida.

### 1.7.3. Agregado de surfactantes

En muchos casos, por más que el suelo disponga de un número y calidad adecuada de microorganismos para llevar a cabo la remediación, y que las variables fisicoquímicas así como las cantidades de nutrientes del suelo sean las adecuadas, los contaminantes no son removidos



de manera significativa. Esto suele pasar cuando el contaminante se encuentra estrechamente ligado a las partículas de suelo, reduciendo su biodisponibilidad. El agregado de **surfactantes** es utilizado como una solución a este problema, debido a que su carácter anfifílico reduce la tensión superficial del agua y los compuestos acuosos, favorece la formación de micelas y aumenta la movilidad de los compuestos orgánicos hidrófobos. De esta forma, ayudan a solubilizar los contaminantes, acrecentando su disponibilidad para la comunidad bacteriana y aumentando su tasa de degradación (Van Hamme y Ward, 2001; Makkar y Rockne, 2003).

### **1.8. Biorremediación a campo**

Uno de los pilares de las ciencias aplicadas como la biotecnología, es la transferencia del conocimiento gestado y obtenido en el laboratorio, a instancias reales de aplicación concreta. Este salto tecnológico es frecuentemente difícil e inusualmente promovido en la ciencia de nuestro país. Sin embargo, la biotecnología incluye en sus cimientos la demanda de ser aplicada tanto para generar un producto, como para brindar un servicio.

En ese sentido, la biorremediación está destinada desde sus orígenes a ser pasible de ser aplicada en una locación con el fin de lograr un servicio concreto: el de la recuperación de una matriz luego de un evento de contaminación. Obviamente, el traslado al campo de las investigaciones realizadas a escala laboratorio es muchas veces complicada. La obtención en circunstancias operativas reales de los resultados previamente obtenidos en condiciones más intervenidas en el laboratorio, es generalmente difícil de lograr, ya que las variables no controlables en el campo pueden generar un menor control sobre los experimentos, y por ende, una mayor distorsión de los resultados obtenibles.

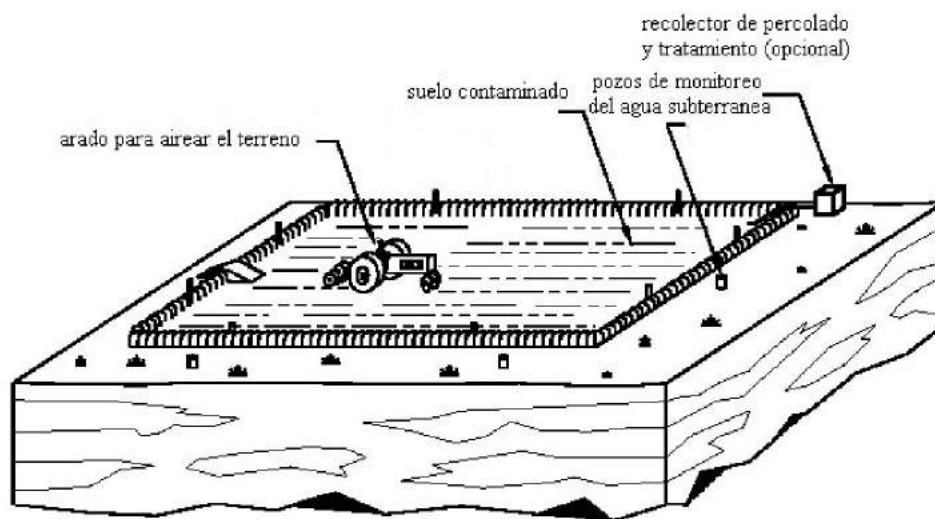
En el caso particular de la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos, el escalado de los tratamientos desarrollados en el laboratorio presenta muchas aristas que complican su ejecución en el campo. Por un lado, se sabe fehacientemente que la concentración inicial del contaminante modifica tanto las condiciones fisicoquímicas, como la comunidad microbiana de los suelos impactados. Este es el factor clave que lleva a buscar implementar una biorremediación, y es al mismo tiempo inmanejable. Además, variables ambientales que son fácilmente manipulables en los experimentos en el laboratorio (como por ejemplo la temperatura), son difícilmente regulables en ensayos a campo donde su control implicaría un costo y una logística prohibitiva, sobre todo si se plantea realizar en el continente antártico. Por otro lado, la cantidad de suelo a tratar también presenta una variación considerable en las condiciones de operación. Mientras que los ensayos a pequeña escala solo involucran unos cuantos gramos de suelo (< 1 kg en general), la aplicación del tratamiento en escala real puede abarcar toneladas. Ese aumento en las cantidades de suelo a tratar puede llevar a que la

aireación se torne deficiente, limitando la degradación, o que el manejo del mismo demande maquinaria pesada que encarece los costos de su realización, disminuyendo su factibilidad.

En esta sección, solamente se hará hincapié sobre las dos estrategias de biorremediación de suelo a campo más extensamente utilizadas en la actualidad, y que mejores resultados han otorgado.

### 1.8.1. Landfarming

El landfarming es un método de remediación a campo de suelos que reduce la concentración de hidrocarburos derivados del petróleo, tanto por evaporación como por biodegradación. Implica la disposición del suelo contaminado en una fina capa sobre la superficie, favoreciendo la actividad microbiana a través de oxigenación y/o del agregado de nutrientes, minerales o incrementando su humedad (EPA 1994, Chapter V). Generalmente se utiliza algún tipo de aislante debajo para evitar la migración del contaminante al suelo sobre el cual se dispone el landfarming. Un diseño típico de landfarming se muestra en la Figura 1.12.



**Figura 1.12.** Disposición típica de un landfarming. Adaptado de EPA (1994).

Esta estrategia ha demostrado ser efectiva para la biorremediación de suelos, pero dado el hecho de que los hidrocarburos de cadenas livianas (VOC) son eliminados por evaporación, las emisiones a la atmósfera debieran ser controladas, en pos de que la estrategia no consista meramente en la transferencia del contaminante de una matriz (suelo) a otra (aire). Dentro de los componentes de cadena media del combustible diésel, tanto la evaporación como la

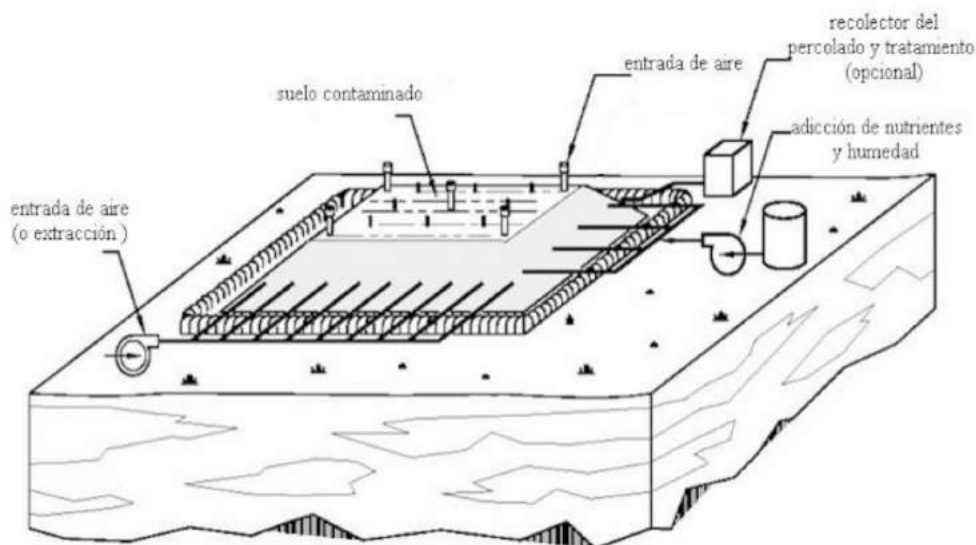
biodegradación son significativas. Para los compuestos pesados, sólo la biodegradación afecta su concentración, dado que estos compuestos no se evaporan en cantidades significativas.

La implementación y diseño de esta estrategia es sumamente simple de realizar. Asimismo, redonda en muy bajos costos (30-60 USD por tonelada). Sin embargo, suele no ser muy eficiente para suelos altamente contaminados, además de que las emisiones de compuestos volátiles debieran ser recogidas y filtradas antes de ser liberadas a la atmósfera, encareciendo el proceso. Esta metodología ha sido utilizada en un caso de contaminación masiva en Kuwait luego de la Guerra del Golfo, alcanzando niveles de remoción de más de 80% (Balba y col., 1998), aunque debido a los 50 °C a los que puede llegar la temperatura durante el día, la mayor parte de la eliminación fue por evaporación.

Para su utilización en Antártida, esta técnica presenta la desventaja de necesitar una gran área libre de nieve para la disposición del suelo contaminado, lo cual suele ser difícil de encontrar en ese continente. Además, el suelo a tratar de esta forma queda expuesto a rigurosas condiciones climáticas como viento, nieve, lluvia y frío que no sólo impactarán negativamente sobre la eficiencia que el tratamiento pueda tener, sino que por otro lado la dispersión eólica puede generar el esparcimiento de suelo contaminado hacia áreas que no se encontraban contaminadas.

### **1.8.2. Biopilas**

La biorremediación utilizando biopilas consiste en la excavación del suelo contaminado y su amontonamiento en "**pilas**" en un área de tratamiento determinada, que debe encontrarse aislada del suelo circundante de manera de evitar el lixiviado del contaminante. En estas pilas también se favorece la biodegradación microbiana mediante la aireación (que puede ser por mezclado o forzada, además del agregado de agentes que favorecen la porosidad del suelo como chips de madera, perlita, etc.), el agregado de nutrientes o el ajuste de la humedad (EPA 1994, Chapter IV). Un diseño típico de biopilas se muestra en la Figura 1.13. Estas pilas pueden a su vez estar cubiertas, favoreciendo el aumento de la temperatura del suelo y el mantenimiento de la humedad en un nivel estable.



**Figura 1.13.** Configuración habitual de un sistema de biopilas con aireación forzada. Adaptado de EPA (1994).

En comparación con el landfarming, esta técnica también resulta simple de diseñar y de llevar a cabo, pero presenta la ventaja de necesitar tiempos de tratamiento generalmente más cortos, requiriendo de un área de tratamiento mucho más reducida. El costo promedio ronda los 30 a 90 USD por tonelada (aproximadamente lo mismo que el landfarming), pero al permitir el diseño de sistemas cerrados que captan las volatilizaciones, se transforma en una opción más factible y viable. Sin embargo, el uso de biopilas aún requiere del tratamiento de los elementos volátiles antes de su disposición final. Asimismo, es difícil que el uso de esta estrategia permita obtener porcentajes de remoción superiores al 95%, dado que es habitual la presencia de compuestos en el gasoil recalcitrantes a la biodegradación (al menos en una primera etapa). La efectividad de la biopila dependerá en buena parte de una combinación entre: i) las variables climáticas (viento, nieve, temperatura), ii) las características del suelo (pH, carga microbiana, salinidad, humedad, cantidad de nutrientes) y, iii) las características del contaminante, en cuanto a su volatilidad, estructura, concentración intrínseca y toxicidad.

Para el continente antártico en particular, en donde la emanación intencional de contaminantes no tratados al ambiente está prohibida por el Protocolo Ambiental de Madrid de 1991, el uso de sistemas de biopilas, total o parcialmente cerrados, se torna entonces en una alternativa muy valorable, que minimiza dichas emanaciones. Por otro lado, el aislamiento del suelo de la biopila del clima circundante es vital en Antártida en pos de evitar el efecto de las condiciones climáticas, ya que el congelamiento del suelo, su cobertura por nieve, o la modificación de humedad que esto le genera (efectos presentes en el landfarming), modificarían el normal desarrollo de la remediación, afectando la eficiencia final del proceso de biodegradación.

En regiones polares, el uso de biopilas ha demostrado ser efectiva para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos, tal como ha sido reportado en los trabajos realizados por Gomez y Sartaj (2013 y 2014), quienes utilizaron sistemas de biopilas para la remediación de suelos de zonas sub-árticas. En la Antártida, esta estrategia también se ha implementado, obteniéndose elevadas eficiencias de remoción del contaminante (Whelan y col., 2015; Mcwatters y col., 2016; Martínez Álvarez y col., 2017).

### **1.9. Biorremediación en regiones polares. Antecedentes**

Se ha observado que los suelos antárticos contienen una comunidad bacteriana poseedora de una gran capacidad catabólica, además de una versátil adaptación a la presencia de contaminantes (Lima-Morales y col., 2016). Los microorganismos allí habitantes poseen temperaturas óptimas de crecimiento que se encuentran en su mayoría debajo de los 15 °C (psicrófilos). Para lograr subsistir y sobrevivir en condiciones tan extremas, estos organismos han desarrollado mecanismos muy específicos de adaptación al frío, que involucran la producción de proteínas específicas ("*cold shock proteins*", *CSP*) capaces de estabilizar estructuras moleculares vitales para la célula frente al estrés por frío, moderando el congelamiento incluso por debajo de 0°C y evitando así su lisis. Otra estrategia utilizada por los microorganismos en estos ambientes gélidos involucra la fluidización de sus membranas celulares para facilitar la absorción de nutrientes o eliminación de desechos. Este aumento de la fluidez es logrado mediante el aumento de los dobles enlaces de los fosfolípidos de membrana. También la acumulación moléculas en el citoplasma, como la trehalosa, que provoquen un descenso crioscópico bajando la temperatura de congelamiento del fluido intracelular, permiten sobrevivir en estas condiciones. Por último, el enlentecimiento de las reacciones intracelulares es contrarrestado mediante la disminución de la energía de activación requerida por las enzimas celulares, de manera de poder mantener su capacidad catalítica, incluso a temperaturas bajo cero.

Todas estas adaptaciones llevadas a cabo por los microorganismos antárticos, sumada a su capacidad de tolerar la presencia de hidrocarburos en suelo, determinan que la biorremediación en ambientes tan extremos como los de Antártida sea no sólo posible, sino también factible y eficiente.



**Figura 1.14.** Biorremediación mediante uso de biopilas en una base antártica australiana.

Numerosos estudios han sido realizados a lo largo de los años utilizando la biorremediación como estrategia de descontaminación de suelos en regiones polares, tanto en el ártico (Yergeau y col., 2009; Yergeau y col., 2012; Bagi y col., 2014; Garneau y col., 2016; Sharma y Schiewer, 2016; Scehibye y col., 2017), como en la Antártida (Snape y col., 2006; Delille y Coulon, 2008; Okere y col., 2012; de Jesus y col., 2015). Dentro de este continente, el grupo de trabajo en el cual se desarrolló el presente trabajo de tesis tiene una amplia experiencia y conocimiento en la materia (Mac Cormack y Fraile, 1997; Ruberto y col., 2003, 2006, 2008, 2009; Vazquez y col., 2009, Dias y col., 2012, 2014). La mayoría de los ensayos se realizan en una primera etapa a escala laboratorio, simulando las condiciones presentes en el campo, de manera de establecer la posibilidad de escalar dichos ensayos posteriormente en el sitio impactado/contaminado. Una vez establecida su factibilidad, muchos de esos experimentos han sido probados *in situ* en Antártida, logrando en general buenos niveles de remoción, incluso en bases científicas ubicadas en sectores opuestos del continente (McWatters y col., 2016 en Antártida Oriental; Martínez Álvarez y col., 2017 en Antártida Occidental). Este hecho demuestra que los suelos antárticos poseen la maquinaria catabólica y las características necesarias para favorecer la recuperación de la contaminación mediante estrategias biológicas, incluso con suelos de distinto origen y con características intrínsecas muy distintivas para cada uno de ellos.

Esta demostración de la eficiencia y factibilidad de la biorremediación, sumada a la mencionada legislación del Protocolo Ambiental de Madrid que establece la prohibición de ingresar organismos alóctonos al continente antártico, y a los costos asociados a otros tipos de tecnología, redundan en que la utilización de la bioestimulación represente una estrategia efectiva para la recuperación de suelos antárticos contaminados con hidrocarburos, constituyendo un método simple y de bajo costo.

### 1.10. Diversidad microbiana en suelos antárticos

Como se mencionó previamente, las comunidades microbianas presentes en los suelos antárticos poseen un arsenal catabólico que les permite no sólo tolerar la presencia del gasoil contaminante, sino además degradarlo en compuestos menos tóxicos. Sin embargo, cualquier evento de contaminación siempre genera una presión selectiva sobre la comunidad de la matriz contaminada, que generalmente lleva a una reducción su diversidad (Ahn y col., 2006). Esto se debe a que sólo algunos de los grupos microbianos presentes tienen la capacidad de tolerar la toxicidad intrínseca del contaminante y además la capacidad de metabolizarlo. Otros grupos pueden ser tolerantes al xenobiótico, pero no podrán degradarlo, por lo que tendrán un crecimiento menor. Así, aquellos suelos que tengan una larga historia de eventos de contaminación (suelos contaminados en forma crónica), tolerarán y responderán más rápidamente a eventuales derrames de hidrocarburos, ya que contienen un mayor número de microorganismos adaptados a su presencia. Por esta misma razón, la diversidad presente se verá menos afectada que en aquellos suelos que se contaminan de forma aguda.

Las bacterias heterotróficas y algunos hongos son los grupos que predominan en suelos contaminados con hidrocarburos (Leahy y Colwell, 1990). Luego de una contaminación por estos compuestos, se generará un marcado enriquecimiento en bacterias y hongos que no sólo toleran, sino además degradan el contaminante. Tanto los métodos dependientes de cultivo como aquellos que utilizan técnicas moleculares demuestran que luego de un tiempo, y al descender la concentración de hidrocarburos en el suelo, las comunidades pueden retornar a un estado más parecido al de la pre-contaminación (Yagi y col., 2010; Andreolli y col., 2016).

Por más que la diversidad microbiana se vea afectada por el impacto del gasoil, aun se encontrarán en el suelo una gran variedad de grupos de microorganismos que pueden llevar a cabo mecanismos de degradación diferentes entre sí. En comparación con la degradación llevada a cabo en laboratorio, en el cual generalmente se usa un solo microorganismo o un acotado grupo de ellos, el suelo impactado presenta la ventaja ecosistémica de que distintos grupos pueden metabolizar distintos hidrocarburos, y que el sustrato de uno de ellos puede bien ser el producto final generado por uno previo (degradación secuencial, Mohammed y col, 1996). Con esta versatilidad catabólica, la degradación del contaminante se ve beneficiada, al menos bajo condiciones ambientales favorables.

*Pseudomonas* (Biswas y col., 2006), *Bacillus* (Dott y col., 1995), *Rhodococcus* (Lee y col., 2006), *Rhodanobacter* (Martínez Álvarez y col., 2017), *Alcanivorax* (Li y col., 2015) y *Arthrobacter* (Banat y col., 2002) son algunos de los géneros bacterianos que más frecuentemente se han reportado en suelos contaminados por hidrocarburos, y que poseen la capacidad de degradarlos. Entre los hongos y levaduras, y a modo de ejemplo, miembros de los géneros *Cryptococcus*,

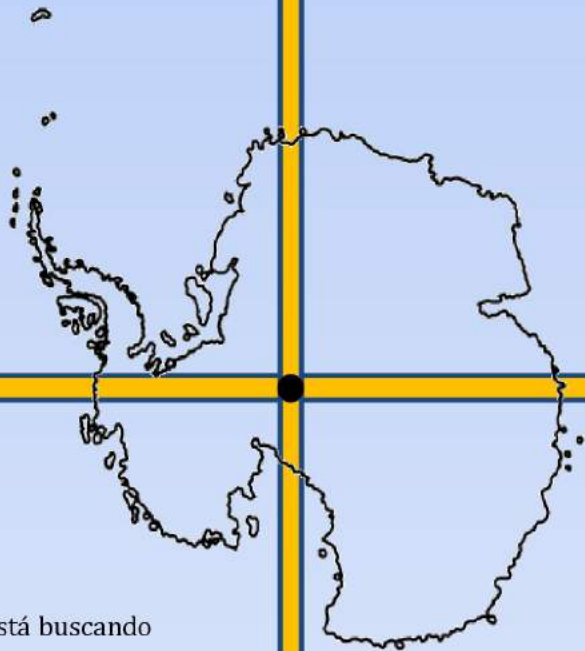
*Rhodotorula*, *Penicillium* y *Mortierella*, entre otros, han sido reportados como degradadores de hidrocarburos en suelos antárticos (Hughes y col., 2007; Margesin y col., 2003). Esto demuestra que aun los suelos contaminados con hidrocarburos de áreas de clima frío extremo poseen una diversidad microbiana apropiada para aprovechar esta capacidad biotecnológica y afrontar procesos de biorremediación eficientes.

Además de contener un gran número de microorganismos capaces de remediar el suelo, es importante que dichos organismos presenten una apropiada actividad biológica al momento de afrontar un proceso de biorremediación. Varios métodos se usan en la actualidad a fin de determinar cuál es el grado de actividad que presentan los organismos de un suelo. Algunos métodos directos involucran la cuantificación de genes específicos, codificantes de enzimas involucradas en mecanismos de degradación conocidos (como por ejemplo, *nafA*). Otras formas de inferir de manera más indirecta y simple la actividad biológica incluyen la respirometría y la determinación de actividad enzimática total del suelo. La respirometría se basa en la determinación del consumo de O<sub>2</sub> y la producción de CO<sub>2</sub> en procesos aeróbicos, infiriendo de esa forma indirecta el metabolismo de los organismos del suelo. La actividad enzimática total, por otro lado, abarca una medición indirecta en la que se suministra un sustrato pasible de ser metabolizado por enzimas extracelulares (proteasas, lipasas, etc.). El producto de tal metabolismo es determinado mediante algún método (por ejemplo, espectroscopía UV-visible) que permita refrendar de manera indirecta el aumento o disminución de la actividad en el suelo. Este suele ser un método comparativo, usado en general para procesos a lo largo del tiempo, en los que se expresan los resultados permanentemente en comparación a los valores a tiempo inicial.

Basados en los antecedentes arriba expuestos acerca de la presencia de contaminantes derivados del petróleo en suelos antárticos, así como de la existencia en los mismos de diversos microorganismos capaces de tolerar y degradar dichos contaminantes, se ha asumido que la recuperación de esos suelos es, desde una perspectiva microbiológica, factible. Por ello, se ha llevado adelante el presente trabajo de tesis, con el objetivo de desarrollar y optimizar procesos de biorremediación que ayuden a reducir los niveles de combustibles presentes en los suelos de las bases antárticas argentinas.



## 2. Hipótesis y objetivos



“El experimentador que no sabe lo que está buscando  
no comprenderá lo que encuentra”

*Claude Bernard*

### 2.1. Hipótesis

El trabajo realizado en esta tesis se basa en las siguientes **hipótesis**:

- Existe una combinación de variables fisicoquímicas que maximiza la remoción biológica de hidrocarburos de suelos contaminados.
- La metodología de superficie-respuesta es una herramienta adecuada para aproximarse a los valores óptimos de esa combinación de variables.
- Esa combinación de variables es dependiente de la concentración inicial de los contaminantes en el suelo a biorremediar.
- La estructura de la comunidad bacteriana presente en los suelos contaminados se ve modificada durante los procesos de biorremediación.
- Existen en el suelo microorganismos autóctonos con capacidad para degradar los hidrocarburos más recalcitrantes, así como productos de su metabolismo (biosurfactantes) que pueden mejorar la remoción de estos contaminantes en procesos de biorremediación.
- El escalado del proceso para su aplicación in situ incorpora nuevas variables que modifican la eficiencia de la remediación.

### 2.2. Objetivos

El **Objetivo General** de este trabajo es el desarrollo de un proceso de biorremediación optimizado e integral para suelos antárticos impactados por el derrame de combustibles derivados del petróleo, aplicando la metodología de superficie-respuesta en una etapa inicial, y posteriormente evaluando la eficiencia del tratamiento "*in-situ*" en condiciones operativas reales en Antártida.

En función de este Objetivo General se proponen los siguientes **Objetivos parciales**:

1) *i) Optimizar, utilizando la metodología estadística de superficie de respuesta, los valores de algunas de las variables fisicoquímicas clave (nivel de nitrógeno y de fósforo) de un proceso de biorremediación de suelos antárticos contaminados con hidrocarburos.*

*ii) Evaluar la validez de la relación óptima obtenida en suelos conteniendo diferentes niveles iniciales de hidrocarburos.*

Se espera que la aplicación de niveles optimizados de estas variables resulte en eficiencias de remoción maximizadas. Definidos los valores óptimos de las variables fisicoquímicas clave, el objetivo será proponer una segunda etapa de tratamiento basado en el conocimiento de la identidad química de los hidrocarburos y de la composición de la flora microbiana que persistieron luego del tratamiento de biorremediación optimizado inicial.

2) *Cuantificar por CG o FTIR y luego identificar por CG-MS los hidrocarburos remanentes en el suelo resultante luego de la realización del tratamiento de biorremediación primario optimizado para el cual se hayan obtenido las mayores eficiencias de remoción.*

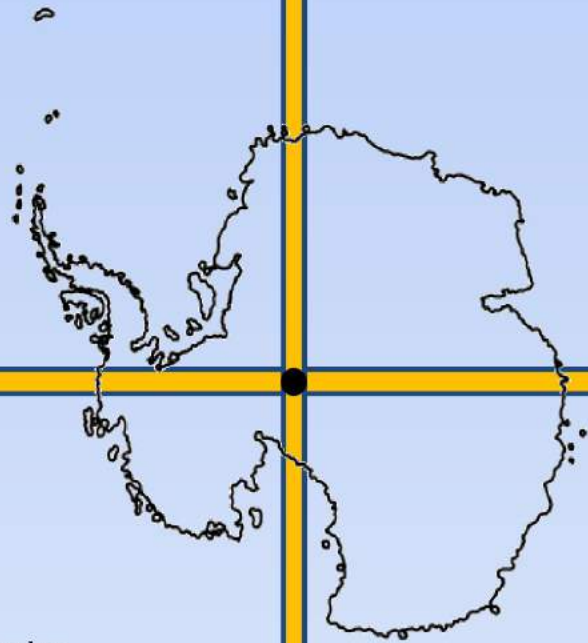
3) *Caracterizar taxonómicamente la flora microbiana que permanece el suelo luego del tratamiento de biorremediación primario.*

El conocimiento de la identidad química de los hidrocarburos y de la composición de la flora microbiana que persisten al final de un tratamiento de biorremediación estándar es crucial para proponer una segunda etapa de tratamiento que apunte directamente a los compuestos persistentes que no lograron ser removidos con el primer proceso de biorremediación.

4) *Desarrollar herramientas biológicas específicas (cepas y/o consorcios) para la remoción de la fracción remanente de hidrocarburos que permanece en el suelo luego del tratamiento de biorremediación primario basado en bioestimulación.*

5) *Proponer y realizar procesos de biorremediación de suelos antárticos contaminados con hidrocarburos a escala piloto en condiciones operativas reales. Evaluar su desempeño y reconocer cuales son las variables que afectan su eficiencia.*

### **3. Optimización de la estrategia de bioestimulación usando la Metodología de Superficie de Respuesta**



“Ah...ahora se puede demostrar todo con las estadísticas... 40% de la gente lo sabe”

*Homero Simpson*

### **3.1. Introducción**

#### **3.1.1. Variables ambientales y su relevancia en procesos de biorremediación**

La influencia de las variables ambientales es clave sobre la eficiencia final de un proceso de biorremediación. Como se describió en la Sección 1.7, la biorremediación es una estrategia adecuada para recuperar suelos disminuyendo el nivel de los contaminantes (Ruberto y col., 2003; Chagas-Spinelli y col., 2012), particularmente en ambientes geográficamente aislados. Pasivos ambientales generados en tiempos en que la seguridad en el manejo de combustible era desatendida, así como los nuevos eventos de contaminación, requieren del desarrollo de protocolos simples de remediación, aplicables en sitios donde la disponibilidad de maquinaria e instalaciones es escasa. Debido a su naturaleza biológica, la biorremediación es dependiente de varios factores fisicoquímicos, como ser la temperatura y el contenido de humedad del suelo. Por ende, como fue previamente mencionado, el desarrollo de protocolos de biorremediación debe considerar las características del sitio a ser aplicado. Estos factores incluyen las características propias del suelo, el clima, la disponibilidad de agua, la presencia de vegetación y el terreno (Ruberto y col., 2013).

El suelo es una matriz compleja, tanto desde el punto de vista fisicoquímico como biológico. Esta afirmación se vuelve particularmente cierta para sitios contaminados, donde los compuestos pueden variar desde sustancias inertes hasta moléculas orgánicas o inorgánicas altamente tóxicas (PCB's, Mercurio, etc.). Asimismo, la concentración de nutrientes como el Nitrógeno o el Fósforo biodisponibles, el contenido de materia orgánica total, los niveles de O<sub>2</sub> y la amplitud térmica a la que cada suelo está expuesto puede diferir considerablemente entre suelos. Todas estas variables fisicoquímicas deben ser tomadas en consideración cuando se intenta desarrollar un proceso de biorremediación, especialmente cuando se busca perturbar lo menos posible el ambiente.

Los organismos vivos contribuyen a la complejidad del suelo como matriz. Se ha estimado que un gramo de suelo puede contener hasta 10<sup>10</sup> -10<sup>11</sup> bacterias (Horner-Devine y col., 2003), comprendidas entre 6.000 y 40.000 especies distintas (Curtis y col., 2002). Las estimaciones se refieren también a los hongos, los cuales pueden alcanzar hasta 200 metros de hifas por gramo de suelo (Leake y col., 2004). Aunque el continente antártico presente una biodiversidad microbiana menor a la de otras regiones, estos números evidencian claramente el potencial biológico del suelo, y presupone una capacidad catabólica muy amplia para la realización de procesos de biorremediación. En este sentido, los suelos antárticos han demostrado contener una diversidad microbiana adecuada para alcanzar niveles satisfactorios de remoción de contaminantes orgánicos (Genovese y col., 2008; Margesin y col., 2013). Por ello,

la bioestimulación ha probado ser una de las estrategias más simples y baratas, al tomar ventaja de la gran cantidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos contenidas globalmente en el suelo, arena y sedimentos (Bragg y col., 1994; Harayama y col., 2004; Head y col., 2006). Respecto a la adición de nutrientes, muchas relaciones C:N:P diferentes fueron consideradas como de referencia a lo largo de los años (Waksman, 1927; Redfield, 1963; Brown, 1983; Morgan y Watkinson, 1989; Zhou y Crawford, 1995; Dong, 2015). Sin embargo, a fin de obtener resultados óptimos, esta relación debe ser testeada cada vez que se considere la realización de un proceso de biorremediación, debido a que cada suelo tiene su propia diversidad biológica intrínseca, así como también condiciones fisicoquímicas diferentes que influyen sobre la disponibilidad de esos nutrientes y, en consecuencia, sobre la eficiencia de la bioestimulación. La importancia de estas consideraciones se vuelve claramente visible cuando se le provee al suelo de un exceso de nutrientes, lo que frecuentemente resulta en la inhibición de la actividad biológica (Liu y col., 2011). Por esta razón, la optimización de esta estrategia es un paso clave previo a una aplicación a campo.

### **3.1.2. Diseño experimental estadístico**

Generalmente, en las aplicaciones industriales de los diseños experimentales, se suele iniciar un enfoque de experimentación secuencial con el objetivo de encontrar las condiciones operativas óptimas para el desarrollo de un proceso (Box y Wilson, 1951). Para lograr eso, la búsqueda empieza con experimentos basados en **diseños factoriales completos**, cuyo objetivo es encontrar aquellos factores que tienen una incidencia significativa sobre la respuesta. Esto resulta muchas veces en experimentos que requieren un enorme número de unidades experimentales, haciendo dificultoso su desarrollo, ya sea por el tiempo que implican, como así también por los costos que puede conllevar incluir tantas unidades experimentales.

Una alternativa muy útil y frecuentemente utilizada en las ciencias biológicas es el de utilizar **diseños factoriales incompletos** (Almeida Bezerra y col., 2008). En este tipo de diseño experimental, uno de los factores es "abreviado" (en inglés, "aliased") para reducir la cantidad de experimentos a  $2^{k-1}$ , donde  $k$  es el número de factores a estudiar. Esta reducción se logra, matemáticamente, al emparejar uno de los factores en estudio, con la interacción que puedan llegar a tener los otros factores combinados. El resultado directo de emplear esta estrategia es la reducción del número de experimentos a realizar, pero obteniendo prácticamente la misma información del sistema en estudio. De esta forma, un experimento que pretenda estudiar el

efecto de 3 factores en 2 niveles supondría la realización de 4 unidades experimentales utilizando un diseño factorial incompleto, en lugar de las 8 que requeriría el completo; otro que implique 4 factores en 2 niveles solo necesitaría 16 (en lugar de 32) y así sucesivamente. Esta elección en el diseño es frecuentemente utilizada cuando se desea realizar una evaluación del sistema en estudio, al determinar cuáles son aquellos factores significativos y cuáles pueden ser obviados en la consecución de la optimización.

Al reducir la cantidad de experimentos que se deben realizar para estudiar el sistema, esta estrategia permite además realizar una búsqueda secuencial de un valor óptimo en la respuesta deseada. Una vez localizada la región en la cual se espera encontrar la mayor respuesta, se procede a elegir diseños estadísticos más extensivos, que brinden profundidad en el detalle de la zona en la que se encuentra el valor óptimo.

Sin embargo, muchas veces las búsquedas de secuencialidad requieren demasiado tiempo experimental, generando que la escala de tiempo se torne en un factor limitante (esto sucede, por ejemplo, en muchos campos biológicos). Es por eso que con frecuencia se utiliza información recopilada de estudios previos para acortar los tiempos de experimentación, buscando los valores óptimos de respuesta en campos cercanos a los que previamente fueron referidos como óptimos.

### 3.1.3. ¿Cómo optimizar?

Es habitual en el mundo de las ciencias naturales el uso de herramientas estadísticas. Estas son utilizadas frecuentemente con el propósito de demostrar que el trabajo realizado presenta respuestas que son causadas por el tratamiento aplicado, y no por mero azar. La disponibilidad de métodos estadísticos que demuestren la robustez de un sistema abundan en las ciencias biológicas (ANOVA, Test de Student, Test de Pearson, métodos no paramétricos, etc.). Todos estos estudios se realizan una vez obtenidos los resultados de los experimentos realizados, y el éxito o fracaso de los ensayos son evaluados en torno a dichos resultados. Sin embargo, a la hora de buscar optimizar condiciones es necesario realizar otro tipo de evaluación. El diseño del experimento se vuelve indispensable, y debe realizarse teniendo en cuenta el tipo de respuesta esperada. La estadística, en este caso, debe emplearse **antes** de la realización de los experimentos.

La **optimización** de las variables de un proceso en el ámbito científico suele realizarse como prueba y error. Se prueban distintos niveles de una variable, se encuentra el que mejor resultado otorga y se pasa a la siguiente variable. Una vez encontrados esos niveles, que en

teoría proveen los mejores resultados para todas las variables, se concluye que las condiciones ya fueron optimizadas.

Esta metodología de “optimización” presenta una clara desventaja, que en casi ningún caso es subsanada: no contempla los efectos que las **interacciones entre variables** pueden causar sobre el resultado final. En la mayoría de los casos es un error analizar los efectos de las variables sin analizar el efecto que las interacciones entre ellas tienen sobre la eficiencia final de un proceso. Muchas veces, por el contrario, las respuestas evaluadas dependen fuertemente de condiciones combinadas de las variables evaluadas, efecto que no resulta significativo si se evalúan los factores por separado.

Esta omisión es habitualmente subsanada en la industria. Los procesos industriales suelen ser optimizados mediante técnicas estadísticas que permitan la evaluación de la interacción entre las variables estudiadas. El objetivo es encontrar una combinación de variables óptimas, que reduzcan los costos del proceso, y garanticen el mejor rendimiento posible. De esta manera, se analiza una cierta cantidad de variables controlables, en distintos niveles, teniendo en cuenta además como la interacción entre ellas afecta el rendimiento final.

En este punto es donde el **diseño del experimento** cobra vital importancia. Tanto en la industria como en el campo de la biotecnología, es indispensable buscar la mayor cantidad de información posible de un experimento determinado, y que a la vez su realización sea sencilla. La búsqueda debe estar entonces en disponer de un número manejable de unidades experimentales, que sean estadísticamente representativas del subconjunto en estudio y que provean la mayor cantidad de información posible al investigador, en el menor número posible de experimentos.

La **Metodología de Superficie de Respuesta** (RSM) cumple con todos esos requisitos. Es una combinación de herramientas matemáticas y estadísticas utilizadas para la predicción de valores óptimos en sistemas multivariados en los que una respuesta de interés se encuentra influenciada por varios factores de carácter cuantitativo y, posiblemente, por la interacción entre alguno de ellos. El objetivo final es encontrar los valores de esos factores que optimizan el valor de la variable respuesta. El método requiere de un número limitado de experimentos, convirtiéndola en un proceso de optimización simple y factible. Es usada ampliamente para la optimización de procesos productivos biológicos e industriales (Chauhan y col., 2013; Wang y col., 2014; Wu y col., 2014), y no tan ampliamente en las ciencias biológicas para estudiar el efecto de la interacción de factores sobre una determinada respuesta, como puede ser la interacción de las concentraciones de N y P en el crecimiento vegetal (Kuehl, 2001). Es también una herramienta útil para la optimización de procesos de biorremediación tanto en sedimentos (Mohajeri y col., 2011), como en suelos (Gomez y Sartaj, 2014).



### 3.1.4. Metodología de Superficie de Respuesta (RSM)

#### 3.1.4.1. Generalidades

La RSM presenta muchas ventajas a la hora de diseñar experimentos. Permite la evaluación de un gran número de variables en distintos niveles simultáneamente. Es muy versátil en cuanto al número de unidades experimentales y permite visualizar las respuestas obtenidas para todos los valores de los factores.

Entre las ventajas que brinda se puede remarcar que:

- 1) Provee una distribución razonable de los puntos de muestreo (y por lo tanto información) a través de toda la región de interés
- 2) Permite la adecuación del modelo, incluyendo la falta de ajuste (en inglés: "*lack of fit*") a calcular
- 3) Permite la realización del experimento en bloques
- 4) Provee una estimación del error interno
- 5) Otorga valores estimados precisos de los coeficientes del modelo
- 6) Permite la realización de diseños de orden más alto secuencialmente
- 7) Provee un buen perfil de predicción de la varianza a través de toda la región experimental
- 8) Provee una robustez razonable frente a *outliers* o valores faltantes
- 9) No requiere de una alta cantidad de unidades experimentales
- 10) No requiere de muchos niveles de la variable independiente
- 11) Asegura simplicidad en el cálculo de los parámetros del modelo

Cuando decimos que el valor real esperado,  $\eta$ , que toma la variable de interés considerada está influido por los niveles de  $k$  factores cuantitativos,  $X_1, X_2, \dots, X_k$ , esto significa que existe alguna función de  $X_1, X_2, \dots, X_k$  (que se supone continua en  $X_i, \forall i = 1, \dots, k$ ) que proporciona el correspondiente valor de  $\eta$  para alguna combinación dada de niveles:

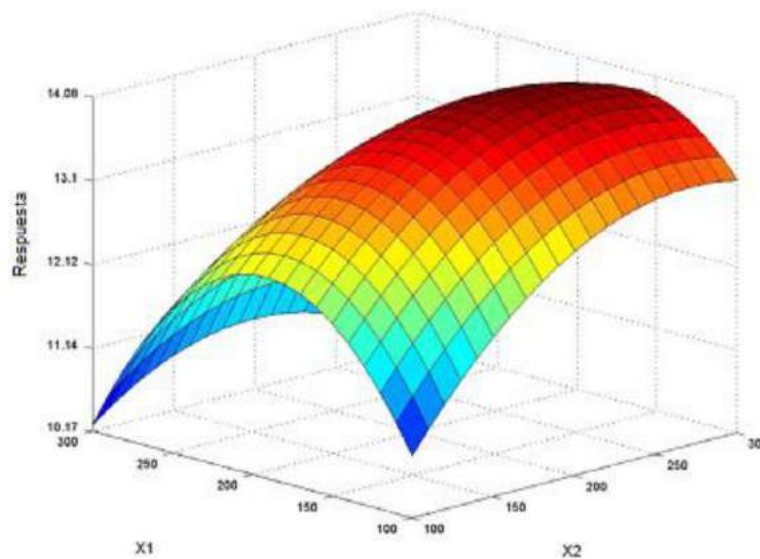
$$\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$$

de tal forma que la variable respuesta puede expresarse como:

$$Y = \eta + \varepsilon = f(X_1, X_2, \dots, X_k) + \varepsilon$$

donde  $\varepsilon$  es el error observado en la respuesta.

La relación  $\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$  existente entre  $\eta$  y los niveles de los  $k$  factores puede representarse a través de una hipersuperficie (subconjunto de un espacio euclídeo  $(k+1)$ -dimensional) a la que llamaremos superficie de respuesta.



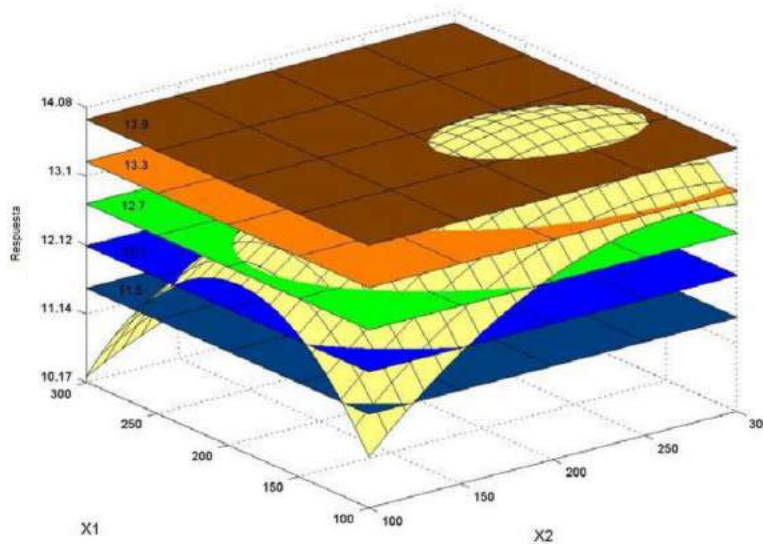
**Figura 3.1.** Superficie de respuesta tridimensional en la que se observa una respuesta esperada ( $\eta$ ) en función de las cantidades de variable A ( $X_1$ ) y variable B ( $X_2$ ) utilizadas. Adaptado de Fernández Melcón.

En el ejemplo ilustrado en la Figura 3.1, en que hay dos factores de influencia ( $k=2$ ), la superficie de respuesta se visualiza en un espacio en el que la tercera dimensión representa la respuesta a evaluar, sobre un plano bidimensional definido por la combinación de los niveles de dos factores,  $X_1$  y  $X_2$ .

Una técnica utilizada para ayudar a visualizar la forma que puede tener una superficie de respuesta tridimensional consiste en representar la gráfica de contornos de la superficie (Figuras 3.2 y 3.3), en la que se trazan las denominadas líneas de contorno, que son curvas correspondientes a valores constantes de la respuesta sobre el plano  $X_1X_2$  (plano cuyos ejes coordenados vienen dados por los niveles  $X_1$  y  $X_2$  de los factores). Geométricamente, cada línea de contorno es una proyección sobre el plano  $X_1X_2$  de una sección de la superficie de respuesta al intersecar con un plano paralelo al  $X_1X_2$ . La gráfica de contornos resulta útil para estudiar los

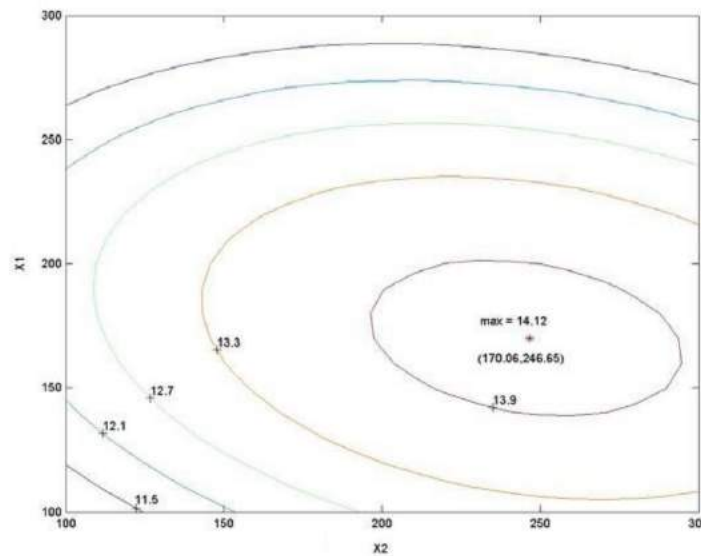
niveles de los factores en los que se da un cambio en la forma o altura de la superficie de respuesta.

La existencia de gráficas de contorno no está limitada a 3 dimensiones a pesar de que en el caso en que haya más de 3 factores de influencia no es posible la representación geométrica. No obstante, el hecho de poder representar gráficas de contorno para problemas en que haya 2 o 3 factores permite visualizar más fácilmente la situación general.



**Figura 3.2.** Sección de la superficie de respuesta por planos paralelos al plano  $X_1X_2$ , en los valores esperados de respuesta: 11.5, 12.1, 12.7, 13.3, 13.9. Adaptado de Fernández Melcón.

Cada línea de contorno representa un número infinito de combinaciones de los valores de las dos variables, para un mismo valor de respuesta. La respuesta máxima, por su parte, se localiza en el centro de la elipse más pequeña:



**Figura 3.3.** Gráfica de contornos de la superficie de respuesta con líneas de contorno correspondientes a los valores esperados de respuesta: 11.5, 12.1, 12.7, 13.3, 13.9. Adaptado de Fernández Melcón.

Los polinomios usados más frecuentemente como funciones de aproximación son los de orden dos, representado en el siguiente modelo:

$$Y = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_j X_j + \beta_{ij} X_i X_j + \beta_{ii} X_i^2 + \beta_{jj} X_j^2$$

Donde  $\beta_0$  es el valor de la respuesta en el punto central del diseño,  $\beta_i$  y  $\beta_j$  representan los coeficientes lineales, y  $\beta_{ii}$  y  $\beta_{jj}$  son los coeficientes cuadráticos.  $\beta_{ij}$  es el coeficiente interacción.  $X_i$  y  $X_j$  representan las variables independientes,  $X_i X_j$  representan el efecto de la interacción entre las variables independientes, y  $X_i^2$  y  $X_j^2$  son los efectos cuadráticos de cada variable independiente.

El primer paso a realizar es la elección de los factores que se desean evaluar en el experimento. Esto dependerá exclusivamente de la información previa de la que se disponga y de la información que se busca obtener en el trabajo. Esa información es la que hará delimitar los valores de los factores en un margen de interés, dado por los datos provistos por trabajos previos, o porque meramente es el área en la que se desea testear las hipótesis. Conocido esto, el siguiente paso es seleccionar los rangos de valores de cada factor que se considerarán pues, aunque en el experimento es posible explorar la región correspondiente al espacio completo de los factores de influencia o **región operativa**, lo más frecuente consiste en explorar únicamente una región de interés limitada, la **región experimental**, contenida en la región general. De este modo, durante la ejecución del experimento, sólo se utilizarán valores de los factores que caigan en esta región.

Puede suceder que se descubra, durante el conjunto inicial de experimentos, que es necesario explorar niveles que estén más allá de los límites de la región considerada, ya que la respuesta máxima no se encontró dentro de la región operativa elegida. En esos casos, hay varias herramientas matemáticas que permiten analizar qué camino seguir, basándose en la búsqueda de una respuesta máxima para el sistema en estudio.

### 3.1.4.2. Codificación de variables

En la utilización de modelos de Superficie de Respuesta, muy frecuentemente es condición necesaria la codificación de los valores reales de los niveles de los factores, ya que la distancia medida sobre los ejes de las variables se estandarizan. Esto facilita la realización de los cálculos necesarios para obtener el modelo matemático que ajusta al sistema y además aumenta el ajuste en la estimación de los coeficientes del mismo.

Entonces, la codificación de las variables se realiza de acuerdo a la siguiente fórmula (1):

$$X_i = \frac{Z_i - \left(\frac{Z_{inf} + Z_{sup}}{2}\right)}{Z_{sup} - Z_{inf}} \equiv \frac{(Z_i - Z_o)}{\Delta Z_i}$$

$$i = 1, 2, \dots, k$$

Donde  $X_i$  es el resultado del valor codificado;  $Z_i$  es el valor real en el punto superior o inferior del diseño;  $Z_o$  es el valor real en el punto central del diseño (o promedio entre el valor real superior  $Z_{sup}$  y el inferior  $Z_{inf}$ ) y  $\Delta Z_i$  es la distancia entre los valores reales superior o inferior con respecto al punto central. Esta fórmula verifica que la sumatoria de los valores de  $X_i$  ( $\sum_{i=1}^k X_i = 0$ ) son aquellos valores  $Z_o$ ; y determinan el **centro del diseño** (0, 0).

A continuación se detalla un ejemplo del uso de codificación de variables en trabajos científicos:

**Tabla 3.1.** Valores reales y codificados para cada sistema experimental utilizado. Diseño central compuesto adaptado de Agarry y col., 2012.

Sistema	Fertilizante NPK (A)		Tween 80 (B)		H2O2 (C)	
	Valor codificado	Valor real (g)	Valor codificado	Valor real (g)	Valor codificado	Valor real (g)
1	-1	2	-1	5	0	1,0
2	1	6	-1	5	0	1,0
3	-1	2	1	15	0	1,0
4	1	6	1	15	0	1,0
5	-1	2	0	10	-1	0,5
6	1	6	0	10	-1	0,5
7	-1	2	0	10	1	1,5
8	1	6	0	10	1	1,5
9	0	4	-1	5	-1	0,5
10	0	4	1	15	-1	0,5
11	0	4	-1	5	1	1,5
12	0	4	1	15	1	1,5
13	0	4	0	10	0	1,0
14	0	4	0	10	0	1,0
15	0	4	0	10	0	1,0
16	0	4	0	10	0	1,0
17	0	4	0	10	0	1,0
18 (control)	-	-	-	-	-	-

Para obtener los valores codificados de la Tabla 3.1, se utilizó la fórmula (1). Así como ejemplo para obtener el valor codificado del sistema experimental 7 (-1, 0, 1) para el agregado de Fertilizante NPK se obtiene:

$$X_i = (2 - 4) / 2 = -1$$

-1 Es el valor codificado del valor real que corresponde a 2 g de NPK agregado.

$$X_i = (4 - 4) / 2 = 0$$

0 es el valor codificado del valor real que corresponde a 4 g de NPK agregado.

$$X_i = (6 - 4) / 2 = +1$$

+1 es el valor codificado del valor real que corresponde a 6 g de NPK agregado.

### 3.1.5. Optimización de N y P

En la misma línea, el éxito de los procesos de biorremediación dependerá muchas veces (sino todas) de una correcta y eficiente optimización de las variables ambientales que rigen los experimentos. Como se mencionó anteriormente, la disponibilidad que el suelo tenga de O<sub>2</sub>, la temperatura, la conductividad eléctrica entre otras, son variables de peso para el éxito del proceso (Sección 1.7.1). Sin embargo, para muchos de los procesos de índole biológica que involucre directamente el crecimiento de microorganismos, las variables más relevantes son, sin duda, las concentraciones de Nitrógeno y Fósforo presentes en el suelo a remediar (Vieria y col., 2009; Zahed y col., 2010). Proveer al sistema biológico con estos macronutrientes es lo que conducirá a desarrollar un proceso relativamente simple y de bajo costo (Bento y col., 2005). No debe olvidarse sin embargo, que la optimización de los niveles de estos nutrientes es un paso clave para alcanzar la eficiencia deseada, ya que tanto un defecto como un exceso de los mismos puede conducir a una inhibición de la actividad biológica, resultando en eficiencias de degradación muy inferiores a aquellas consideradas óptimas.

Una relación Carbono: Nitrógeno: Fósforo (C:N:P) de 100:10:1 ha sido reportada frecuentemente como valor de referencia para ensayos de bioestimulación (Dibble y Bartha, 1979; Cheng y Mulla, 1999). Sin embargo, esta relación debe ser considerada sólo como un valor guía. La concentración óptima de nutrientes debe ser testeada cada vez que se considera el

desarrollo de un proceso de biorremediación, ya que las soluciones universalmente aplicables no son válidas para sistemas biológicos tan complejos como son los suelos (Ruberto y col., 2013), no solo por las características del sistema biológico a implementar, sino también debido a que distintos suelos presentan distintas propiedades fisicoquímicas (como ser la concentración basal de N y P, la capacidad de campo, la conductividad eléctrica, la granulometría), que pueden alterar los resultados esperados.

Muchos autores han reportado altas eficiencias de remoción de hidrocarburos, en distintos sistemas, utilizando diferentes relaciones C:N:P (Coulon y col., 2004; Rojas-Avelizapa y col., 2007; Vieira y col., 2009; Chang y col., 2011). En muchos de estos casos, esa relación difirió considerablemente de aquella previamente utilizada como referencia, lo que evidencia la necesidad de un proceso de optimización previo. Por otro lado, y más allá de la eficiencia del proceso de biodegradación, el agregado de cantidades excesivas de N puede conllevar un aumento exagerado de los costos, puede inhibir la actividad microbiana natural e implicar un potencial peligro de eutrofización de las matrices tratadas.

### **3.2. Materiales y métodos**

#### **3.2.1. Análisis y caracterización del suelo**

El suelo usado para el ensayo de RSM fue obtenido durante la Campaña Antártica Argentina 2011-2012, del área circundante a los tanques de acopio de combustible en la Base Carlini, Isla 25 de Mayo, Shetlands del Sur, Antártida. El suelo contaminado fue recolectado de la capa superficial (hasta los 20 cm de profundidad) y tamizado (grilla de 10 mm) para remover piedras, concreto, residuos de pintura y cualquier otro material que puede interferir con las determinaciones analíticas. Al suelo también se le analizó la textura, a través del método de pipeta (Gee y Bauder, 1986), carbono orgánico (Walkley y Black, 1934), fósforo extractable (Bray y Kurtz, 1945) y nitrógeno total por Kjeldhal. El contenido de agua fue determinado gravimétricamente por secado de las muestras a 105°C por 24hrs. Para la determinación del pH del suelo, se agregaron 10ml de solución salina estéril ( $\text{NaCl } 8,9\text{g l}^{-1}$ ) a una muestra de 1 g de suelo y se agitó en vortex durante 1 minuto. Luego de dejar decantar, el pH de la suspensión resultante se determinó usando un equipo Docu pH+ meter (Sartorius).



### 3.2.2. Diseño de microcosmos

El suelo tamizado se distribuyó en frascos cilíndricos de vidrio (65 mm de diámetro, 80 mm de alto), conteniendo 150 g de suelo en cada uno. Diferentes volúmenes de soluciones de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  fueron agregados a fin de lograr en el suelo las concentraciones de N y P calculadas y codificadas de acuerdo a la fórmula 1 y los valores se muestran en la Tabla 3.2. Los nutrientes fueron agregados a cada sistema, siguiendo la distribución de acuerdo a un diseño central compuesto centrado en las caras, y considerando como punto central aquella relación C:N:P igual a 100:10:1. Este diseño permitió a su vez incluir un control no bioestimulado (-1,-1), que evalúa el grado de remoción ocasionada por evaporación y por atenuación natural. Además, la extensión del diseño fue buscada para incluir una relación C:N:P que sea el doble que aquella considerada referencia (100:20:2) en el sistema +1,+1. De esta manera, el factorial centrado en las caras consideró un área experimental razonable y criteriosa, buscando garantizar la existencia de un valor máximo de remoción dentro de dicha área, sin la necesidad de realizar más ensayos o factoriales que extiendan el área experimental.

Para la adición de nutrientes, una solución que contenía  $286 \text{ g l}^{-1}$  de nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) fue utilizada como fuente de N, mientras que una conteniendo  $580 \text{ g l}^{-1}$  de fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) fue usada como fuente de P. Los frascos fueron conservados isotérmicamente a  $15^\circ\text{C}$  en una cámara de cultivo (New Brunswick Scientific Co., Inc.) durante todo el periodo experimental (80 días). El contenido de cada frasco fue mezclado asépticamente 3 veces por semana para asegurar una distribución homogénea de nutrientes y contaminantes, así como una correcta aireación del suelo. La humedad fue monitoreada con un datalogger (Decagon Devices Inc.) y mantenida alrededor de 15% mediante agregado de agua de ser necesario.

**Tabla 3.2.** Valores reales y codificados para cada sistema experimental utilizado. Diseño central compuesto.

Sistema	Variables independientes			
	g N agregado/ kg suelo		g P agregado / kg suelo	
	Valor codificado	Valor real	Valor codificado	Valor real
1	1	0,2	-1	0
2	0	0,1	0	0,01
3	0	0,1	0	0,01
4	1	0,2	1	0,02
5	-1	0	1	0,02
6	0	0,1	-1	0
7	0	0,1	0	0,01
8	1	0,2	0	0,01
9	-1	0	-1	0
10	0	0,1	0	0,01
11	0	0,1	0	0,01
12	0	0,1	0	0,01
13	-1	0	0	0,01
14	0	0,1	1	0,02

### 3.2.3. Actividad biológica

Los hidrocarburos del petróleo derramados en los suelos representan una fuente directa de sustrato para bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH). Sin embargo, también pueden resultar en una fuente indirecta para otras bacterias que no son capaces de degradar hidrocarburos, pero que pueden incorporar sus metabolitos u otras moléculas provenientes del catabolismo mediado por las BDH. Esta actividad favorece la remoción de hidrocarburos del petróleo, impulsando los balances estequiométricos hacia la degradación.

La determinación de la actividad biológica y su comparación entre tratamientos es una herramienta útil para seguir el desarrollo de procesos biológicos que ocurren en el suelo contaminado. Poder vincular un incremento de la actividad biológica con una disminución de la concentración de hidrocarburos es una señal de que la degradación del contaminante es mediada por la biota del suelo, y no por la mera evaporación. El recuento de bacterias heterotróficas, puede ser considerado un indicador tanto de la "salud" del suelo como de la

biodisponibilidad de nutrientes orgánicos en ese suelo (Pepper y Gerba, 2015), y es utilizado para monitorear procesos de biorremediación (Cai y col., 2010, Zhang y col., 2010). Por otro lado, la hidrólisis del indicador acetato de fluoresceína (FDA) es ampliamente utilizado como una medida general de la actividad biológica de un suelo (Adam y Duncan, 2001). De esta manera, el método del FDA y el recuento en placas de agar R2A son consideradas herramientas adecuadas para estimar la actividad biológica en suelos bajo tratamientos de biorremediación. En este trabajo ambos métodos fueron implementados para determinar la actividad biológica de una forma más precisa.

Para realizar el método del FDA, 2g de suelo fueron incubados (20°C y 200rpm) con 15 ml de una solución de fosfatos (8,7 g l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,3 g l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,6) y 200 µl de una solución de FDA 2000 µg l<sup>-1</sup>. Después de 30 minutos, se agregaron 15 ml de la solución terminadora (Cloroformo:metanol 2:1). Las soluciones fueron centrifugadas por 3 minutos a 479 x g y se determinó su absorbancia. La escisión del FDA llevada a cabo por las exoenzimas microbianas libera fluoresceína a la fase acuosa, la cual posee un color amarillo intenso con un pico de absorbancia a 490 nm, longitud de onda a la cual es determinada espectrofotométricamente.

El número de bacterias cultivables heterotróficas fue determinada mediante la siembra de diluciones seriadas de las muestras en medio R2A (Oxoid) diluido al 50%, de manera de proveer un medio oligotrófico, en concordancia con el bajo contenido de nutrientes orgánicos característico de los suelos antárticos. Las diluciones fueron preparadas mezclando 1 g de suelo tamizado con 10 ml de solución salina (0,9% NaCl) conteniendo 0,01% de Tween 80. La mezcla fue agitada por 15 minutos en un vortex para permitir una separación eficiente de las células microbianas de las partículas de suelo.

#### **3.2.4. Extracción y cuantificación de hidrocarburos**

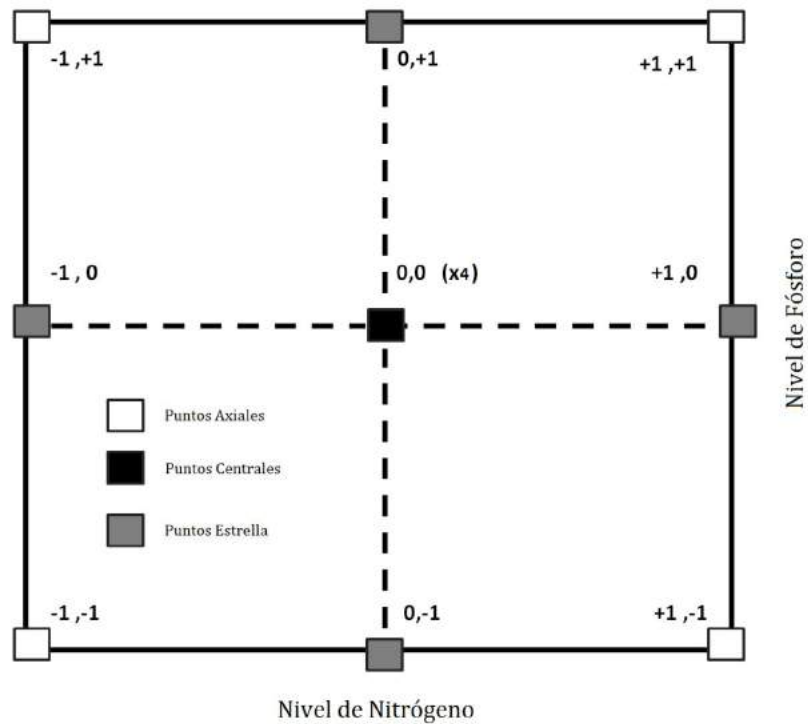
Para la cuantificación de hidrocarburos, muestras de suelo (5 g) fueron extraídas con 40 ml de hexano:acetona (1:1) en tubos de Teflón de 40 ml (Nalgene). Se agregó una punta de espátula de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro a la fase orgánica para remover el agua remanente. Posteriormente, 1 g de Sílica Gel 60 (0,063-0,200 mm, Merck) fue agregado a cada tubo para remover compuestos orgánicos polares. Los frascos fueron agitados (200 rpm) por 3 horas a 25°C. Luego, las muestras fueron centrifugadas (15 min, 7656 x g) para evitar la presencia de partículas de suelo en el sobrenadante. La cuantificación de hidrocarburos se realizó por cromatografía gaseosa utilizando un equipo Shimadzu GC-9<sup>a</sup> (Shimadzu Corp, Japan) con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar de 30m de largo 025mm i.d. (0,25 µm de grosor y 5% de PH

ME siloxano entrecruzado). La temperatura del horno se mantuvo a 100°C por 1 min, luego se incrementó mediante una rampa de 10°C/min hasta 250°C y finalmente se mantuvo a esa temperatura por 5 min. La temperatura del inyector fue 280°C y el flujo de gas portador (He<sub>2</sub>) se fijó en 31cm/s. Los datos fueron obtenidos utilizando el software PC Chrome (UBA). El área total de los picos en el rango C<sub>9</sub>-C<sub>28</sub> fue comparado con sus respectivos estándares (Supelco, Mix de calibración de diésel). La remoción de hidrocarburos fue calculada usando la siguiente ecuación:

$$HR (\%) = 100 \times \frac{cc \text{ inicial de HC} - cc \text{ final de HC}}{cc \text{ inicial de HC}}$$

### 3.2.5. Análisis estadístico

El experimento fue llevado a cabo siguiendo un diseño factorial compuesto de 3 niveles centrado en las caras, considerando 2 variables independientes (concentración de Nitrógeno agregado y concentración de Fósforo agregado al suelo). El diagrama del diseño se muestra en la Figura 3.4. La remoción de hidrocarburos (como porcentaje) fue la respuesta analizada. Cada variable independiente fue codificada y estudiada en 3 niveles (+1, 0 y -1). Se incluyeron 4 puntos centrales (0, 0) para estudiar la robustez del modelo estadístico obtenido, resultando en un total de 12 unidades experimentales. Como se mencionó previamente, los niveles fueron elegidos alrededor de una relación C:N:P de 100:10:1, el cual es considerado valor de referencia para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos (Cheng y Mulla, 1999) y para la síntesis de biomasa a partir de los hidrocarburos (Ron y Rosemberg, 2010).



**Figura 3.4.** Diseño del factorial compuesto centrado en las caras para la determinación de los niveles de N y P que optimizan la degradación de hidrocarburos en el suelo contaminado de Base Carlini.

Para predecir la condición óptima y la existencia de interacciones, los datos experimentales fueron ajustados a un modelo de regresión polinómico de Segundo orden (ecuación 1), conteniendo 2 términos lineales, un término de interacción y dos términos cuadráticos (Mason, 2003).

$$Y = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_j X_j + \beta_{ij} X_i X_j + \beta_{ii} X_i^2 + \beta_{jj} X_j^2 \quad \text{(ecuación 1)}$$

$\beta_0$  representa el valor de la respuesta en el punto central del diseño,  $\beta_i$  y  $\beta_j$  son los coeficientes lineales, y  $\beta_{ii}$  y  $\beta_{jj}$  son los coeficientes cuadráticos.  $\beta_{ij}$  es el coeficiente de interacción.  $X_i$  y  $X_j$  representan las variables independientes (concentración de N y P agregados al suelo, expresados como g kg<sup>-1</sup> respectivamente), el término  $X_i X_j$  representa el efecto de la interacción entre las variables independientes, y  $X_i^2$  y  $X_j^2$  son los efectos cuadráticos de cada variable independiente. La significancia de cada coeficiente en la ecuación fue determinada por un test F y los valores p.

Para cálculos estadísticos, las variables independientes fueron codificadas de acuerdo a la ecuación 2:

$$X_i = (X_i - X_o) / \delta X_i \quad (\text{ecuación 2})$$

Donde  $X_i$  es el valor experimental de la variable,  $X_o$  es el punto central,  $\delta X_i$  es el paso de cambio en  $X_i$ , y  $X_i$  es el valor codificado para  $X_i$ :  $i = -1, 0, +1$ .

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Análisis de suelo

El suelo presentó una textura arenosa, conteniendo 1,8% de arcilla, 3,8% de limo y 94,4% de arena. Los niveles de Carbono orgánico total, Nitrógeno total por Kjeldhal y Fósforo extractable fueron 10,21 g kg<sup>-1</sup>, 0,32 g kg<sup>-1</sup> y 5,0 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente. El pH fue 6,8 y el contenido de agua 10%. La cuantificación de hidrocarburos demostró que este suelo contenía una concentración total de hidrocarburos derivados del petróleo de 1042±73 mg kg<sup>-1</sup>.

#### 3.3.2. Análisis estadístico

El test F indicó que en este diseño experimental sólo los factores  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_1^2$  eran estadísticamente significativos al 95% de confianza. Los efectos (factores e interacciones) con  $p > 0,05$  fueron considerados como insignificantes. Todos los términos, sin importar su significancia, fueron incluidos en la siguiente ecuación (3):

$$Y = 48,57 + 9,03X_1 + 4,54X_2 + 1,99X_1X_2 - 6,38X_1^2 - 3,92X_2^2 \quad (\text{ecuación 3})$$

Donde  $X_1$  y  $X_2$  son las cantidades de N y P agregados al suelo (expresado como g kg<sup>-1</sup>) respectivamente. El valor obtenido de F fue 15,24, lo que implica que el modelo es significativo y que hay solo un 0,23% de posibilidades de que este valor pueda ocurrir debido al ruido ( $p < 0,0023$ ). El coeficiente de determinación ( $R = 0,9270$ ) sugiere que más del 92,70% de la varianza es atribuible a las variables, y por lo tanto demuestra una alta significancia del modelo. Consecuentemente, solo un 7,30% de la varianza total no puede ser explicada por este modelo.

El test de falta de ajuste provee información acerca de lo bien que el modelo ajusta la respuesta del sistema. El estadístico F, el cual es calculado como la relación entre los valores del error medio cuadrado de falta de ajuste (EMCfa) y el error medio cuadrado puro (EMCp), evalúa

la hipótesis de que el modelo está correctamente especificado. Un estadístico F elevado indica que la variación dada por los replicados centrales es demasiado alta, y que el modelo no está ajustando a la respuesta. En el presente estudio, un valor de 0,72 ( $p < 0,05$ ) implica que la falta de ajuste no es significativa respecto al error puro, indicando por lo tanto que el modelo ajusta a la regresión. Todos los datos estadísticos de este modelo obtenidos se muestran en la Tabla 3.3.

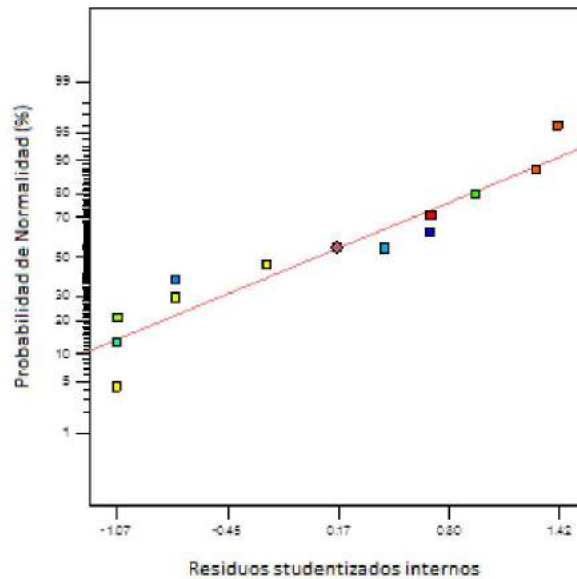
**Tabla 3.3.** Análisis estadístico del modelo que maximiza la respuesta con su grado de significancia.

Fuente	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrado Medio	F Valor	P valor Prob > F	
Modelo	845,42	5	169,08	15,24	0,0023*	significativo
A-A	487,80	1	487,80	43,96	0,0006*	
B-B	124,21	1	124,21	11,19	0,0155*	
AB	16,00	1	16,00	1,44	0,2751	
A <sup>2</sup>	108,80	1	108,80	9,80	0,0203*	
B <sup>2</sup>	40,30	1	40,30	3,63	0,1053	
Residuos	66,58	6	11,10			
Falta de Ajuste	27,98	3	9,33	0,72	0,6012	ns
Error Puro	38,61	3	12,87			
PRESS	254,24	1				
Correlación Total	912,00	1				

Tanto el coeficiente ajustado como el predicho fueron estudiados para evaluar la calidad del ajuste del modelo polinómico para la remoción de hidrocarburos (Montgomery, 2008). El valor predicho de R cuadrado de 0,7212 está razonablemente de acuerdo con el valor de R cuadrado ajustado de 0,8661. Por otro lado, el término “Adequate Precision” mide la relación entre señal y el ruido, siendo lo deseado un valor superior a 4. La relación obtenida de 11,519 indica una señal adecuada.

Los residuos studentizados obtenidos para este modelo (Figura 3.5) muestran una distribución aleatoria en función de las celdas experimentales ensayadas, demostrando la ausencia de sesgos experimentales acorde a los tratamientos. Los residuos se distribuyen de forma equivalente entre positivos y negativos, y con valores absolutos similares. Además, no se observa un sesgo entre los residuos obtenidos para valores de variable respuesta bajos o altos,

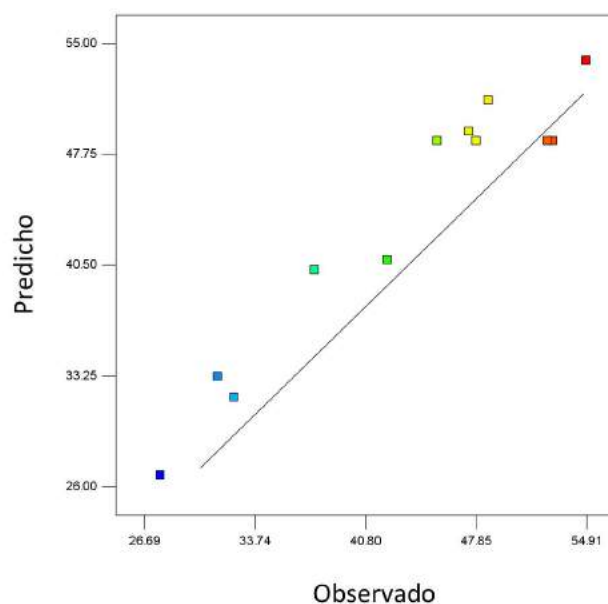
indicando que el error es independiente de los valores obtenidos. Esta distribución es propia de una varianza que sigue una distribución normal y aleatoria. Por otro lado, en la Figura 3.6 se presentan los valores predichos por el modelo en función de los valores obtenidos en los sistemas ensayados. Este gráfico permite observar una buena adecuación de la predicción a los resultados obtenidos en la ejecución de los tratamientos.



**Figura 3.5.** Distribución de los residuos studentizados para el modelo obtenido. La similitud en los colores representa similares valores obtenidos para la variable respuesta analizada.

El coeficiente de variación (CV) es una medida de la variación residual de los datos relativa al tamaño de la media, y por lo tanto, una medida de reproducibilidad del modelo. Se encuentra dividido por la media dependiente y es expresado como porcentaje. Generalmente, un modelo se considera como razonablemente reproducible si el valor de CV es menor al 10%. El bajo valor obtenido (CV=7,67%) indica una alta precisión y confianza en los experimentos realizados.

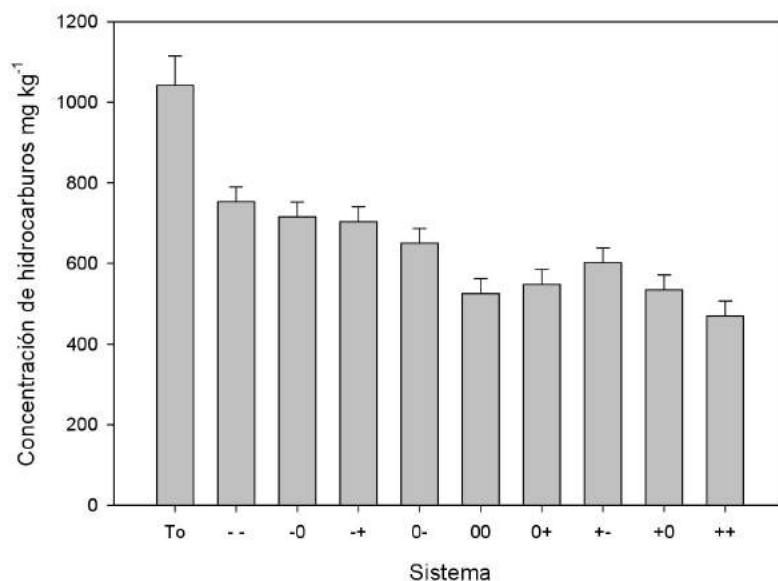




**Figura 3.6.** Valores predichos por el modelo vs valores obtenidos. La similitud en los colores representa similares valores obtenidos para la variable respuesta analizada.

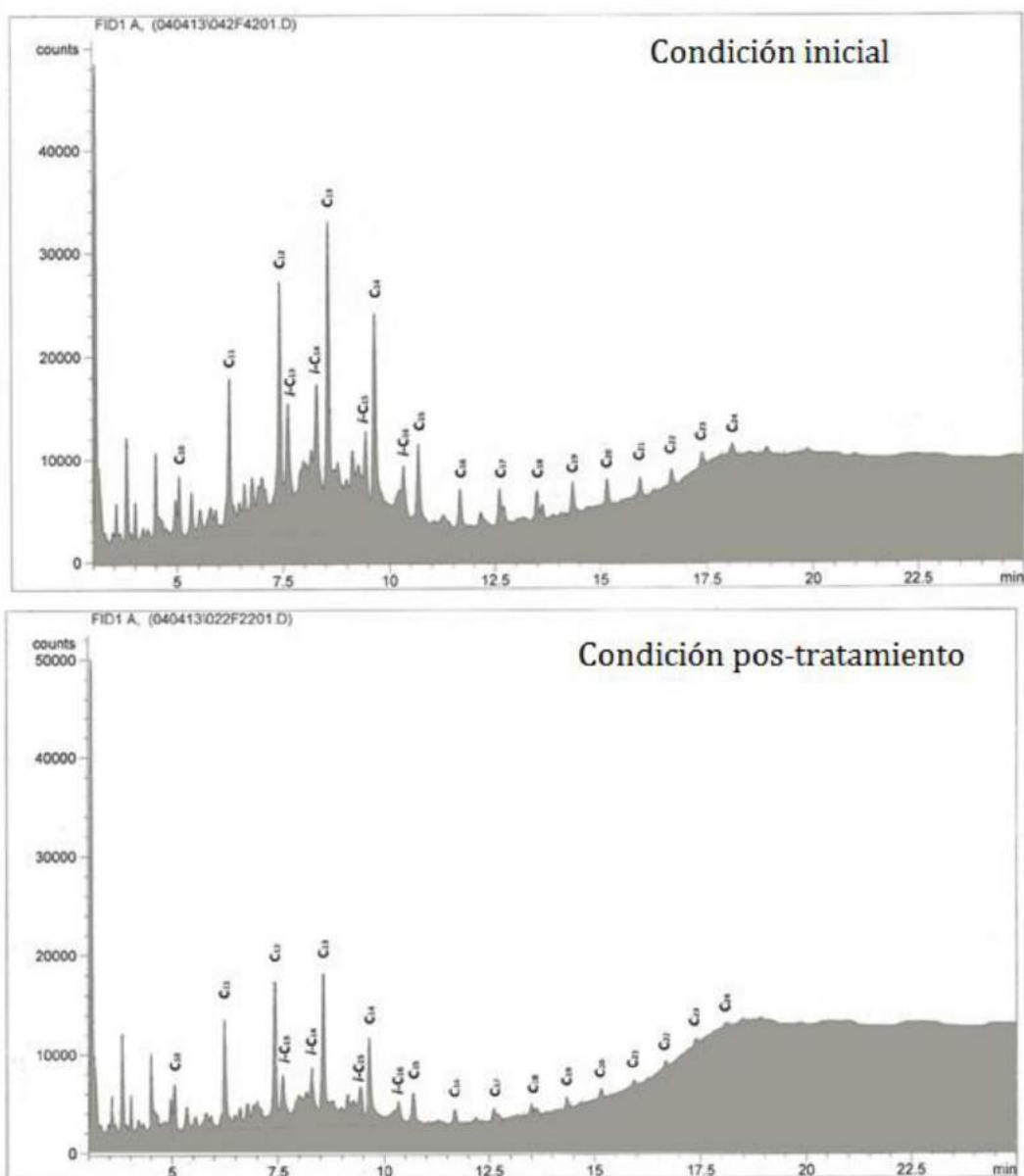
### 3.3.3. Concentración de hidrocarburos

La concentración de hidrocarburos (Figura 3.7) decreció desde un valor inicial de  $1042 \pm 73$  mg kg<sup>-1</sup> hasta un valor de  $470 \pm 37$  mg kg<sup>-1</sup> en el tratamiento más eficiente (54,91% de remoción), mientras que se alcanzó un valor final de  $753 \pm 37$  mg kg<sup>-1</sup> en el menos eficiente (27,75%). Es importante resaltar que algunos de los factores abióticos que contribuyen a la eliminación de hidrocarburos en condiciones no controladas (como ser la lluvia, el viento y la lixiviación), estuvieron ausentes durante este ensayo, ya que fue desarrollado en frascos cerrados incubados en una cámara con temperatura controlada. La pérdida de hidrocarburos por evaporación durante el experimento, estimada a partir de la remoción de i-C<sub>14</sub> demostró ser de 33% ( $\pm 6,4$ ). Los isoprenos de hidrocarburos son compuestos que se asumen menos sensibles a la biodegradación que los n-alcános (Pond y col., 2002). Por esta razón, es posible estudiar la evaporación usando estos compuestos como marcadores. Sin embargo, cierto nivel de biodegradación de isoprenoides no puede ser ignorada, especialmente en suelos habitados por miembros de la familia *Pseudomonadaceae* (Cantwell y col., 1978), frecuentemente predominantes en suelos antárticos. En cualquier caso, el sistema al que no se le agregaron nutrientes (-1,-1) presentó una remoción de sólo 27,75%. Asumiendo la posibilidad menos favorable, esta remoción puede estar enteramente causada por evaporación, sin presencia de degradación biológica.



**Figura 3.7.** Concentración final de hidrocarburos por sistema (ver Tabla 3.2 para referenciar los diferentes sistemas).

El análisis por GC-FID de los hidrocarburos presentes en el suelo, previo a cualquier tratamiento, mostró un patrón en el cual el rango C<sub>11</sub>-C<sub>14</sub> de los hidrocarburos prevalecía en la muestra. También se observó una mezcla no resuelta de hidrocarburos. Luego del ensayo, los sistemas en donde la remoción de hidrocarburos fue máxima presentaban un patrón cromatográfico muy similar al patrón original, pero con un área bajo los picos mucho menor a la inicial, sugiriendo que todos los hidrocarburos existentes en el rango fueron metabolizados en niveles similares (Figura 3.8).

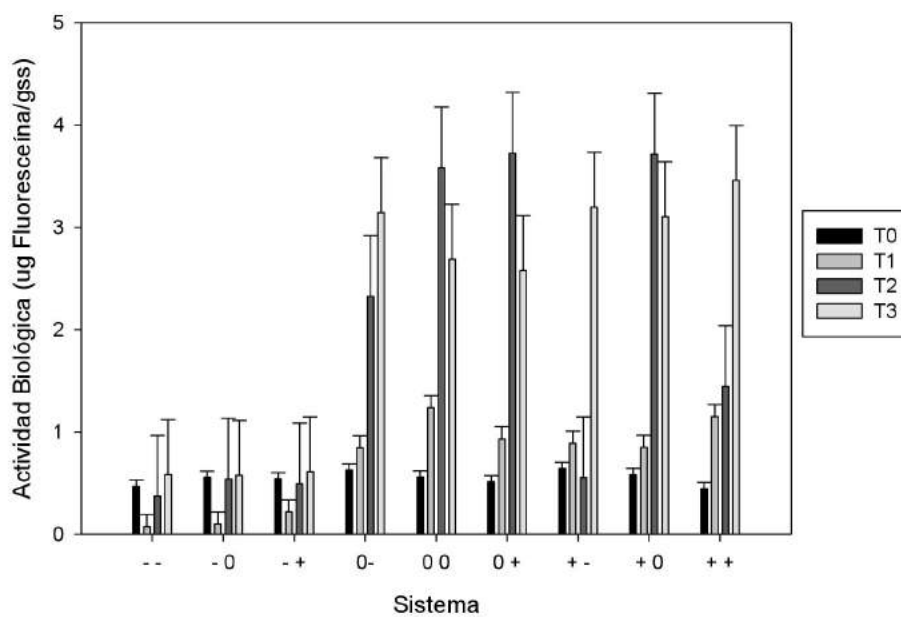


**Figura 3.8.** Cromatogramas de gasoil en suelo obtenido por GC/FID para la condición inicial (To) y final (Tf), en el sistema que presentó mayor remoción (+1,+1).

### 3.3.4. Actividad biológica

La actividad biológica estimada por el método de FDA mostró valores significativamente más altos en aquellos sistemas que recibieron el agregado de N (0 y +1), en comparación con aquellos sin adición de N (-1). El fósforo (P) por otro lado, parece no haber tenido un efecto significativo sobre las actividades biológicas en ninguno de los sistemas en los que se agregó. La Figura 3.9

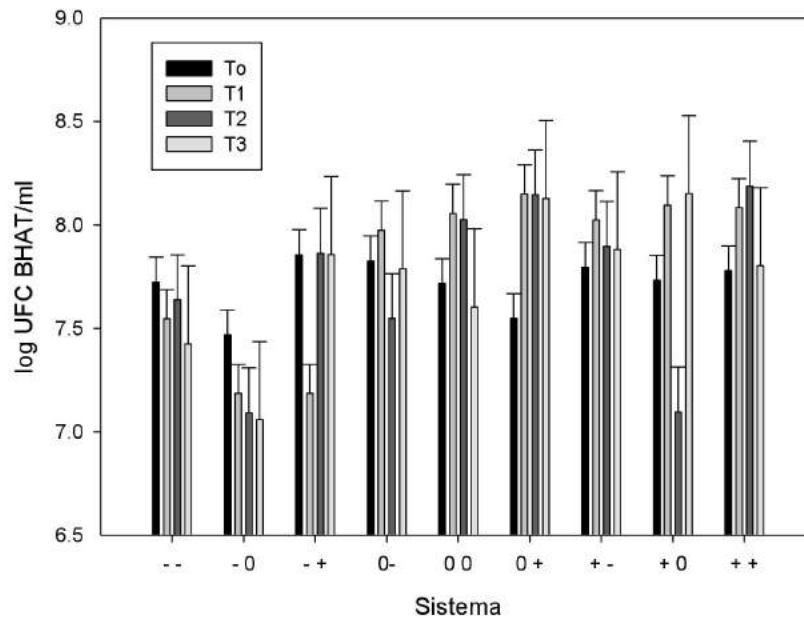
muestra que, en todos los sistemas fertilizados con N, la cantidad de fluoresceína liberada fue aproximadamente 4 veces más alta que en los sistemas donde no se agregó N (más de 2 µg versus 0.5 µg/gramo de suelo seco). En el mismo sentido, los sistemas donde no se agregó N (-1) exhibieron una menor actividad enzimática, probando que este nutriente es esencial para el desarrollo de actividad biológica y sugiriendo que el suelo usado en este estudio no proveyó a los microorganismos de nutrientes suficientes para promover una tasa catabólica óptima. Esta baja actividad biológica fue acompañada de una baja eficiencia de remoción de hidrocarburos en esos sistemas.



**Figura 3.9.** Actividad biológica medida como liberación de fluoresceína en los diferentes sistemas de microcosmos (ver Tabla 3.2 para referenciar los diferentes sistemas).

Los conteos bacterianos mostraron valores más altos en los sistemas donde se agregó N, lo que concuerda con los resultados obtenidos por el método del FDA. Este incremento fue independiente del nivel del nutriente agregado, por lo que es posible que el agregado de este nutriente aún en el nivel más bajo es suficiente para producir un aumento en el número de bacterias (Figura 3.10), también en concordancia con los resultados obtenidos para el método del FDA. El efecto positivo de la adición de N sobre las bacterias totales y también sobre las degradadoras de hidrocarburos fue mucho más claro durante los primeros 30 días del experimento, en donde los conteos se incrementaron solamente en aquellas unidades experimentales donde ese elemento fue adicionado. El efecto de la adición de P mostró no tener un efecto significativo sobre los conteos microbianos cuando no está combinado con N, lo que

sugiere que este elemento no representa un factor limitante de la actividad biológica en los suelos analizados.



**Figura 3.10.** Recuentos de bacterias heterótrofas aerobias totales en los diferentes sistemas de microcosmos (ver Tabla 3.2 para referenciar los diferentes sistemas).

### 3.3.5. Método de Superficie de Respuesta

El diseño central compuesto centrado en las caras demostró una adecuada relación con los valores predichos, sugiriendo que la remoción de hidrocarburos para estos suelos es máxima cuando  $X_1=0,83$  y  $X_2=0,79$ . La superficie de respuesta bi y tridimensionales indicando los valores óptimos resultantes se muestran en las Figuras 3.11 y 3.12. Por lo tanto, la bioestimulación consistente en el agregado de 0,183 g N/kg de suelo y 0,0179 g P/kg de suelo se requeriría para alcanzar la máxima eficiencia de remoción en estos sistemas. Estos valores sugieren una relación C:N:P óptima de 100:17,6:1,73; la cual difiere significativamente de aquella considerada de referencia para la mayoría de los procesos de bioestimulación. De acuerdo con estos resultados, una tonelada de suelo antártico requeriría la adición de 523 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 80 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para desarrollar un proceso optimizado de biorremediación.

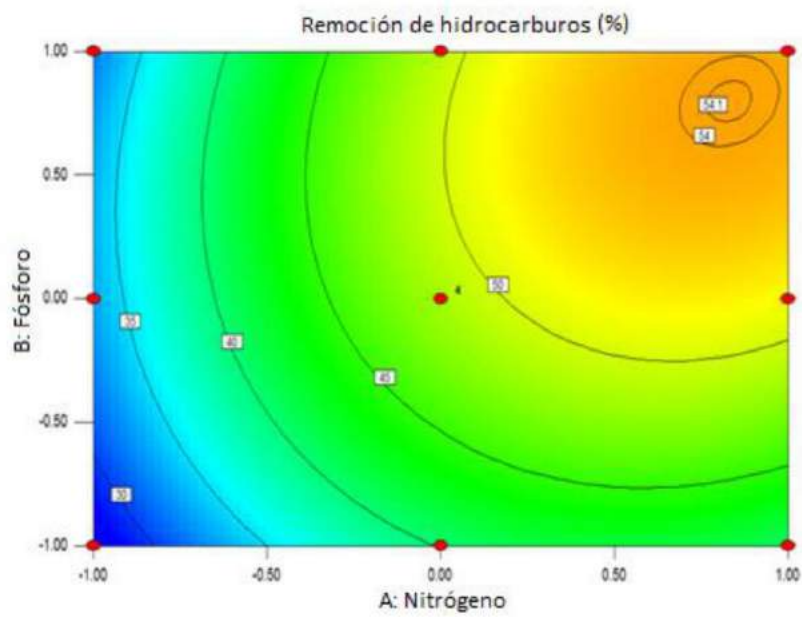


Figura 3.11. Superficie de respuesta obtenida para la optimización de las variables ensayadas (niveles de N y P).

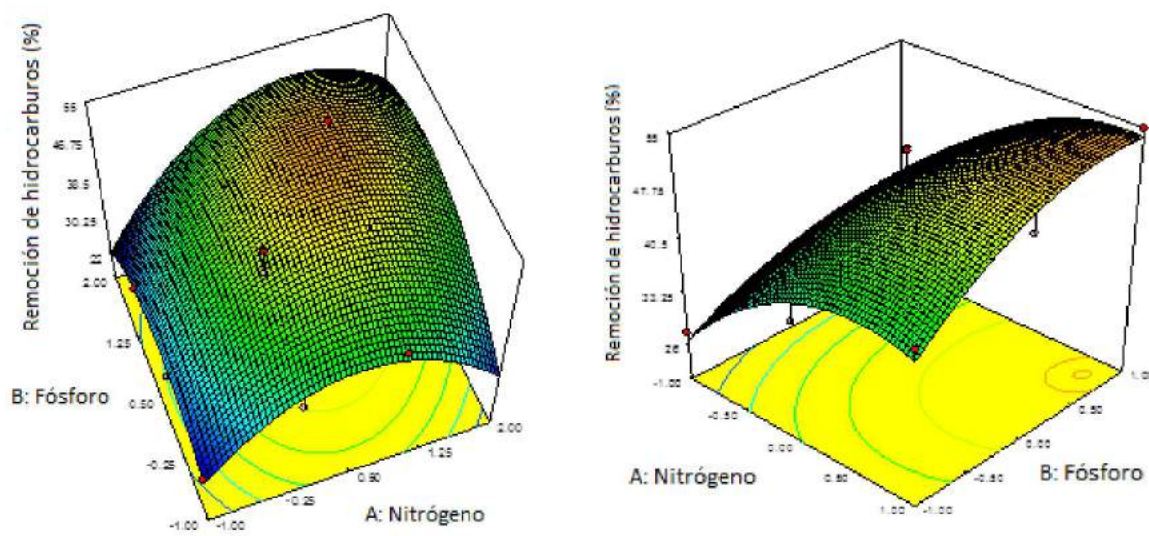


Figura 3.12. Superficie de respuesta obtenida para la optimización de las variables ensayadas (niveles de N y P).

### 3.4. Discusión

El diseño experimental aplicado en este trabajo demostró ser adecuado para encontrar niveles óptimos de N y P en busca de desarrollar una estrategia de bioestimulación en suelos contaminados de la Base Carlini, Antártida. Fue posible determinar una combinación de N y P útil para maximizar la remoción biológica de hidrocarburos usando solamente 12 unidades experimentales. El experimento proveyó un modelo estadístico que predice un máximo de remoción de 54,12% (para un suelo de Carlini conteniendo 1042 mg kg<sup>-1</sup> de hidrocarburos) cuando se adicionan 0,183 g N/kg y 0,0179 g P/kg de suelo. Es importante remarcar que sin la implementación de un enfoque estadístico como el RSM, los niveles óptimos de N y P hubiesen sido diferentes, siendo los correspondientes a los valores obtenidos en el sistema +1,+1 (0,2 g N/kg y 0,02 g P/kg), distinto a aquellos obtenidos con este método estadístico. Desde una perspectiva costo-beneficio, esta relación hubiese implicado el uso de aproximadamente 20% más de nutrientes para el proceso de bioestimulación, determinando que la implementación del proceso sea más costosa y menos eficiente. Esta diferencia se acentúa particularmente para volúmenes de suelo más grandes, como los manejados en condiciones a campo, en un tratamiento a escala real. Además, a esto se suma la posibilidad de que surjan procesos biológicos indeseados debido a un exceso de nutrientes. Como fue previamente reportado (Singh y col., 2013; Lim y col., 2013), la RSM resultó útil para optimizar procesos de biorremediación, alcanzando altos valores de eficiencia de remoción con un consumo menor de nutrientes.

Aunque las eficiencias de remoción evidenciadas por los resultados de RSM fueron menores que aquellas obtenidas en algunos de los ensayos a campo, los valores predichos están en concordancia con la ausencia de algunos procesos de eliminación abiótica de hidrocarburos, como fue mencionado anteriormente. Los procesos abióticos son responsables de la remoción de una fracción importante de los hidrocarburos cuando el suelo se expone a las condiciones ambientales del lugar. Esto también aplica a la Antártida, donde el viento, las horas de sol y la caída de nieve son factores importantes a considerar, especialmente durante las primeras etapas del proceso. En este trabajo las unidades experimentales fueron frascos cerrados incubados isotérmicamente en una cámara de incubación controlada. Los sistemas no estuvieron expuestos a los efectos del viento, la lluvia y la nieve por lo que no hubo lixiviación y la pérdida por evaporación fue menor que la de un sistema a la intemperie. Sin embargo, aún bajo estas condiciones, la pérdida abiótica causada por evaporación no es despreciable. Durante este experimento, la pérdida de hidrocarburos por evaporación fue alrededor del 30%. Este valor fue similar tanto en los sistemas bioestimulados como en aquellos obtenidos en los que no se agregaron nutrientes (-1,-1, 27,75%). En estos últimos, la actividad biológica se mantuvo

prácticamente inalterada a lo largo de todo el periodo experimental. Resultados de experimentos previos reportados por nuestro grupo de trabajo mostraron que aproximadamente un 60 % de la remoción total de hidrocarburos era atribuible a la actividad biológica presente (remoción total – remoción abiótica), como fue reportado para un ensayo de bioestimulación a campo de 45 días en la Antártida con un suelo que contenía una concentración inicial de hidrocarburos de aproximadamente 12.000 mg kg<sup>-1</sup> (Ruberto y col., 2009). Los resultados obtenidos durante el experimento de superficie respuesta están de acuerdo con estos niveles de remoción biológica.

Respecto a la actividad biológica, como fue reportado por Adam y Duncan (2001), las propiedades del suelo son fundamentales para obtener resultados apropiados, ya que la heterogeneidad intrínseca del suelo puede causar falta de robustez del método. Nuestra experiencia con suelos antárticos demostró que el uso de la técnica de FDA es apropiada para obtener resultados reproducibles de actividad biológica, que también se encuentran en concordancia con los valores obtenidos en los recuentos bacterianos. El método de FDA evidenció una alta correlación entre la eficiencia de remoción de hidrocarburos y los niveles de liberación de fluoresceína, estableciendo que un descenso en la concentración de hidrocarburos puede ser atribuible a la actividad biológica presente en el suelo.

La relación C:N:P optimizada obtenida (100:17,6:1,73) difirió de aquella frecuentemente considerada como óptima para el crecimiento microbiano (Cheng y Mulla, 1999) y para la biodegradación de hidrocarburos (Dibble y Bartha, 1979; Ron y Rosemberg, 2010). En un trabajo previo, Ferguson y col., (2003) estudió el efecto de la bioestimulación con diferentes cantidades de N (provenientes de distintas fuentes) sobre la degradación de un suelo antártico contaminado con hidrocarburos en la Base Old Casey. Es ese caso, una remoción de casi 9.000 mg kg<sup>-1</sup> fue obtenida aplicando una relación C:N:P de 100:1,4:0,09. En otro reporte, Liu y col., (2011), trabajando con un suelo conteniendo 14.000 mg kg<sup>-1</sup>, reportaron un 69,8% de remoción de hidrocarburos después de 35 días de bioestimulación con nutrientes inorgánicos (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) utilizando una relación C:N:P de 100:11,3:3,7. Sólo un 46,7% de remoción se alcanzó para el mismo suelo cuando la relación C:N:P fue aumentada a 100:27:6,5. Estos resultados ejemplifican claramente cuán importante se torna la optimización de los niveles de nutrientes, y cuán diferente puede resultar la combinación óptima en comparación con los valores de referencia de 100:10:1. En relación a lo arriba mencionado acerca del efecto de un exceso de N y P, también Aislabie y col., 2006 ha reportado que una mayor concentración de estos nutrientes puede resultar en una inhibición biológica o una reducción en el potencial de agua del suelo. Walworth y col., (2007) también reportaron una inhibición de la remoción biológica de hidrocarburos para un suelo sub-antártico, atribuible a un exceso de N y/o P. Chong y col., (2009), estudiando la diversidad bacteriana en diferentes suelos de las afueras de la Base



australiana Casey (Antártida), reportaron una tendencia a un aumento en la diversidad bacteriana del suelo cuando se encontraban concentraciones elevadas de N y agua. Todos estos resultados refuerzan el rol del N como un nutriente vital para la flora bacteriana en suelos antárticos y resaltan lo crucial que resulta la optimización de su concentración.

Las diferencias entre este valor optimizado y aquellos obtenidos por otros autores bajo condiciones diferentes pueden ser causadas por distintos factores. Los niveles basales de N y P en el suelo bajo tratamiento parecieran ser el más obvio. Los suelos antárticos con los que se trabajó en esta tesis presentan concentraciones particularmente bajas de N y P, por lo que es lógico suponer que necesiten de un agregado mayor de estos nutrientes para llevar a cabo un proceso de remediación. Además, dicha necesidad puede estar relacionada con fenómenos físicos que afectan la biodisponibilidad de estos nutrientes. Huygens y col., (2008) demostraron que un suelo volcánico de la selva Valdiviana presentaba una pérdida mínima de N biodisponible, y atribuyeron esta capacidad a una sinergia entre procesos abióticos, microorganismos del suelo y raíces de plantas, llevando a “pooles” estables de N. Los suelos antárticos en general están muy lejos de esta situación, ya que usualmente carecen de vegetación asociada y de niveles significativos de materia orgánica. Las poblaciones microbianas también son cuali y cuantitativamente menores que aquellas presentes en otros suelos de áreas menos estrictas. Todos estos factores pueden resultar en una matriz con poca capacidad para retener los nutrientes biodisponibles requeridos por los microorganismos degradadores. Si el N y el P se encuentran menos disponibles para la biomasa microbiana, podría ser necesario agregar mayores cantidad de este nutriente que aquellos obtenidos por cálculos estequiométricos, resultando en relaciones C:N:P mayores que 100:10:1.

Otro punto a analizar es cómo garantizar la efectividad del agregado de nutrientes a los suelos antárticos, de manera de intentar emular el comportamiento del RSM en ensayos a campo. Aunque la identificación de concentraciones de nutrientes apropiadas puede contribuir a mejorar una estrategia de bioestimulación, se tornaría inútil si esos nutrientes fuesen rápidamente lavados del suelo en tratamiento. El suelo de los alrededores de Base Carlini presenta una alta tendencia al drenaje y por esta razón, bajos valores de capacidad de campo. Esta característica, como fuese reportado por Ferguson y col., (2003) para suelos de la Base Old Casey, puede resultar en un rápido lavado de los nutrientes debido a la lluvia o el derretimiento de nieve. El uso de fuentes de nutrientes de liberación lenta o el diseño de biopilas contenidas en geomembranas pueden ser alternativas atractivas para lidiar con este tipo de desafíos, ya que además de mejorar la disponibilidad del nutriente, evitan su lixiviación y consecuente reducen el impacto negativo sobre el medio ambiente.

Cuando se comparan ensayos de laboratorio con ensayos a campo, es importante considerar otra pregunta: ¿qué está siendo favorecido cuando una matriz compleja que contiene una

comunidad microbiana también compleja es incubada de manera isotérmica? Es posible (y esperado) que un suelo contaminado crónicamente expuesto a condiciones ambientales naturales sea habitado por diferentes microorganismos con capacidad para tomar ventaja de diferentes situaciones ambientales. Si nos enfocamos en la temperatura en particular, es posible definir ciertos “nichos térmicos” como han establecido Magnuson y col., (1979) para peces y Bronikowski y col., (2001) para bacterias enteropatógenas. Para suelos antárticos expuestos a condiciones ambientales naturales, la oscilación diaria en la temperatura ofrece la oportunidad a los microorganismos de enfrentarse a diferentes temperaturas, que serán óptimas para el crecimiento de diferentes grupos y potencialmente adecuadas para diferentes y/o complementarias capacidades catabólicas. La incubación isotérmica, por su parte, puede permitir el crecimiento óptimo de sólo un grupo limitado de microorganismos. La diferencia que puede resultar de estas dos situaciones es difícil de evaluar. La incubación a 15°C puede permitir el crecimiento de algunos microorganismos a una tasa más elevada que aquella para el rango diario de temperatura normal en Antártida. En este sentido, Franzmann (1996) observó que muchas de las especies presentes en Antártida presentan una temperatura óptima de crecimiento de 23°C. Whyte y col., (1999) plantearon la idea de que 23°C es la temperatura óptima para biorremediar suelos de regiones frías, debido a que representa un equilibrio ideal entre una disponibilidad significativa de hidrocarburos y una baja inhibición de la microflora autóctona. Sin embargo, Ferguson y col., (2003) demostró que la flora microbiana de la Base Old Casey es capaz de mineralizar más <sup>14</sup>C-octadecano a 42°C que a cualquier otra temperatura. Sin embargo, actividades catabólicas cruciales pueden muy probablemente resultar inhibidas o limitadas a estas temperaturas, y consecuentemente se esté subestimando el potencial de remoción de ese suelo. Además, si bien el porcentaje de remoción puede resultar atractivo, es importante considerar que la flora microbiana que se va a desarrollar a 42°C debe ser muy diferente a aquella que se desarrolla en un suelo a temperaturas de alrededor de 15°C o menores. Este desarrollo de una comunidad “muy diferente” debe ser considerado como un impacto negativo sobre el ambiente, que aleja al suelo de su condición natural. En cualquier caso, todas estas consideraciones fueron realizadas para incubaciones isotérmicas. A fin de revelar el efecto de ciclos irregulares de temperatura en la eficiencia final de ensayos de biorremediación a campo, se deberían realizar otros experimentos en los que se simulen los cambios naturales de la temperatura a lo largo del día.

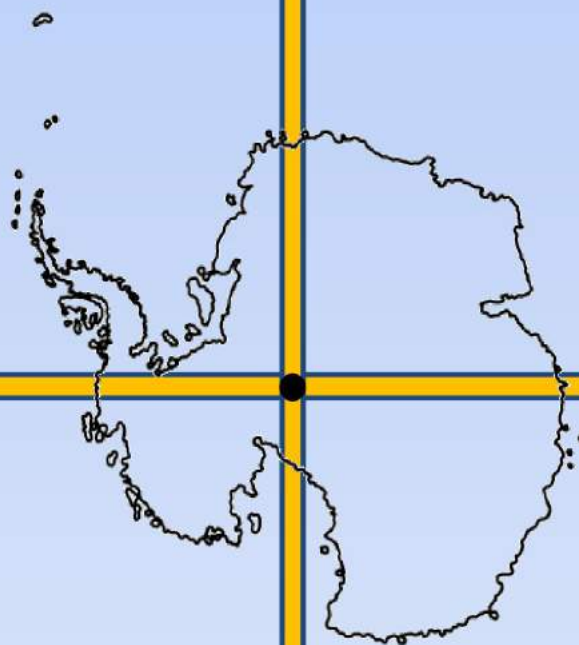
Es interesante señalar que el perfil de GC de la fracción remanente de hidrocarburos en el sistema que presentó mayor remoción mostró un patrón similar a los del suelo antes del tratamiento, aunque el área bajo los picos total fue significativamente menor luego del tratamiento (Figura 3.8). De acuerdo con esto, todas las fracciones presentes en el suelo contaminado fueron degradadas a tasas similares, pese a su estructura química. Sin embargo,

esta fracción recalcitrante evidencia la presencia de cierta limitación en la actividad degradadora, debido a la poca disponibilidad de los hidrocarburos para los microorganismos, su concentración, la duración del experimento o una actividad biológica inadecuada por parte de la flora microbiana. Para mejorar la degradación de esta fracción remanente podría resultar útil desarrollar un proceso de biorremediación secuencial con una primera etapa de bioestimulación (para eliminar la fracción más fácilmente degradable), seguido de una segunda etapa, ya sea aplicando bioaumentación enfocada en la remoción de los hidrocarburos recalcitrantes o bien mediante el agregado de un compuesto surfactante que logre aumentar la biodisponibilidad de los compuestos remanentes.

### **3.1. Conclusión**

El trabajo presentado en este capítulo, provee de una herramienta útil para inferir cantidades óptimas de N y P requeridos para la bioestimulación de suelos antárticos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. La metodología representa una estrategia experimental simple y poderosa, con un bajo número de celdas experimentales. Con los resultados aquí obtenidos, se logró optimizar la remoción de hidrocarburos llevada a cabo por la comunidad microbiana para un suelo antártico de Base Carlini. Deberán realizarse nuevas investigaciones para encontrar, si es que existe, el rango de concentraciones de hidrocarburos en donde la predicción obtenida ajuste adecuadamente a los resultados experimentales. De cualquier manera, cualquier protocolo de biorremediación que se base en la bioestimulación debería considerar esta instancia de optimización como indispensable.

## **4. Aplicación de la bioestimulación pre-optimizada: Primer ensayo a campo mediante la conformación de biopilas**



"Al fin y al cabo, somos lo que hacemos para cambiar lo que somos"

*Eduardo Galeano*

#### 4.1. Introducción

El escalado de los ensayos desarrollados en el ámbito del laboratorio requiere tener en cuenta factores que son únicos del lugar de aplicación a campo. Las estrictas condiciones establecidas en los ensayos en microcosmos muchas veces pueden no ser controladas cuando se busca aplicar esos resultados en el campo. Las cantidades de suelo a tratar, así como la concentración de hidrocarburos (nivel de contaminación) que presentan son frecuentemente desconocidos a priori, y no manejables en la práctica. Es por ello que se deben idear estrategias de biorremediación que incluyan herramientas versátiles, que puedan ser aplicadas en un variado número de eventos de contaminación.

El clima en Antártida se caracteriza por bajas temperaturas, fuertes vientos (de hasta 200 km/h) y grandes cantidades de nieve, incluso en verano. Estas condiciones imponen un desafío al diseño de los procesos de biorremediación a campo. El "landfarming" no es apropiado para procesos a gran escala en estas regiones ya que el contenido de agua es considerablemente afectado por la nieve y el viento (Sección 1.8.1). Además, el viento puede arrastrar partículas de suelo contaminadas, desparramándolas en un área más vasta o incluso al océano. Por otro lado, los procesos realizados en recintos cubiertos presentan la ventaja de poder controlar la temperatura y evitan las modificaciones bruscas en el contenido de agua del suelo, así como de acarreo por el viento o la lixiviación. Sin embargo, es importante considerar que los sistemas requieren mezcla frecuente y aireación del suelo contaminado. La protección de suelo con distintos tipos de cubiertas o membranas ha sido reportada como una forma de incrementar la temperatura promedio del suelo bajo tratamiento y además de disminuir la amplitud térmica dentro de las biopilas, beneficiando el potencial degradador de la comunidad microbiana y alcanzando una remoción biológica de hidrocarburos más elevada (Mohn y col., 2001; Delille y col., 2004, 2007; Gomez y Sartaj, 2014). Las biopilas que se desplieguen para el tratamiento del suelo deben impedir (entre otras cosas) la liberación o lixiviación del contaminante hacia zonas prístinas o no contaminadas, a fin de evitar la contaminación de mayores cantidades de suelo, y disminuir el impacto del tratamiento aplicado. Con este fin se han utilizado frecuentemente geomembranas de polietileno de alta densidad (800 micrones), dado que es un material idóneo para contener el suelo dentro de la biopila y además inerte frente a los hidrocarburos presentes en el gasoil (Sangam y Rowe, 2001; Islam y Rowe, 2009; Rowe y col., 2011).

En este capítulo se presenta el trabajo realizado para evaluar la efectividad a campo de la optimización de la relación C:N:P realizada en el laboratorio (y descrita en el Capítulo 3) para el tratamiento por bioestimulación de suelo contaminado de la Base Carlini. Para ello, se eligió una estrategia *on-site* consistente en la conformación de biopilas conteniendo aproximadamente 450

kg de suelo dispuestos sobre geomembranas de polietileno de alta densidad. De esa forma, se buscó evaluar, no sólo el desempeño de dicha optimización, sino también de la conformación de biopilas para la remediación del suelo contaminado *on-site*, sometido a las condiciones climáticas-ambientales presentes en el norte de la península antártica.

## **4.2. Materiales y métodos**

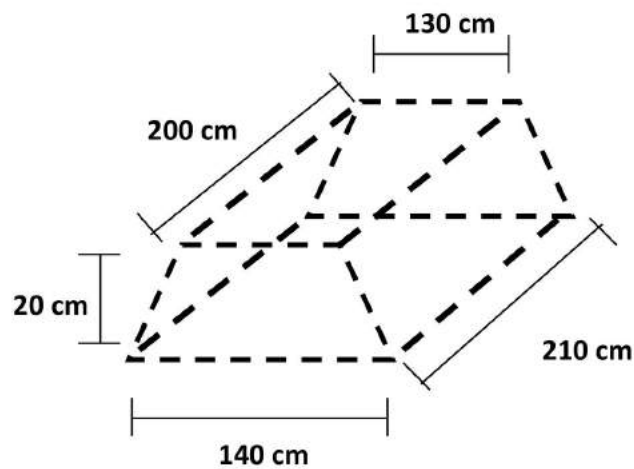
### **4.2.1. Análisis del suelo y caracterización**

El suelo utilizado para este ensayo a campo fue recolectado del área circundante a los tanques de almacenamiento de gasoil de la Base Carlini (Isla 25 de Mayo, Shetlands del Sur, 62°14'18"S 58°40'05"W) en diciembre de 2013, durante la Campaña Antártica Argentina de 2013/2014. El suelo contaminado, conteniendo un promedio de  $2180 \pm 165$  mg kg<sup>-1</sup> de hidrocarburos, fue tamizado (malla de 10 mm) para remover piedras, concreto, y cualquier otro material inerte que pueda alterar las determinaciones analíticas. Posteriormente, el suelo tamizado fue dividido en dos fracciones: una de ellas fue utilizada para el ensayo a campo, mientras que otra se preservó a -20 °C para estudios posteriores. El suelo fue también analizado para textura por el método de la pipeta (Gee y Bauder, 1986) y se midió su contenido en carbono orgánico (Walkley y Black, 1934), fósforo extractable (Bray y Kurt, 1945) y nitrógeno total por Kjeldhal. El contenido de agua fue determinado gravimétricamente secando las muestras a 105°C durante 24 horas. Para la determinación del pH, 10 ml de una solución salina estéril (NaCl 8,9 g l<sup>-1</sup>) fue adicionada a 1 gramo de suelo y agitada en vortex por 1 minuto. El pH de la suspensión fue medido usando una sonda Docu pH+ meter (Sartorius). Se tomaron muestras cada 10 días de cada una de las biopilas. Las muestras fueron recolectadas aleatoriamente luego de mezclar y homogenizar el suelo de manera de asegurar muestras representativas del total de los sistemas.

### **4.2.2. Diseño de las biopilas**

Para la realización del ensayo a campo, aproximadamente 830 kg de suelo contaminado tamizado fueron homogenizados utilizando un tambor rotatorio y posteriormente dividido en dos fracciones equivalentes en pos de establecer una biopila control (CC) y una biopila bioestimulada (BS). La unidad experimental control CC consistió en suelo contaminado con mezclado periódico y la adición de agua para mantener el nivel de humedad buscado (15 % p/p). La biopila bioestimulada BS sólo difirió de la CC en el agregado de nutrientes hasta

alcanzar la relación C:N:P 100:17,6:1,73, previamente optimizada como fue descrito en el Capítulo 3 (Martínez Álvarez y col., 2015). El contenido de humedad y la frecuencia de mezclado fueron las mismas en ambas unidades experimentales. Ambos sistemas fueron dispuestos para conformar una pirámide truncada (210 cm x 140 cm, 200 cm x 130 cm, h=20 cm), conteniendo aproximadamente 0,53 m<sup>3</sup> de suelo (Figura 4.1). Esta configuración provee una buena relación superficie/volumen, permitiendo el tratamiento de un gran volumen de suelo en un área moderada, minimizando la volatilización y la cantidad de geomembrana requerida. Además, representa una configuración adecuada para resistir fuertes vientos.



**Figura 4.1.** Forma y dimensiones de las biopilas. El volumen puede ser calculado con la fórmula  $V = \frac{h}{3} \times (A + A' + \sqrt{A \times A'})$ , donde h se refiere a la altura, A representa el área de la base mayor y A' el área de la base menor.

El suelo contaminado de cada biopila fue aislado del entorno mediante el uso de una geomembrana de polietileno de alta densidad (800 um) de 3 x 5 metros. Esta conformación experimental no solo aísla la biopila del suelo contiguo, evitando la lixiviación, sino también la protege del viento, la nieve y la lluvia, y es completamente inerte respecto a compuestos hidrocarbonados derivados del petróleo. Durante el estudio se evaluó un potencial efecto de calentamiento basado en el hecho de que los materiales oscuros tienden a absorber radiación solar más eficientemente que los materiales claros. El verano en regiones polares se caracteriza por los altos niveles de radiación solar diaria, debido a la larga duración del día y las noches cortas. La temperatura, el contenido de agua y la conductividad del suelo fue determinado a intervalos de 2 horas usando un datalogger Decagon, equipado con 4 sensores 5TE, uno en el centro de cada biopila y otros dos enterrados en el suelo circundante (controles 1 y 2, Figura 4.2). Las biopilas se ubicaron adyacentes a los tanques de acopio de combustible, cerca de donde se tomó el suelo contaminado y se abrieron manualmente y mezclaron mediante el uso de palas

cada dos días. El contenido de agua fue ajustado al nivel deseado (15% v/v) mediante el agregado de agua destilada filtrada (0,22  $\mu\text{m}$ ) cuando fue necesario. La disposición final de los sistemas se muestran en la Figura 4.4.



**Figura 4.2.** Disposición del suelo sobre la geomembrana e incorporación de los sensores en el núcleo de la biopila.

#### **4.2.3. Adición de nutrientes**

El tratamiento de bioestimulación fue realizado de acuerdo con la concentración inicial de hidrocarburos, y los niveles de agregado de nutrientes optimizados que se obtuvieron en el experimento de superficie de respuesta previamente descrito (Capítulo 3, Martínez Álvarez y col., 2015). El nitrógeno fue adicionado como nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , Grado analítico, Anedra). El fósforo fue agregado como fosfato monosódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Grado analítico, Anedra). Una solución conteniendo ambas sales fue preparada disolviendo 372,5 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 56,3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 5 litros de agua destilada (Figura 4.3). La solución fue esterilizada mediante autoclave, a 121°C por 15 minutos luego diluida con agua deionizada hasta un volumen de 30 l y esparcida con rociador sobre cada sistema. De esta forma, se buscó una mejor distribución de los nutrientes en el núcleo del suelo, y al mismo tiempo se ajustó el contenido de agua al valor buscado de 15%. Esta cantidad de agua permite una apropiada actividad biológica sin inundar el suelo (EPA, 1994).





**Figura 4.3.** Conformación de las biopilas en forma de pirámide truncada y mezclado luego del agregado de nutrientes.

#### **4.2.4. Actividad biológica**

Dos métodos diferentes fueron aplicados para inferir la actividad biológica: la hidrólisis del Diacetato de Fluoresceína y los conteos bacterianos. Ambas metodologías fueron realizadas de la manera descrita en la Sección 3.2.3.



**Figura 4.4.** Disposición final de las biopilas en su conformación cerrada con la inclusión de los sensores del datalogger.

#### 4.2.5. Análisis de hidrocarburos

A diferencia del ensayo reportado en el Capítulo 3 (Sección 3.2.4), para la cuantificación de hidrocarburos en el campo, los hidrocarburos totales de las muestras de suelo (5 g) fueron extraídos con 20 ml de tetracloroetileno (calidad IR, Sintorgan) en tubos de Teflón de 40 ml (Nalgene). Una punta de espátula de sulfato de sodio fue agregada a cada tubo de manera de remover cualquier fracción acuosa remanente en la fase orgánica. Luego, se agregaron 0,5 g de Sílica Gel 60 (0,063-0,200 mm, Merck) a cada tubo para remover compuestos polares de la fase orgánica y se agitaron (200 rpm) durante 3 horas a 25°C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas (15 min, 7.656 x g) y filtradas para evitar la presencia de partículas de suelo en el sobrenadante, y transferidas a una celda de cuarzo para su análisis. Se extrajeron y midieron cinco réplicas para cada tiempo de muestreo, y los resultados aquí expresados corresponden al promedio de esas 5 determinaciones.

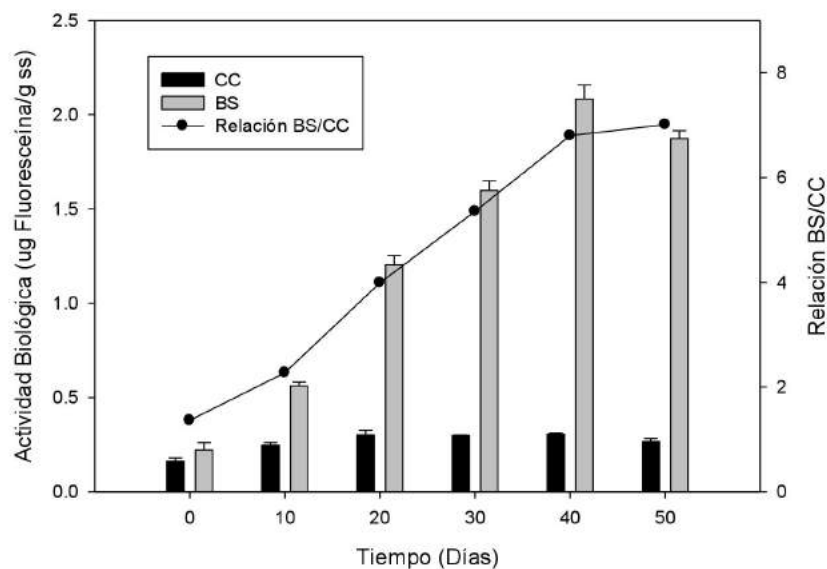
La cuantificación de hidrocarburos para el ensayo a campo fue realizada de acuerdo a una modificación del método ASTM D7066 (2011), usando un espectrofotómetro Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR, IRAffinity 1, Shimadzu Corp., Japón), ubicado en el laboratorio argentino de la Base Científica Carlini. El cambio en el método de medición de los hidrocarburos tuvo que ver fundamentalmente con la necesidad de conocer la concentración inicial de los mismos en pos de poder bioestimular el suelo con la relación C:N:P optimizada. Para ello, es imprescindible conocer la cantidad de C inicial, y la disponibilidad del FTIR en Base Carlini garantizó dicho conocimiento. La calibración fue realizada usando estándares de gasoil preparados en tetracloroetileno grado HPLC (0, 500 y 1.000 mg kg<sup>-1</sup>) y considerando el área de pico en el rango de 2.850 a 3.000 cm<sup>-1</sup>. La determinación para el espectro infrarrojo fue ajustada en 45 escaneos por muestra, y la resolución dispuesta en 2,0 cm<sup>-1</sup>. La medición de las muestras siguió el mismo protocolo, y los valores fueron obtenidos usando esta calibración al extrapolar las áreas de pico obtenidas por las muestras, en dicha curva de calibración.

A su vez se realizó la extracción, con hexano:acetona como solvente, de las muestras preservadas a -20 °C para su posterior análisis por GC-FID. En este caso, se siguió con las mismas especificaciones que aquellas expresadas en la Sección 3.2.4.

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. Actividad biológica

Con la excepción del  $t_0$ , la actividad biológica (medida como niveles de FDA) mostró valores significativamente mayores en los sistemas bioestimulados (BS), en comparación con aquellos observados en el control (CC) ( $p < 0,05$ ; Figura 4.5). En el tratamiento BS, la actividad biológica se incrementó significativamente en el tiempo (un aumento de más de 9 veces durante los primeros 30 días), alcanzando su punto máximo en el muestreo del día 40. La relación entre las actividades biológicas de ambos sistemas (BS/CC) se incrementó de manera casi lineal hasta el día 40, alcanzando una relación de 7 a 1 al final del experimento (día 50). Este hecho, sumado a la escasa actividad biológica demostrada en el sistema CC, al que no se adicionó N ni P, resalta el efecto positivo que la bioestimulación ejerce sobre la actividad biológica de la comunidad microbiana presente en el suelo. Este resultado además mostró que el suelo utilizado en este experimento no contenía los niveles necesarios de estos nutrientes como para permitir una tasa catabólica óptima (no limitada) de hidrocarburos.

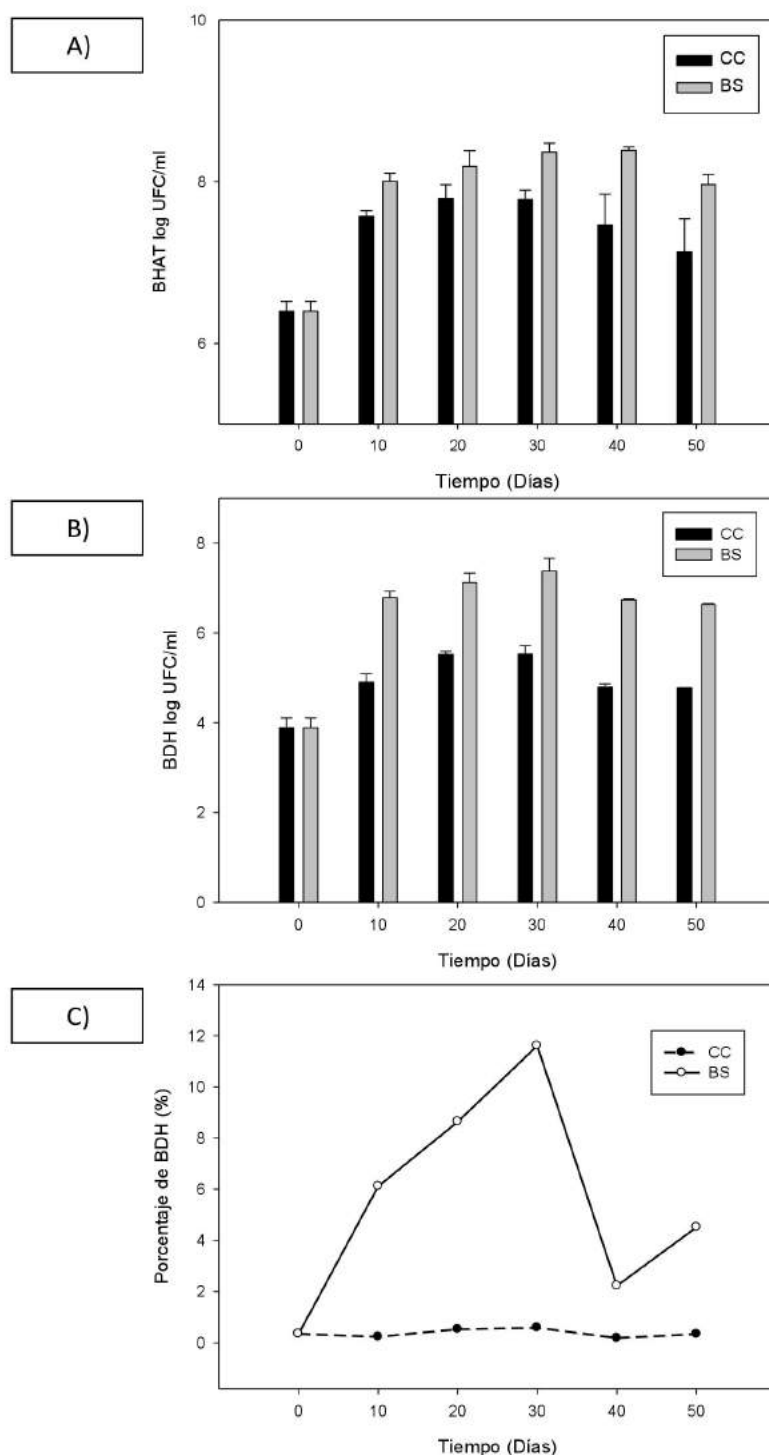


**Figura 4.5.** Niveles de actividad biológica, medidos como liberación de fluoresceína, para los sistemas control (CC) y bioestimulados (BS).

#### 4.3.2. Recuentos bacterianos

Los recuentos de bacterias heterótrofas aerobias totales (BHAT) y de degradadoras de hidrocarburos (BDH) incrementaron significativamente su número durante los primeros 10 días, alcanzaron su máximo el día 30, y luego decrecieron, tanto en CC como en BS (Figura 4.6A y B). El aumento inicial en el recuento bacteriano observado en ambos sistemas (CC y BS), sugiere que está al menos en parte, relacionado con la aireación y manipulación del suelo. Luego, los valores de BHAT y BDH continuaron incrementándose a un ritmo menor en ambos sistemas, aunque el aumento en BDH fue proporcionalmente mayor que el de BHAT en el sistema bioestimulado, como lo evidencia la relación porcentual BDH/BHAT (Figura 4.6C). Los conteos de BHAT y BDH alcanzaron valores de más de  $1 \times 10^8$  UFC/ml y  $1 \times 10^6$  UFC/ml respectivamente, en BS. Este resultado se encuentra en concordancia con el porcentaje de bacterias degradadoras, que también presentó un máximo en el día 30 (Figura 4.6C), indicando que el aumento y subsecuente descenso observado en las UFC's totales está vinculado al aumento y caída del número de bacterias degradadoras de hidrocarburos.

En todos los casos los recuentos bacterianos fueron sustancialmente mayores en BS, indicando que la adición de nutrientes es indispensable para el desarrollo de la flora bacteriana. Pasado el día 40, los recuentos tendieron a descender, sugiriendo la aparición de algún tipo de limitación para el crecimiento bacteriano, posiblemente debido a la disminución en la disponibilidad de compuestos orgánicos fácilmente degradables.



**Figura 4.6.** Recuentos bacterianos para el Sistema control (CC) y bioestimulado (BS). A) Bacterias heterótrofas aeróbicas totales (BHAT) expresadas como Unidades Formadoras de Colonias por ml. B) Bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) expresadas como Unidades Formadoras de Colonias por ml. C) Porcentaje relativo de BDH/BHAT (%).

### **4.3.3. Seguimiento de las propiedades físicas**

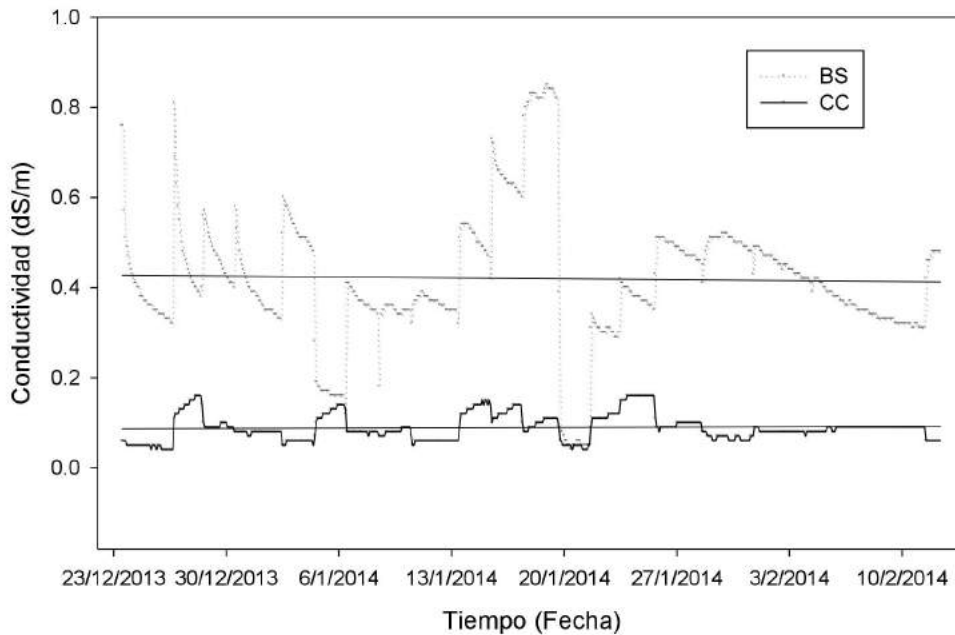
#### **4.3.3.1. Análisis del suelo**

El suelo poseía una textura arenosa, con 1,8% de arcilla, 3,8% de limo y 94,4% de arena. El carbono orgánico, el nitrógeno total por Kjeldhal y el fósforo extraíble fueron 10,21 g kg<sup>-1</sup>; 0,32 g kg<sup>-1</sup> y 5,0 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente; mientras que el pH fue 6,8 y el contenido de agua 10%. La cuantificación de hidrocarburos demostró que el suelo contenía una concentración total de hidrocarburos de 2180 ±165 mg kg<sup>-1</sup>.

#### **4.3.3.2. Conductividad**

Los sistemas mostraron una clara diferencia en los valores de conductividad (Figura 4.7) que puede ser atribuida a la adición de nutrientes. Para la biopila BS, se usaron NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en soluciones acuosas como fuente de N y P respectivamente, proveyendo al suelo una mayor cantidad de iones, en comparación con la biopila CC a la que sólo se le agregó agua destilada filtrada (0,22 µm). Este incremento en la salinidad fue la causante del incremento en la conductividad del suelo de la biopila BS. Por otro lado, la biopila CC no mostró cambios en sus bajos valores de conductividad de suelo, consistente con los bajos niveles de iones presentes o disponibles en ese suelo.

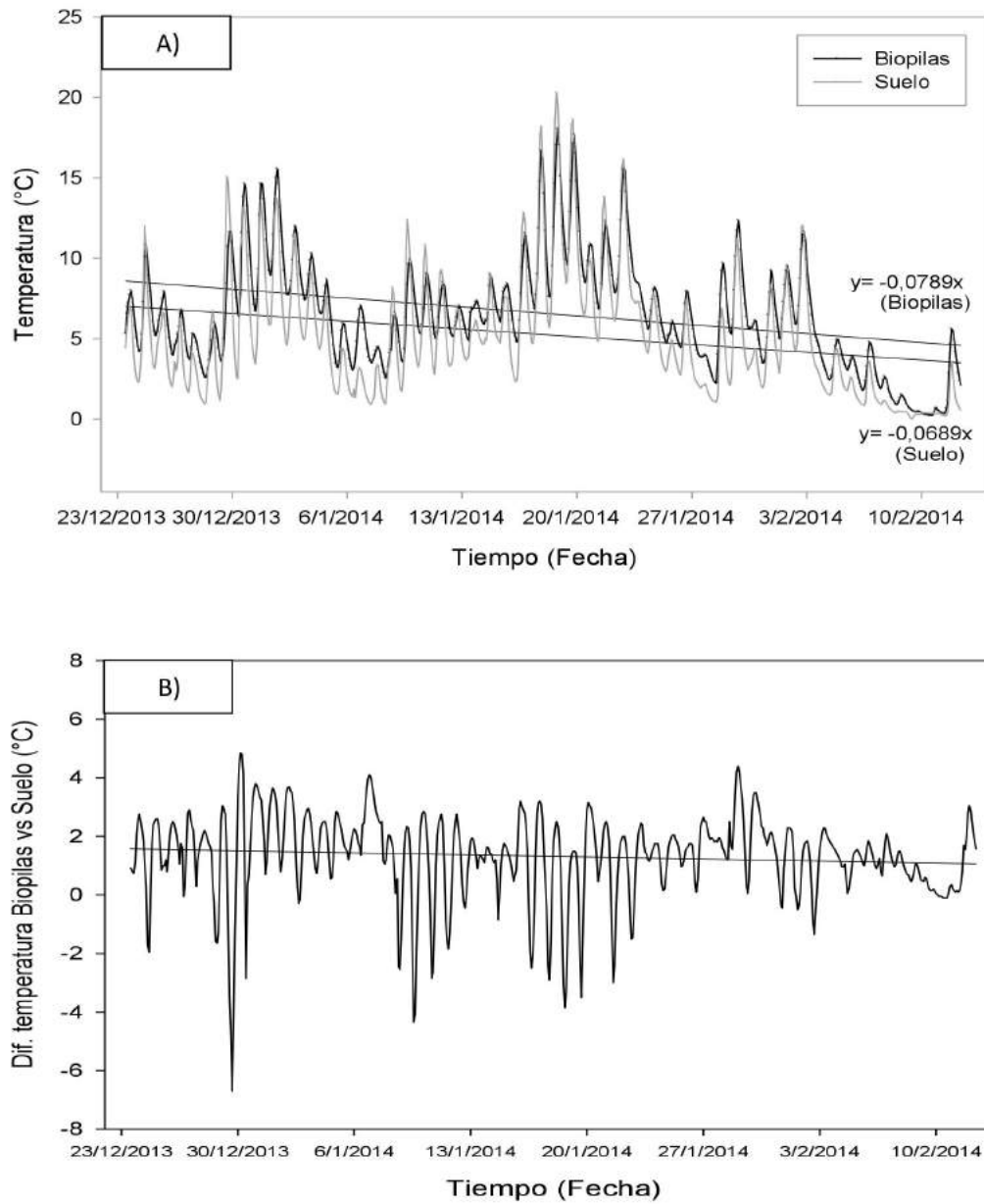
Además, los patrones de conductividad obtenidos mostraron picos de manera regular cada dos días, coincidentes con los días de mezclado de suelo. Esta observación sugiere que la homogeneización por mezclado del suelo es vital para la solubilización y consecuente aumento de la disponibilidad de nutrientes para la flora microbiana, de manera de utilizarlos junto con los hidrocarburos. La intensidad de los picos fue decreciendo a lo largo del tiempo. Sin embargo, la conductividad promedio se mantuvo casi sin cambios durante todo el experimento, como se ve reflejado en la pendiente de la línea de tendencia en ambos sistemas (-0,0003 para el BS y 0,0001 para CC).



**Figura 4.7.** Registro de la conductividad del suelo a lo largo del ensayo de biopilas. BS: biopila bioestimulada; CC: biopila control.

#### 4.3.3.3. Temperatura

La temperatura registrada durante el experimento mostró un efecto de calentamiento causado por la membrana. La temperatura media registrada en ambos sistemas cubiertos (6,5°C y 6,7°C) mostró ser significativamente diferente (ANOVA;  $p < 0,001$ ) de aquellos registrados en los controles (5,2°C y 5,3°C para los suelos control 1 y 2 respectivamente). La diferencia de temperatura entre los sistemas cubiertos y los no cubiertos en función del tiempo evidenció que la mayor parte del tiempo la temperatura fue mayor en los primeros (sólo el 12% de las mediciones debajo de la línea del cero). La diferencia alcanzó su máximo punto un día soleado, con alta radiación solar, a las 4:00 am ( $\Delta T$  4,8°C), mientras que el valor más bajo ( $\Delta T$  -6,7°C) fue registrado a las 16:00 pm del mismo día (Figura 4.8). Este patrón de diferencias positivas durante la noche y negativas durante el día fue consistente durante todo el experimento, y sugiere que la membrana mantiene el suelo más caliente durante los periodos sin irradiación solar, haciéndolo menos propenso, tanto al calentamiento como a la reducción de temperatura durante la noche. En otras palabras, reduce la amplitud térmica dentro de las biopilas, manteniendo el suelo más cálido respecto al suelo despejado.

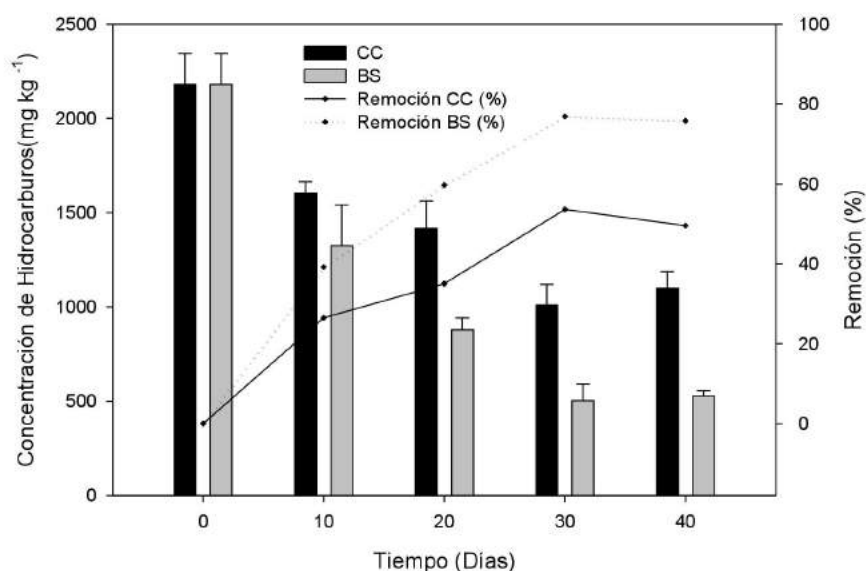


**Figura 4.8.** A) Gráfico de temperatura a lo largo de todo el período experimental para el suelo dentro de las biopilas y en el suelo descubierto. B) Gráfico de las diferencias de temperatura entre el suelo de las biopilas vs suelo descubierto para todo el período experimental.

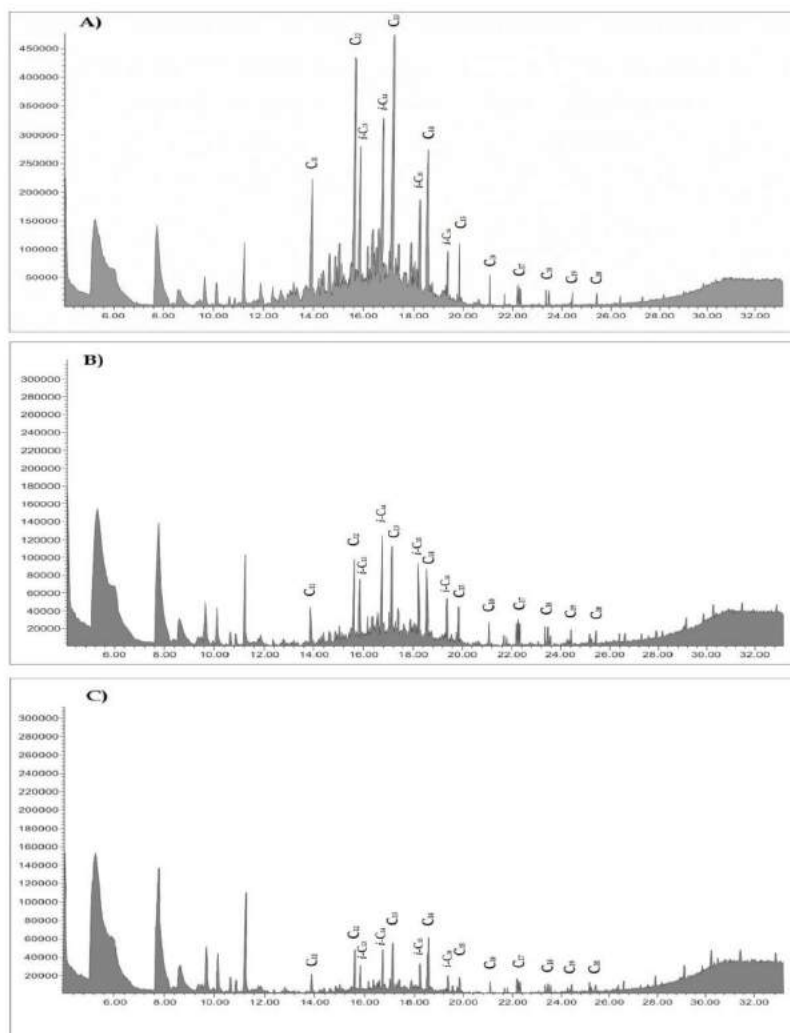


#### 4.3.3.4. Contenido de hidrocarburos

La concentración de hidrocarburos ( $\text{mg kg}^{-1}$  de suelo) descendió desde un valor inicial de  $2180 (\pm 165) \text{ mg kg}^{-1}$  a un nivel final de  $527,79 (\pm 27) \text{ mg kg}^{-1}$  en BS (75,79% de remoción), mientras que  $1110,1 (\pm 88) \text{ mg kg}^{-1}$  fue el contenido de hidrocarburos finales en la biopila control (49,54%). La remoción ocurrió principalmente hasta el día 30 del experimento, en ambos sistemas. Luego de este tiempo, la concentración de hidrocarburos tendió a mantenerse estable (Figura 4.9).



**Figura 4.9.** Concentración de hidrocarburos ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), y porcentaje de remoción acumulada (%) a lo largo del período experimental. Las barras de error indican el Desvío Standard.



**Figura 4.10.** Cromatogramas obtenidos por GC-FID de los hidrocarburos en suelo incluyendo compuestos isoprenoides para: tiempo inicial (A), post-tratamiento en el sistema control (B) y en el sistema bioestimulado (C).

Se realizó el análisis de algunos hidrocarburos isoprenoides mediante GC-FID (Figura 4.10) de manera de estimar las pérdidas por evaporación, de acuerdo a la relativa baja tasa de evaporación y alta resistencia a la biodegradación que presentan esos compuestos (Snape y col., 2005; Martínez-Alvarez y col., 2015). Se considera que los isoprenoides son resistentes a la biodegradación. El porcentaje de remoción de  $iC_{14}$ ,  $iC_{15}$  y  $iC_{16}$  en el control (CC) y en el tratamiento bioestimulado (BS) se presentan en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Remoción de hidrocarburos isoprenoides en cada sistema.

Hidrocarburo isoprenoide	Porcentaje de remoción CC (%)	Porcentaje de remoción BS (%)
iC <sub>14</sub>	43	81
iC <sub>15</sub>	31	77
iC <sub>16</sub>	18	71

Los resultados obtenidos para la biopila CC evidencian que, más allá del uso de sistemas semi-cerrados, la pérdida de hidrocarburos debido a la evaporación fue considerable durante el proceso, presentando valores que oscilaron entre 18 y 43 %, dependiendo del isoprenoide evaluado. Sin embargo, la diferencia en los porcentajes de eliminación entre los sistemas CC y BS para todos los isoprenos analizados sugiere que estos son principalmente biodegradados, o al menos selectivamente eliminados en el sistema en el que la actividad biológica fue estimulada (BS).

#### 4.4. Discusión

Este ensayo a campo complementa y aplica los resultados del análisis previo reportado en el Capítulo 3, en el que la relación C:N:P fue optimizada para la biorremediación del suelo contaminado de la Base Carlini (Martínez Álvarez y col., 2015). Dicha relación optimizada resultó 100:17,6:1,73, para un suelo conteniendo aproximadamente 1200 mg kg<sup>-1</sup> de hidrocarburos. Los resultados de este ensayo a campo sugieren que la estimulación de la microflora indígena usando una relación C:N:P previamente optimizada en biopilas cubiertas es una herramienta adecuada y factible para la biorremediación de suelo de la Base Carlini contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo, alcanzando valores de remoción cercanos al 80% en el sistema tratado.

El objetivo central de este capítulo fue investigar si dicha relación C:N:P optimizada a escala laboratorio también produce altas eficiencias de remoción en ensayos a campo, en los que muchas variables ambientales (como ser la temperatura, viento y precipitaciones) no son controladas. Para este propósito, se diseñaron biopilas cubiertas conteniendo aproximadamente 0,4 toneladas de suelo, dispuestas sobre geomembranas de polietileno de alta densidad (800  $\mu$ m). Este material fue recientemente testado y ha resultado apropiada para el aislamiento y cobertura de biopilas conteniendo suelo antártico contaminado con hidrocarburos (McWatters y col., 2016). Debido a su resistencia y robustez (pueden mantener sus características fisicoquímicas al menos por 3 años incluso expuestas a las extremas condiciones climáticas de

Antártida), estas geomembranas probaron ser una herramienta adecuada para contener y tratar suelos contaminados.

Este experimento demostró que, cuando se bioestimula el suelo, casi el 80% de los hidrocarburos pueden ser removidos en un tratamiento de un solo paso en un procedimiento de 50 días, cuando el nivel inicial de contaminación fue alrededor de 2100 mg kg<sup>-1</sup>. Los valores de remoción cercanos al 50% presentados por el sistema control (CC), en el cual no se aplicó ningún tratamiento de estimulación, fueron el resultado de las pérdidas abióticas y las capacidades intrínsecas de degradación presente en la microflora del suelo (atenuación natural). Es posible asumir que hubo un aporte significativo de las pérdidas abióticas a ese porcentaje de remoción, a través de la evaporación en las etapas iniciales del proceso debido a que: 1) sólo hubo un incremento muy leve en la actividad biológica en el sistema CC, el cual presentaba un nivel basal muy bajo; 2) la relación BDH/BHAT no aumentó a lo largo de todo el ensayo en ese mismo sistema; y 3) la mayor parte de la remoción en el sistema control ocurrió durante los primeros 10 días de tratamiento. En el mismo sentido, esta hipótesis se apoya también en trabajos previos que informaron pérdidas significativas de hidrocarburos debido a volatilización en la fracción liviana alifática del gasoil contaminante en suelos antárticos (Whelan y col., 2015). Estos autores testearon un modelo dinámico de predicción de biorremediación multimedia y reportaron que aunque la biodegradación se predecía como el mecanismo de pérdida de hidrocarburos dominante para la mayoría de las fracciones del gasoil, la volatilización demostraba ser relevante para la fracción alifática más liviana de los compuestos presentes en el combustible diesel.

Respecto a la volatilización de las fracciones más livianas, como ha sido mencionado anteriormente, los compuestos isoprenoides son utilizados como moléculas de referencia para evaluar la evaporación en suelos contaminados (Snape y col., 2005; Snape y col., 2006). En el presente ensayo, el análisis de la fracción de los hidrocarburos isoprenoides (iC<sub>14</sub>-iC<sub>16</sub>) evidenció una evaporación significativa de hidrocarburos durante el experimento, incluso a pesar de que son suelos envejecidos y por lo tanto, en los que se supone que la fracción volátil se encontraría disminuida (Alexander, 2000). Es posible que la mezcla y manejo del suelo exponga núcleos de combustible fresco que no se encontraban expuestos, permitiendo su contacto con el aire y favoreciendo por lo tanto su evaporación.

Resulta interesante resaltar la eliminación incrementada de los isoprenoides en el sistema en el que fue aplicada la bioestimulación. Considerando que los sistemas CC y BS fueron diseñados idénticamente, era esperable que ambos tengan tasas de evaporación similares y, por lo tanto, la eliminación incrementada del sistema BS no puede ser solamente atribuida a la evaporación, sino a otros procesos relacionados con la adición de nutrientes. En este sentido, miembros del género *Pseudomonas* han sido reportados como degradadores de compuestos

isoprenoides (Cantwell y col., 1978), y un comportamiento similar fue previamente descrito para suelos contaminados con hidrocarburos de Base Carlini (Martínez Álvarez y col., 2015), en donde miembros de la familia *Pseudomonadaceae* han sido reportados como habitantes abundantes del suelo (Vazquez y col., 2013). Serán necesarios estudios adicionales, focalizados en la degradación de la fracción de isoprenos a fin de obtener más información acerca de dichos procesos biodegradativos en suelos antárticos.

Por otro lado, es posible que la protección térmica causada por la cobertura de la geomembrana pudiera estar aislando parcialmente a la flora microbiana de las difíciles condiciones ambientales, y por lo tanto favorezca la atenuación natural. Dicha atenuación natural puede también verse incrementada por la versatilidad térmica que la incubación no isotérmica provee a los microorganismos en los ensayos a campo en Antártida. El incremento de los valores de BHAT y BDH, en respuesta a la aireación y el ajuste de la humedad, así como la diferencia en la remoción de hidrocarburos entre los sistemas CC y BS, confirman observaciones previas de que la flora microbiana de suelos crónicamente contaminados de Antártida se encuentra adaptada para tolerar y metabolizar contaminantes derivados de combustibles (Ruberto y col., 2009; Dias y col., 2012), y sería parcialmente responsable de los niveles observados de atenuación natural.

Este experimento fue diseñado en base a predicciones matemáticas y estadísticas obtenidas a partir de un ensayo de superficie de respuesta, el cual fue planeado y llevado a cabo para una concentración de hidrocarburos previamente conocida (Martínez Álvarez y col., 2015). Desde el punto de vista estequiométrico, esta relación optimizada entre C, N y P es teóricamente lineal, y por lo tanto, un incremento en la cantidad de C debe ser seguido por un aumento en los niveles de N y P a agregar a ese suelo de manera de permitir una correcta remoción del contaminante. Sin embargo otros fenómenos, como la modificación en la disponibilidad de cualquiera de los elementos de esta relación, puede romper la linealidad. Además, el hecho de que los hidrocarburos del petróleo son intrínsecamente tóxicos no debe ser ignorado. Niveles más altos de C pueden redundar en una concentración supra-lethal para las especies microbianas que son tolerantes a este contaminante, causando un descenso en la actividad biológica del suelo tratado y, por lo tanto, una disminución de la eficiencia general del proceso. Por estas razones, es necesario seguir indagando para explorar el rango de concentración de contaminante en el cual la predicción matemática se cumple.

La tasa de remoción de hidrocarburos es crucial cuando el tiempo es un factor a considerar. Esto es particularmente crucial para el continente antártico, donde un esquema de biorremediación se encuentra siempre limitado a los meses de verano, temporada en la cual el suelo se encuentra descongelado y sin cobertura de nieve. En este sentido, Bardi y col., (2000) compararon la tasa de degradación de ciertos hidrocarburos modelo en medios líquidos a 28°C

usando beta-ciclodextrina como surfactante, reportando una degradación completa de 40,000 mg kg<sup>-1</sup> de dodecano en 4 días en el sistema con surfactante, y 9 días en el sistema sin él. Estos valores resultan en tasas de remoción de 10,000 y 4,444 mg kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> en los sistemas con y sin surfactante respectivamente. A pesar de haber sido obtenido en medio líquido y a 28°C usando un hidrocarburo alifático simple, estos valores pueden ser considerados de referencia como alta tasa de remoción. En este mismo sentido, Liu y col., (2011), trabajando con suelo contaminado con 14,000 mg kg<sup>-1</sup> de gasoil, reportaron una eficiencia de remoción al cabo de 140 días, de 79,7% para un sistema en el que se aplicó bioestimulación de manera de alcanzar un C:N:P de 100:11:3,7 por adición de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Los autores refirieron que la mayor remoción (69,8%) ocurrió durante los primeros 35 días, con una tasa de eliminación de 273,5 mg kg<sup>-1</sup> por día. Ellos sugieren la existencia de una primera etapa de remoción, seguida de un plateau durante el cual la degradación parece estar limitada.

Un patrón similar fue observado durante nuestro experimento a campo en la Base Carlini. El gráfico de remoción de hidrocarburos muestra claramente dos pendientes diferentes: una para el sistema BS desde el día 0 al día 20 (65,1 mg kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, 2,99 % día<sup>-1</sup>), otra para el CC en el mismo periodo (38,2 mg kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, 1,75 % día<sup>-1</sup>); y una última, similar para ambos sistemas, desde el día 20 al día 40 (17,4 mg kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> y 15,7 mg kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>, 0,80 y 0,73% día<sup>-1</sup> respectivamente). La tasa de remoción expresada como valores absolutos (mg kg<sup>-1</sup>) mostrada por el sistema BS durante los primeros 20 días es significativamente menor que aquellas reportadas por Liu y col., (2011), pero se tornan comparables cuando se expresa como porcentaje de remoción (2,99% vs 1,95% por día). Esta información es particularmente útil cuando se consideran estrategias de biorremediación en Antártida, en donde la mayoría de los procesos se encuentran limitados a los meses de verano, y el éxito del tratamiento puede depender en gran parte de las tasas de degradación del contaminante que puedan alcanzarse. Sin embargo, un suelo contaminado con hidrocarburos es una matriz mucho más complicada que un medio líquido conteniendo un único hidrocarburo alifático, como ser por ejemplo el dodecano. Hay muchas fases distintas, incluyendo partículas de suelo, microorganismos, aire, agua, líquidos insolubles e hidrocarburos en estado sólido. Además, los hidrocarburos pueden estar presentes en distintos estados: soluble, insoluble, gaseoso, adsorbido a partículas de suelo o a microorganismos. Esta amplia variedad de posibilidades puede generar una indeseada imprevisibilidad y falta de robustez de los esquemas de biorremediación, causando que los resultados de un experimento previo no se relacionen para nada con aquellos obtenidos en replicas o en escalados de procesos.

El diseño experimental utilizado en este capítulo (biopilas cubiertas y cerradas por geomembranas), generó diversos efectos. Por un lado, proveyó al suelo de protección contra la nieve, la lluvia y/o el viento (Figura 4.11). Por otro lado, como se mencionó previamente, la

cubierta con membrana de color negro mostró un efecto de amortiguación térmica, resultando en un aumento en la temperatura promedio del suelo, similar al reportado por Delille y col., (2004, 2007). El aumento de la temperatura del suelo es muchas veces un efecto buscado en pos de favorecer una mayor biodegradación de hidrocarburos (Filler y col., 2001). En el presente ensayo, ese efecto pareció ser mucho más evidente durante las horas nocturnas, cuando las biopilas no recibían radiación solar, registrándose diferencias de más de 6°C al comparar el suelo dentro y fuera de la geomembrana. En cambio, las horas con presencia de luz solar demostraron tener un mayor efecto de calentamiento en el suelo descubierto en comparación con el suelo dentro de las biopilas, en donde la elevación de la temperatura fue más sutil, mostrando una amplitud térmica más estrecha.



**Figura 4.11.** El suelo en tratamiento fue protegido de las adversas condiciones climáticas por la utilización de la geomembrana.

Este efecto de amortiguación de temperatura generado por la protección de la geomembrana puede proveer un ambiente más amigable para el crecimiento de la microbiota del suelo. Desde el punto de vista de la temperatura óptima de crecimiento, este cambio de temperatura más sutil puede favorecer el desarrollo de bacterias psicrófilas, al evitar picos y mínimos de temperatura que puedan causar la inhibición o detención del crecimiento de una fracción de la población microbiana, y por lo tanto, afectar la eficiencia final de la biorremediación. Sin embargo, también podría suceder que los miembros de la comunidad que presenten temperaturas óptimas de crecimiento más altas no se vean favorecidos por este efecto de amortiguación. A su vez, como se mencionó previamente, el hecho de que este proceso no se haya realizado bajo condiciones isotérmicas, puede favorecer el desarrollo de especies microbianas que presenten distintas temperaturas óptimas de crecimiento, en contraste con la

presión selectiva impuesta sobre la comunidad cuando se la incubaba a una temperatura constante.

Estas observaciones generan el cuestionamiento acerca de qué conviene elegir para favorecer la biodegradación: ¿amortiguación térmica o picos de temperatura? El patrón térmico obtenido en este ensayo a campo, causado meramente por las condiciones climáticas (pero atenuadas por la conformación de la biopila y la presencia de la geomembrana) puede favorecer el desarrollo de una flora microbiana más diversa, con mayores capacidades catabólicas, capaz de aumentar la eficiencia de remoción de hidrocarburos en comparación con los procesos isotérmicos (Chang y col., 2011). Es importante destacar que Delille y col., (2008) reportó un muy leve efecto de la temperatura (4, 10 y 20 °C) sobre la degradación de hidrocarburos en agua de mar de origen sub-antártico. Esos resultados no están de acuerdo con la presunción de que las tasas biológicas aumentan cuando se incrementa la temperatura. Otra forma de analizar esto sería mediante la utilización de los coeficientes de  $Q_{10}$  como reportaran Mikan y col., (2002) para la tundra del ártico o Bagi y col., (2013) para ambientes marinos. El coeficiente  $Q_{10}$  representa la relación entre las velocidades de una determinada reacción registradas frente a cambios de 10°C de temperatura. De acuerdo a Brakstadt y col., (2009), un  $Q_{10}$  de entre 2 y 3 puede ser considerado de referencia para los cálculos de tasas de biodegradación a dos temperaturas diferentes. Para regiones polares en particular, este valor de referencia se considera más cercano a 3, pero las generalizaciones referidas a suelos polares suelen llevar a resultados erróneos. Por ejemplo, Chang y col., (2011) calculó un  $Q_{10}$  de 2,2 para un suelo sub-ártico, pero también reportó un salto exponencial en la actividad biológica a temperaturas superiores a 4,7°C, sugiriendo que estas actividades no siguen un patrón lineal con la temperatura. Desde esta perspectiva, un aumento de temperatura de solo 1,5°C (como el registrado en este ensayo a causa de la geomembrana) puede determinar un aumento significativo en la tasa de degradación de hidrocarburos, especialmente al considerar que más del 70% de las temperaturas registradas dentro de las biopilas fueron superiores a 4,7°C, en contraste con solo el 49% de las mediciones por encima de este valor en el suelo descubierto. Ensayos dirigidos a analizar los cambios en la comunidad microbiana y la influencia de la protección térmica generada por la geomembrana sobre la eficiencia final del proceso ayudarían a confirmar o descartar estas hipótesis.

La conductividad del suelo demostró seguir un patrón regular, presentando picos cada 2 días en el sistema bioestimulado, que correlaciona con los días en los que el suelo era mezclado. Esta observación sugiere que el mezclado del suelo es muy relevante para la solubilización, y por tanto, la disponibilidad de los nutrientes para la flora microbiana. La aireación es la razón principal para el mezclado en la mayoría de los procesos de biorremediación a gran escala. En estos casos, la aireación mecánica mediante el uso de caños o tuberías puede ser considerada como una alternativa atractiva en lugar de la mezcla manual. Sin embargo, ese enfoque solo

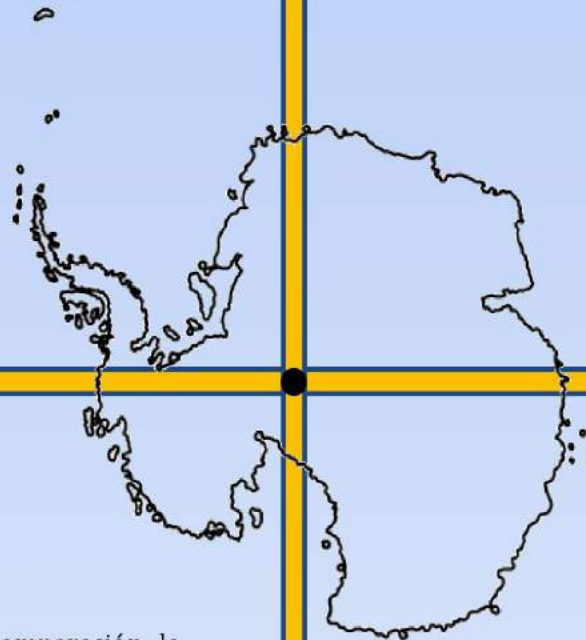


considera la disponibilidad de O<sub>2</sub>, y no de otros sustratos como el N y el P. Los cambios en la conductividad evidenciados durante este experimento sugieren que la mezcla del suelo produce efectos que van más allá de la mera aireación del mismo. Por esta razón, la mezcla y homogeneización del suelo (cuando es posible) es un paso crucial en este tipo de pruebas experimentales, y en potenciales aplicaciones a situaciones reales. La alta eficiencia de remoción obtenida al utilizar el esquema pre-optimizado de C:N:P sugiere que es posible lograr predictibilidad durante el escalado del proceso cuando se realiza una apropiada homogeneización del suelo contaminado.

#### **4.5. Conclusión**

La eficiencia de remoción de hidrocarburos obtenida en este ensayo a escala piloto (más del 75% en sólo 40 días) confirma la ventaja de optimizar las condiciones de la bioestimulación mediante el uso de RSM como se mencionó en el Capítulo 3. Los resultados obtenidos en esta sección, sugieren que la combinación del uso de una estrategia de bioestimulación optimizada y el uso de biopilas *on-site* cubiertas con geomembranas representan una herramienta adecuada para implementar durante los meses de verano en el tratamiento de suelos contaminados con gasoil de la Base Carlini. Este método resulta ser de bajo costo, simple y eficiente para el tratamiento de suelos contaminados con diésel en bases antárticas en general, en donde el periodo de tratamiento se encuentra limitado solamente a los meses de verano, así como también en otras regiones polares o de clima frío en general a lo largo del planeta.

## **5. Segundo ensayo a campo con biopilas: Comparación de la eficiencia e identificación de variables clave**



“La perspectiva permite el juicio, la comparación, la reflexión”

*Jean Paul Sartre*

### 5.1. Introducción

La estrategia de bioestimulación desarrollada y descrita en los capítulos anteriores, demostró ser efectiva para la remediación *on-site* de suelo antártico contaminado con hidrocarburos del petróleo, en el tiempo disponible durante las campañas antárticas de verano. La optimización previa de la relación C:N:P y su posterior implementación en el campo permitieron remover hasta un 75% de los hidrocarburos, en apenas 50 días de tratamiento en Base Carlini.

Sin embargo, resulta indispensable analizar la robustez y la reproducibilidad de los resultados obtenidos con la estrategia elegida y analizar aquellos factores y variables que puedan afectar dicha reproducibilidad durante distintas aplicaciones. Cabe destacar que el trabajo realizado en esta tesis, así como el de cualquier tratamiento de biorremediación a campo, cuenta con situaciones y variables que no pueden preverse al momento de determinar el enfoque científico a utilizar. Dentro de dichas variables, el nivel de contaminación inicial del suelo a tratar es la más obvia y determinante. La aplicación de las condiciones de bioestimulación optimizadas a condiciones operativas reales debe tener siempre en cuenta ese nivel de contaminación inicial, y ser efectiva para un amplio rango de niveles de contaminación, ya que al momento de llevar a cabo el esquema de biorremediación elegido, éste tiene que ser lo suficientemente robusto como para garantizar buenos resultados en un amplio rango de condiciones (Coulon y col., 2010; Inoue y Katayama, 2011). Niveles de contaminación muy elevados pueden implicar a su vez mayores tiempos de tratamiento, además de una toxicidad muy marcada para la población microbiana, disminuyendo su capacidad intrínseca de metabolizar los hidrocarburos (Schafer y col., 2007; Harvey y col., 2011; van Dorst y col., 2014). Por otro lado, niveles bajos de contaminación podrían generar falta de disponibilidad del sustrato a degradar. En ambos casos, estos resultados pueden conducir a la interpretación errónea de que el esquema de biorremediación empleado no tiene la eficiencia esperada, cuando en realidad dicho efecto es atribuible a una variable no controlada.

Es posible (y probable) que esa eficiencia se vea afectada también por variables que difieran en cada caso de aplicación. Esto es esperable dada la complejidad intrínseca de los sistemas biológicos, así como de la matriz suelo. Las características granulométricas del mismo, así como también la capacidad máxima de retención de agua y la carga microbiana y su diversidad son algunos ejemplos de esa complejidad. Además, ya que estos tratamientos se desarrollan a campo en Antártida, las condiciones ambientales no controladas como la cantidad de nieve, viento, radiación solar, temperatura ambiente, etc., podrían modificar el comportamiento de las biopilas ensayadas, afectando ulteriormente los resultados obtenidos.

Debido a lo previamente mencionado, en este capítulo se desarrollan los resultados de la aplicación de una réplica del ensayo reportado en el Capítulo 4, realizado durante la campaña de verano del año 2014/2015, a fin de comparar la robustez de los resultados obtenidos durante 2 campañas consecutivas utilizando biopilas en Base Carlini para la biorremediación de suelo contaminado con gasoil. Además, se evaluaron y determinaron algunas de las variables que pueden afectar la eficiencia final del proceso en condiciones operativas reales, y se determinaron aquellas que resultan más influyentes.

## **5.2. Materiales y métodos**

Para la realización de este ensayo, y dado que se buscó realizar una réplica del ensayo descrito en el Capítulo 4, la metodología aplicada para su realización es la descrita en la Sección 4.2.

### **5.2.1. Análisis del suelo y caracterización**

Brevemente, el suelo fue recolectado de la misma área que en el ensayo realizado el año previo en Base Carlini (Isla 25 de Mayo, Shetlands del Sur, 62°14'18"S 58°40'05"W) durante diciembre de 2014, en la Campaña Antártica Argentina de 2014/2015. Este suelo contenía un promedio de  $6098 \pm 486$  mg kg<sup>-1</sup> de hidrocarburos derivados del petróleo. Se extrajo, tamizó y acondicionó una cantidad de suelo similar a la del experimento previo (aproximadamente 830 kg).

### **5.2.2. Diseño de biopilas y determinaciones**

La conformación de las biopilas siguió el mismo protocolo descrito en la Sección 4.2.2. En este caso, también se dispuso el suelo en 2 pirámides truncadas, una para el sistema bioestimulado mediante la adición de nutrientes en la relación C:N:P optimizada (BS-II), y una biopila control (CC-II). Las biopilas pertenecientes al ensayo descrito en el capítulo anterior serán denominadas en adelante BS-I (bioestimulada) y CC-I (control) respectivamente. La adición de nutrientes, toma de muestras, cuantificación de hidrocarburos totales y de recuentos bacterianos y actividad biológica, así como el seguimiento de las propiedades físico-químicas del suelo siguieron los mismos protocolos que aquellos descritos en el Capítulo 4.

### 5.2.3. Ensayo en mesocosmos

Con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración inicial del contaminante sobre la eficiencia del proceso, y su posible efecto sobre la linealidad de la relación C:N:P, se realizó un ensayo de campo a mesoescala. Para el mismo, se conformaron 4 biopilas pequeñas de aproximadamente 10 kg de suelo no contaminado y homogeneizado (Figura 5.1). El suelo se dispuso sobre geomembrana de polietileno de alta densidad, siguiendo los mismos procedimientos descritos en la Sección 4.2.2. Cada una de las biopilas fue contaminada artificialmente con gasoil antártico (GOA) hasta alcanzar niveles de 2.500, 5.000, 7.500 y 10.000 mg kg<sup>-1</sup> de hidrocarburos y bioestimulada para alcanzar la relación C:N:P optimizada como se describió previamente. Los protocolos de muestreo y los parámetros analizados (hidrocarburos totales, actividad biológica, propiedades fisicoquímicas) fueron los mismos descritos para las biopilas en la Sección 4.2.2.



**Figura 5.1.** Disposición de los ensayos en mesocosmos, conteniendo 10 kg de suelo por sistema.

#### 5.2.4. Variables ambientales

En pos de evaluar efectos significativos de las variables ambientales no controlables, se obtuvieron los datos de temperatura ambiente (registrada cada 6 horas) y cantidad de horas de sol por día para los períodos experimentales 2013/2014 y 2014/2015. Esta información fue provista por el Servicio Meteorológico Nacional, que posee una estación meteorológica para estos fines en Base Carlini.

Además, a partir de los valores de temperatura registrados dentro de las biopilas, se calcularon los “grados-día de derretimiento”. Se definieron los grados día (u hora) como la sumatoria, a lo largo de un período de tiempo determinado, de las diferencias de temperatura entre un valor de referencia seleccionado (en este caso 0°C) y la temperatura media diaria u horaria registrada. Los valores positivos son sumados y acumulados, y a esta sumatoria se le restan los valores negativos registrados, hasta obtener el valor final para el período de estudio. Estas diferencias acumuladas a lo largo del tiempo pueden ser usadas como un índice del efecto de la temperatura a lo largo de un periodo de tiempo. Este término es utilizado frecuentemente en ingeniería o arquitectura como medida de la necesidad de calorías para calefaccionar (grados-día de calefacción), así como en geología para estudios de permafrost y su comportamiento a lo largo de los años, en función de las temperaturas medias de esos años (Boyd y col., 1976; Gugleilmin y col., 2008; Vermette y col., 2008). Para los objetivos de esta tesis, se utilizó “grados-día de derretimiento” asumiendo que para obtener una apropiada actividad biológica en los suelos tratados, el mismo debe encontrarse por encima de los 0°C, es decir, no encontrarse congelado. El hecho de que el agua presente en las células se encuentre en estado líquido es fundamental para su normal metabolismo, y así, la posibilidad de degradar el contaminante.

La forma de calcular los grados-día es:

$$\text{Grados día} = \sum_n^i ((Ta - To) + (Tb - To))$$

Los grados-día (o grados-hora si se usa la temperatura media por hora) entonces son la sumatoria de las temperaturas registradas entre el tiempo inicial  $i$ , hasta el tiempo final  $n$ , donde  $Ta$  son valores positivos de temperatura diaria (u horaria) registrada;  $Tb$  son los valores negativos de temperatura diaria (u horaria) registrada; y  $To$  es la temperatura de referencia sobre la cual se calculan los grados día. En el caso de esta tesis, los “grados-derretimiento” utilizan una temperatura de referencia de 0°C y las temperaturas medias fueron calculadas a partir de los dos registros obtenidos cada 1 hora en cada biopila, dando lugar a los “grados-

hora”, debido a que permite obtener una cantidad mucho mayor de datos, y por ende aumenta la precisión de los resultados obtenidos.

### 5.2.5. Análisis estadístico

El procesamiento de los datos fue realizado con el software estadístico R (R Core Team, 2014). Se utilizaron en conjunto los datos de los experimentos de los dos años para hallar las variables que resulten significativas sobre la eficiencia final del proceso. Solamente las variables de carácter numérico fueron incluidas. Se realizaron matrices de correlación entre dichas variables en pos de encontrar aquellas que presenten altos grados de correlación entre sí, como así también con el porcentaje remoción de hidrocarburos (variable respuesta analizada). Para ello, se utilizó la función *pairs* del paquete “Hmisc” de R.

Posteriormente, con el uso de la función *rcorr* y los paquetes “*corrplot*”, “*ggplot*”, y “*Hmisc*” se obtuvo la visualización gráfica de las matrices de correlación, con intervalos de confianza y reordenamiento de variables para identificar las variables significativas. Se utilizaron diferentes niveles de significancia ( $\alpha < 0,1$ ;  $\alpha < 0,05$  y  $\alpha < 0,01$ ) para analizar el comportamiento del efecto de cada una de las variables significativas. Entre las variables incluidas en el análisis se encuentran los datos de los experimentos de ambos años de las siguientes variables:

- Días de tratamiento (días)
- Concentración inicial del contaminante ( $\text{mg kg}^{-1}$ )
- Temperatura de la biopila ( $^{\circ}\text{C}$ )
- Temperatura ambiente ( $^{\circ}\text{C}$ )
- Temperatura del suelo no contenido en biopila ( $^{\circ}\text{C}$ )
- Insolación (horas/día)
- Humedad ( $\text{g H}_2\text{O}/100\text{g suelo}$ )
- Recuentos bacterianos totales (UFC BHAT/ml)
- Recuentos de bacterias degradadoras (UFC BDH/ml)
- Valores obtenidos por FDA ( $\mu\text{g}$  de fluoresceína liberados/g de suelo)
- Conductividad ( $\text{dS/m}$ )
- Tasa de remoción ( $\text{mg kg}^{-1}/\text{día}$ )
- $\text{mg kg}^{-1}$  degradados totales ( $\text{mg kg}^{-1}$ )
- $\text{mg kg}^{-1}$  degradados en comparación con el tiempo anterior ( $\text{mg kg}^{-1}$ )
- Tasa de remoción en comparación con el tiempo anterior ( $\text{mg kg}^{-1}/\text{día}$ )
- Porcentaje de remoción (variable respuesta, %)

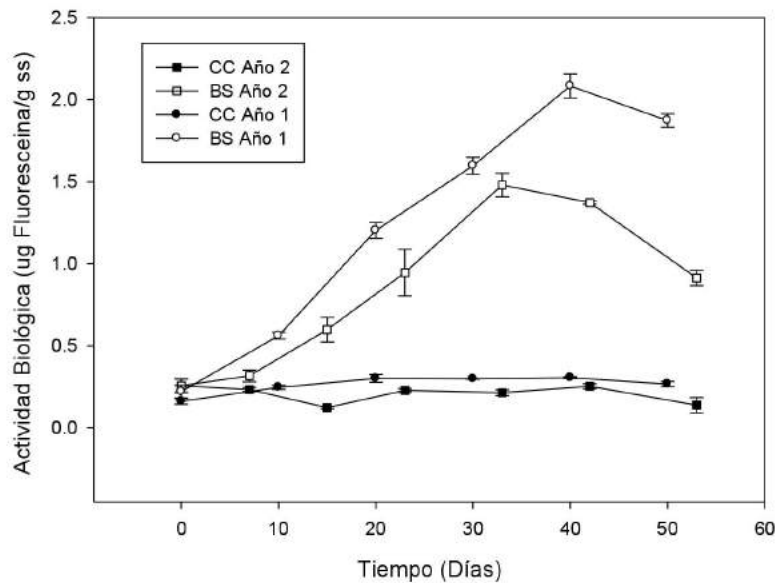
El método elegido para la visualización (círculos) relaciona los tamaños de cada círculo con su valor *p* de significancia y excluye (cruces) aquellas variables con valor de *p* por debajo de ese nivel. Además, aquellos factores que correlacionan positivamente con la variable respuesta son mostrados en color azul, mientras que los que tienen una correlación con efecto negativo sobre la misma, son presentados en rojo.

### **5.3. Resultados**

#### **5.3.1. Actividad biológica**

La actividad biológica (determinada como los niveles de liberación de fluoresceína) en los sistemas bioestimulados (BS-I y BS-II) fueron siempre significativamente mayores que los observados en los sistemas control (CC-I y CC-II,  $p < 0,01$  Figura 5.3). El incremento en la actividad fue constante hasta los 30 o 40 días, cuando se alcanzaron valores hasta 9 y 7 veces mayores la inicial para BS-I y BS-II, respectivamente. La relación BS/CC para ambos años también demostró seguir un aumento lineal, alcanzando valores de 7/1 y 6/1 para los días 40 y 30, respectivamente. Estos hechos, sumados al escaso incremento de la actividad biológica mostrado por los sistemas CC de ambos años, evidencia que la adición de nutrientes (N y P en este caso) resulta vital para alcanzar niveles de actividad biológica apropiados para llevar a cabo esquemas de biorremediación en estos suelos tratados y demuestran que estos suelos antárticos no proveen cantidades suficientes de N y P para permitir a la comunidad microbiana una atenuación natural efectiva de la contaminación.



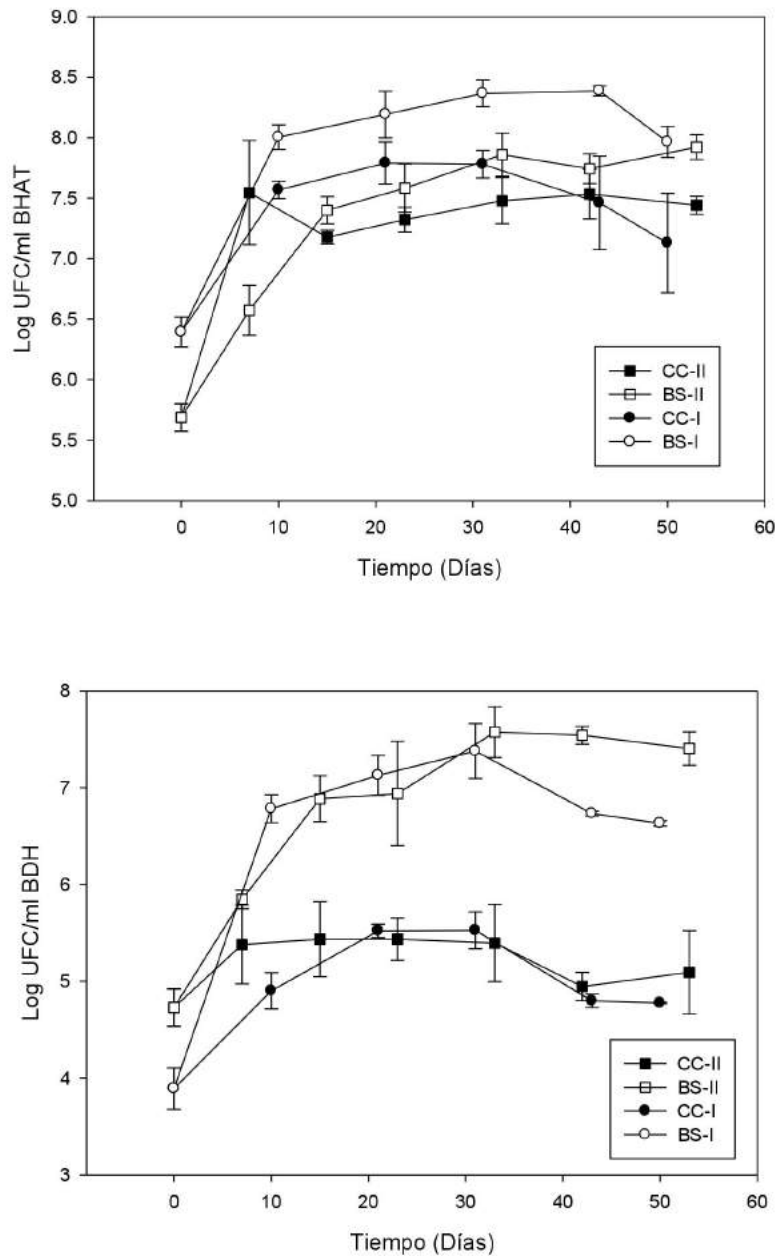


**Figura 5.3.** Niveles de actividad biológica inferidos por liberación de fluoresceína para los sistemas Control (CC-I y CC-II) y Bioestimulado (BS-I y BS-II) de las biopilas realizadas durante las campañas antárticas 2013/2014 (biopilas I) y 2014/2015 (biopilas II).

### 5.3.2. Recuentos bacterianos

En el segundo ensayo de biopilas (biopilas II), tanto las BHAT como las BDH exhibieron un considerable incremento de los recuentos durante los primeros 10 días de tratamiento, alcanzando sus valores máximos el día 30 tanto en el sistema BS como CC. Estos resultados son coincidentes con los observados en las biopilas descritas en el capítulo anterior (biopilas I) (Figura 5.2). El hecho de que esa primera etapa de aumento fuese observada para ambos sistemas (BS y CC), reforzó la hipótesis de que el factor clave detrás de este fenómeno es el mezclado y aireación del suelo durante las primeras etapas del tratamiento. Luego del día 10, los valores de BHAT y de BDH continuaron incrementándose, pero a una tasa menor bajo ambas condiciones. Los recuentos de BHAT y BDH aumentaron más de dos órdenes de magnitud, hasta valores superiores a  $1 \times 10^8$  UFC/ml y  $1 \times 10^6$  UFC/ml respectivamente, en los sistemas bioestimulados de ambos años, con una leve tendencia a valores mayores para el 1er año (BS-I > BS-II y CC-I > CC-II). Sin embargo, las BDH aumentaron sustancialmente más en los sistemas BS para ambos años, en comparación con los sistemas CC. Como puede observarse en la Figura 5.2, los valores en BS-I descendieron luego de los 30 días, mientras que en BS-II, estos valores se mantuvieron elevados hasta el final del ensayo a campo. En cualquier caso, así como se

mencionó para la actividad biológica, el hecho de que los recuentos bacterianos fueran marcadamente mayores en los sistemas BS demuestra que la adición de nutrientes es crucial para el desarrollo de bacterias degradadoras de hidrocarburos hasta niveles suficientes para biorremediar suelos, incluso en Antártida.

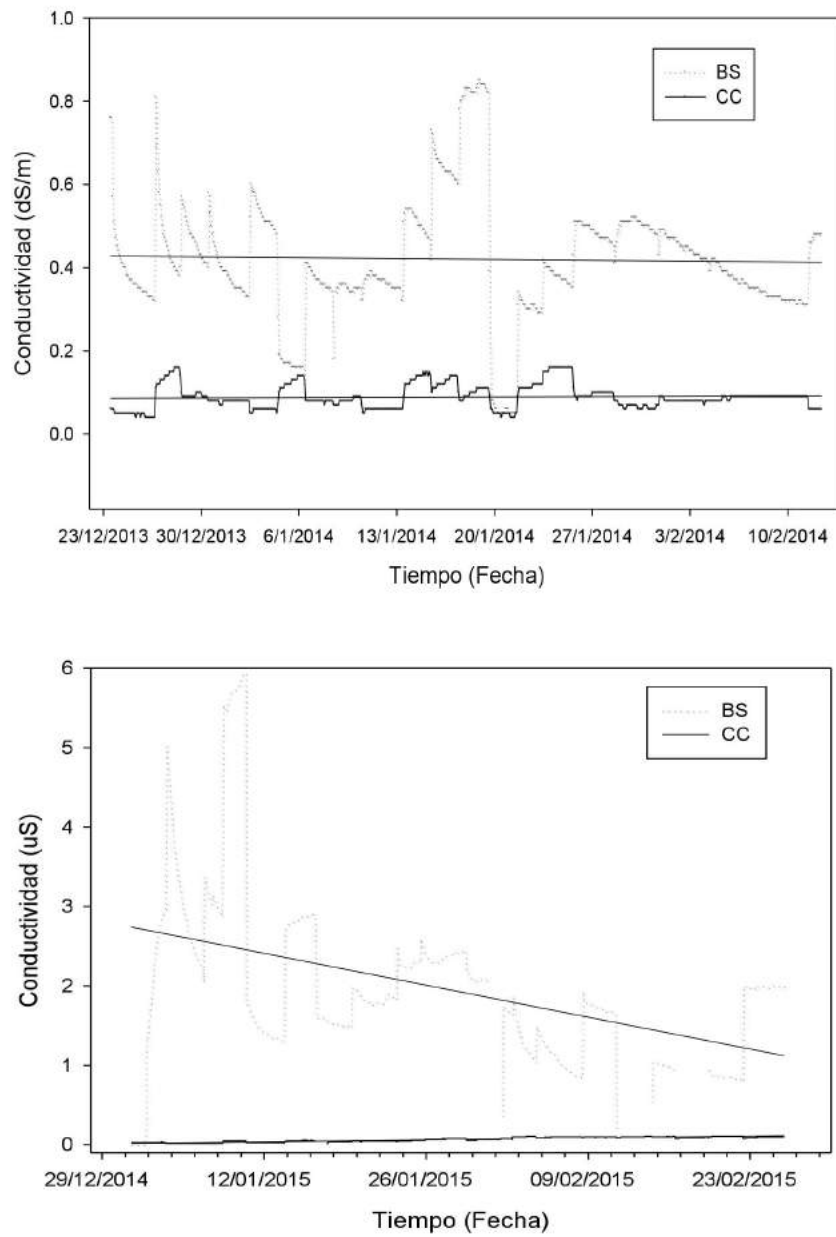


**Figura 5.2.** Recuentos bacterianos para los sistemas Control (CC) y Bioestimulado (BS) de las biopilas realizadas durante las campañas antárticas 2013/2014 (biopilas I) y 2014/2015 (biopilas II). A) Bacterias Heterotróficas Aerobias Totales (BHAT) expresadas como Unidades Formadoras de Colonias por ml. B) Bacterias Degradadoras de Hidrocarburos (BDH) expresadas como Unidades Formadoras de Colonias por ml.

### **5.3.3. Seguimiento de las propiedades físicas**

#### **5.3.3.1. Conductividad**

En ambos años se observó una marcada diferencia en los valores de conductividad entre las biopilas BS y CC, incluso en el tiempo 0 (Figura 5.4). Estas diferencias, atribuibles al agregado de nutrientes para la bioestimulación de las biopilas BS, proporcionan al suelo un mayor número de iones en comparación con las biopilas CC, a las que sólo se adicionó agua destilada. Los bajos valores de conductividad en las biopilas CC, que prácticamente no se modificaron a lo largo de los ensayos, reflejan los bajos niveles de iones presentes o disponibles en suelos antárticos. Además, los picos de conductividad evidenciados cada dos días para las biopilas BS-I y II se corresponden con los días de mezclado de suelo, sugiriendo que dicha mezcla fue efectiva para aumentar la solubilidad, y consecuentemente la biodisponibilidad de los nutrientes agregados para la flora microbiana. A diferencia de lo observado en BS-I, donde el valor promedio de conductividad permaneció prácticamente inalterado durante todo el período experimental (pendientes de -0,0003 para BS y 0,0001 para CC), en BS-II la intensidad de los picos fue descendiendo drásticamente a lo largo del experimento, demostrando un cierto descenso en la disponibilidad de los nutrientes al final del mismo. Esta restricción en la disponibilidad del N y P agregado en BS-II puede explicar (al menos de forma parcial) la limitación en la degradación de hidrocarburos obtenida durante los últimos días del experimento. Por otro lado, como el suelo en las biopilas II contenía un nivel de contaminación significativamente mayor, la adición de nutrientes que fue necesaria de acuerdo a la relación C:N:P optimizada fue también mayor, generando niveles de conductividad mucho mayores. Este efecto puede haber causado algún tipo de inhibición de la actividad biológica, quizás al exceder la capacidad de retención de agua máxima del suelo en tratamiento.



**Figura 5.4.** Valores de conductividad registrados en los sistemas BS y CC durante el desarrollo de las biopilas realizadas durante las campañas antárticas 2013/2014 (biopilas I, gráfico superior) y 2014/2015 (biopilas II, gráfico inferior).

### 5.3.3.2. Temperatura

La geomembrana incrementó la temperatura media del suelo contenido en las biopilas. Así, la temperatura media registrada para las biopilas de ambos años fue significativamente mayor que la del suelo descubierto circundante (ANOVA  $p < 0,01$ , Tabla 5.1). Sin embargo, la diferencia entre dichas temperaturas medias fue marcadamente mayor durante el primer año (1,3°C), en comparación con el segundo (solamente 0,3°C), sugiriendo que la temperatura del suelo dentro de las biopilas no es totalmente explicada por la cobertura de la membrana. Los registros de temperatura para las biopilas y el suelo descubierto de cada año se muestran en la Figura 5.5.

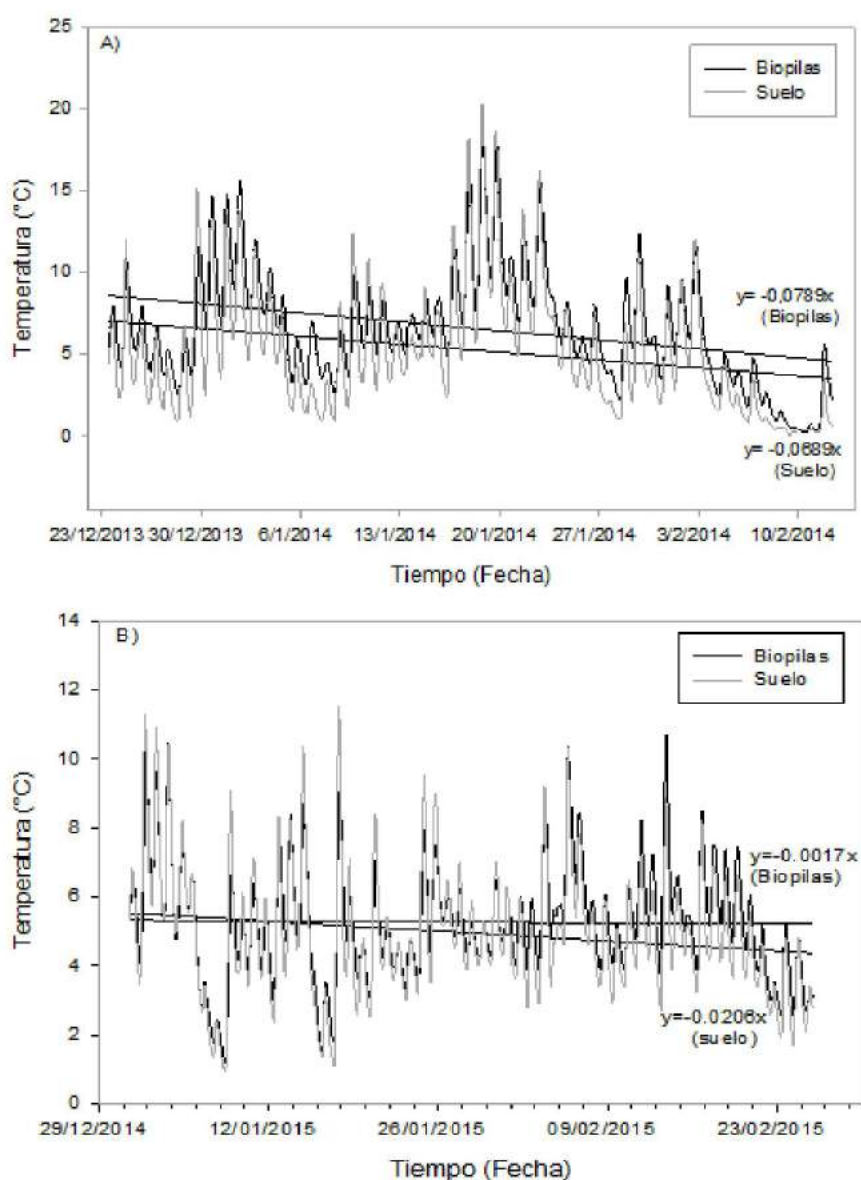
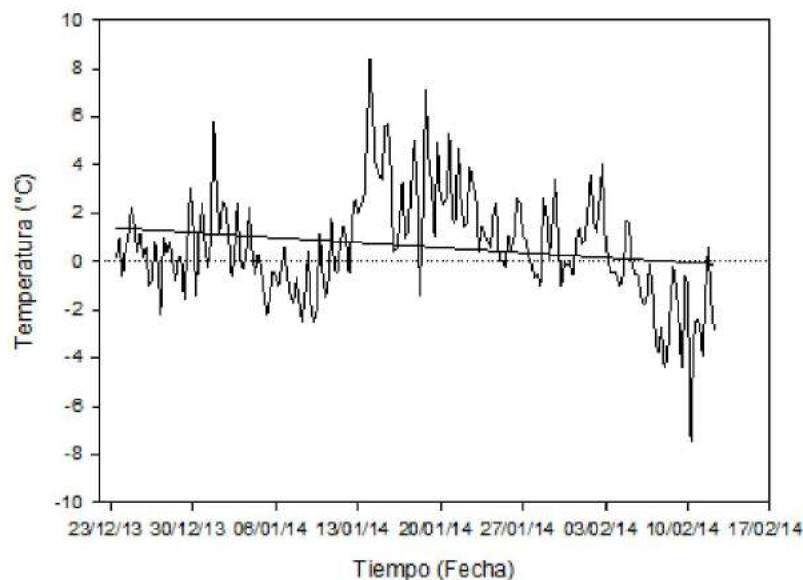
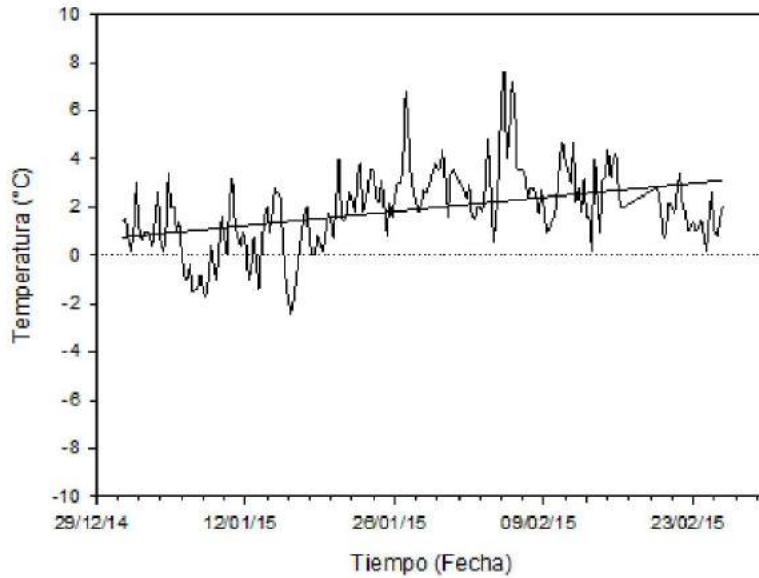


Figura 5.5. A) Registro de temperatura de las biopilas y del suelo descubierto para el experimento I (2013/2014). B) Mismo registro de temperatura para el experimento II (2014/2015).

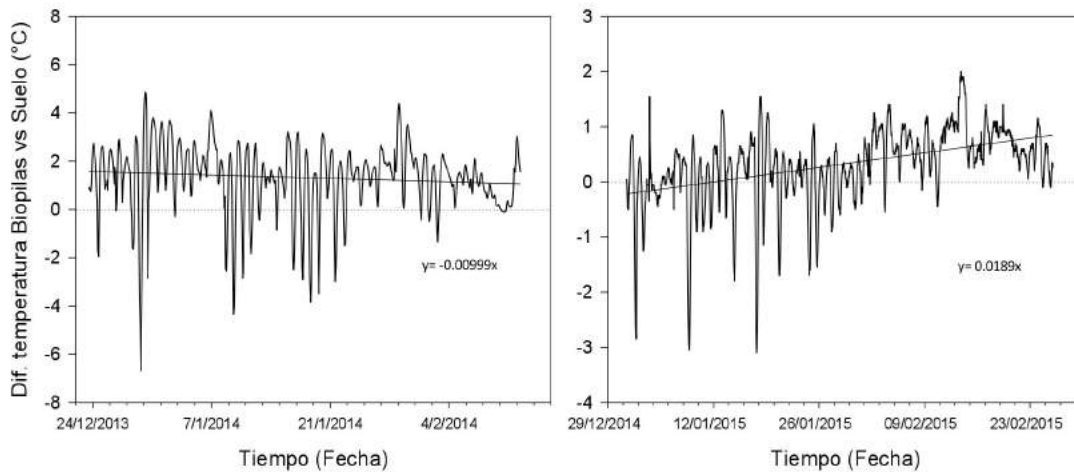
La temperatura ambiente fue más baja y variable durante I (Figuras 5.6 y 5.7). Además, como se puede observar en la Figura 5.8, los valores obtenidos debajo de la línea de 0°C (que representan aquellos registros en los que la temperatura de la biopila era menor que la del suelo descubierto) fueron aproximadamente el doble durante el segundo año (más del 23% de los registros en II, frente al 12% de I), indicando que las biopilas estuvieron a mayor temperatura que el suelo descubierto por casi el doble de tiempo durante el primer año. Estas diferencias siguen el mismo patrón descrito en el Capítulo 4, en el cual se describió cómo la diferencia de temperaturas entre las biopilas y el suelo descubierto mostraban valores positivos durante la noche, y negativos durante el día, manteniéndose más cálidos los suelos dentro de la geomembrana (primordialmente durante los periodos sin radiación solar), y reduciendo la amplitud térmica registrada en ellos.



**Figura 5.6.** Registro de la temperatura ambiente durante el período experimental I (campaña antártica 2013/2014).



**Figura 5.7.** Registro de la temperatura ambiente durante el período experimental II (campana antártica 2014/2015).



**Figura 5.8.** Diferencia de la temperatura de las biopilas vs suelo descubierto a lo largo de todo el período experimental de los ensayos realizados durante las campañas antárticas 2013/2014 (biopilas I, izquierda) y 2014/2015 (biopilas II, derecha).

Otro de los parámetros calculados fue el de la relación de valores de temperatura registrados por encima de 4,7°C. Este valor fue considerado en base a lo reportado por Chang y col. (2011), quienes al comparar el efecto de la temperatura del sitio de tratamiento de suelos contaminados

de regiones frías a escala piloto, reportaron un incremento exponencial de actividad biológica a valores de temperatura mayores a 4,7°C. En el presente trabajo de tesis, se obtuvo una mayor cantidad de registros superiores a 4,7°C durante las biopilas del primer año (69,53%) comparado con su contraparte del segundo año (63,84%). De acuerdo a las conclusiones de Chang y col. (2011), esta diferencia en la cantidad de tiempo en la cual la biopila se encontró a más de 4,7°C podría significar una mayor actividad biológica, y por ende una mayor remoción del contaminante por la flora microbiana. Cabe destacar que los registros para el suelo descubierto fueron muy similares ambos años (49%), indicando que la diferencia en la cantidad de registros superiores a ese valor umbral tuvo que ver fundamentalmente con el aislamiento y conformación de las biopilas y el efecto de la cobertura por la geomembrana.

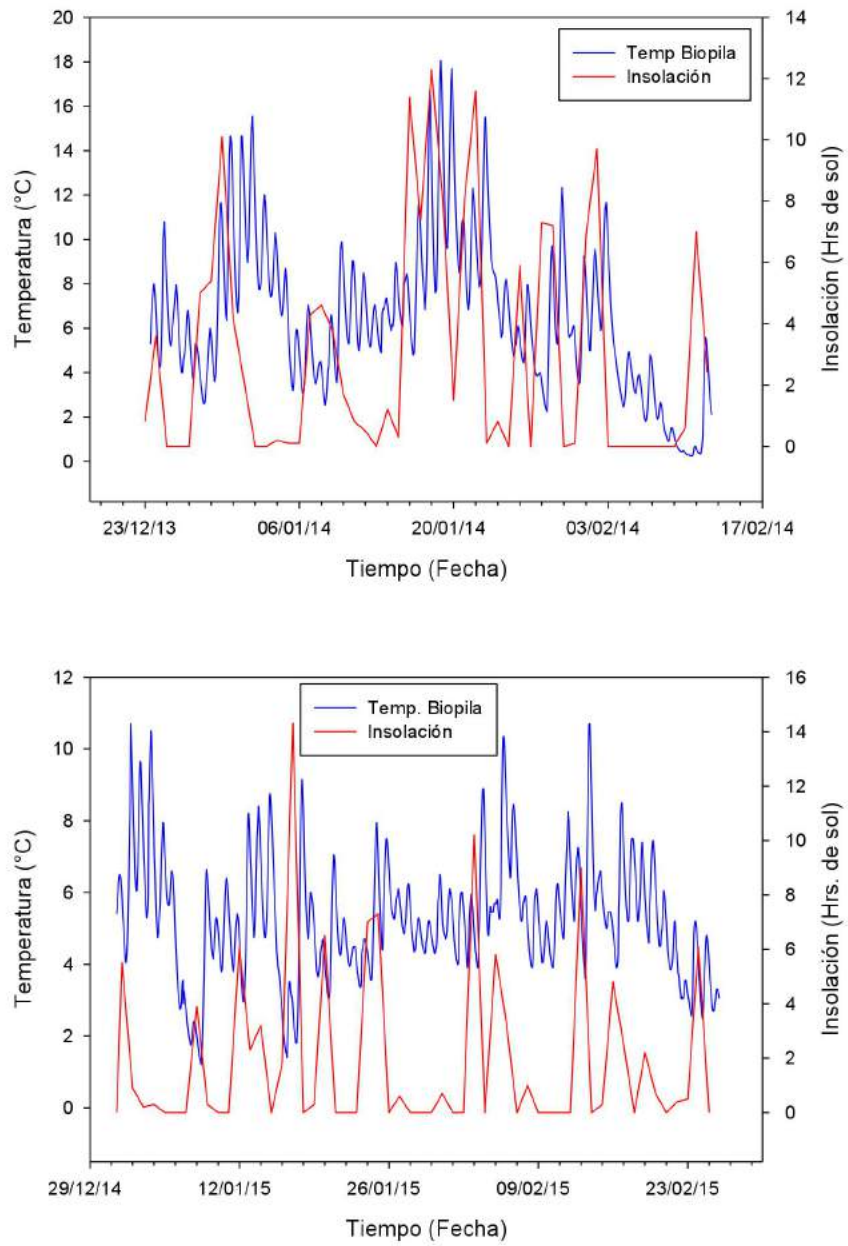
Adicionalmente, es importante remarcar que la amplitud térmica registrada durante el segundo año fue considerablemente menor tanto para el suelo cubierto como descubierto, en comparación con el primer año (Figura 5.5). Este hecho es a su vez evidenciado por los valores de desviación estándar calculados para la temperatura (Tabla 5.1), sustancialmente mayores para el primer año. La desviación estándar puede ser considerada un indicador indirecto del rango y amplitud de temperaturas alcanzadas en cada caso. En el mismo sentido, las diferencias registradas entre las biopilas y el suelo descubierto para el primer año alcanzaron los -7°C, mientras ascendió a solo -3°C durante el segundo año experimental (Figura 5.8).

Los dos cálculos de “grados-día de derretimiento” (“grados-día” o “grados-hora”) indicaron que los grados acumulados para las biopilas a lo largo del ensayo fueron significativamente mayores que para el suelo descubierto, en ambos años (Tabla 5.1). Sin embargo, la diferencia entre esos grados para el primer año (68,8°C acumulados más en la biopila que en el suelo descubierto) fue considerablemente mayor que para el segundo año (37,1°C acumulados de diferencia, casi la mitad). Esta diferencia a favor del primer ensayo respecto de los “grados-hora” puede explicar parcialmente la mayor remoción obtenida en el mismo.

Adicionalmente, las horas de sol total registradas también resultaron marcadamente mayores para el primer año, alcanzando un total de 157 horas contra las 108 horas registradas durante el segundo año, incluso a pesar de que contó con 10 días más de tratamiento. Estos valores indican que el primer año el suelo recibió un 45,37% más de horas de sol que el segundo. En el mismo sentido, la Figura 5.9 sugiere una correlación entre los registros de días con altas horas de insolación y un aumento retrasado de temperatura en el suelo contenido en las biopilas.

Todos estos cálculos refuerzan la hipótesis de que las temperaturas alcanzadas durante el experimento del primer año fueron mayores, influyendo positivamente sobre la mayor eficiencia de remoción obtenida.





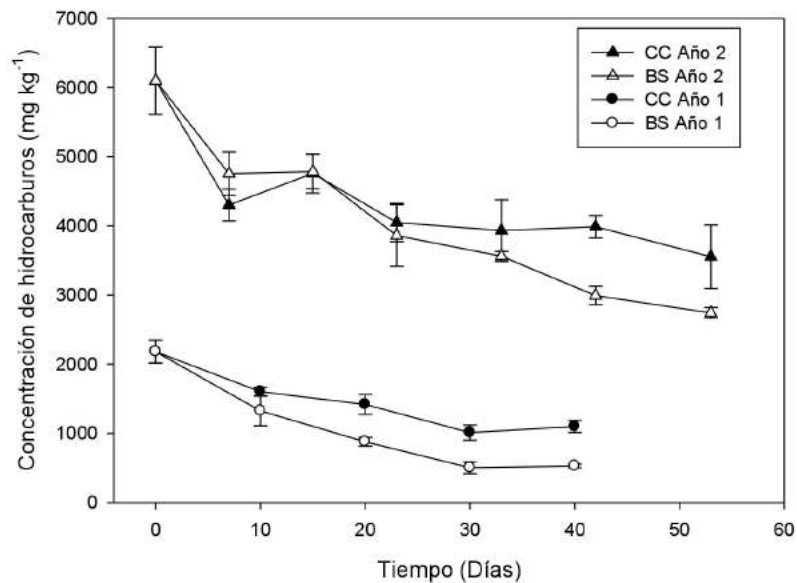
**Figura 5.9.** Temperatura de la biopilas y cantidad de horas de sol por día, a lo largo de los experimentos realizados durante las campañas antárticas 2013/2014 (biopilas I, gráfico superior) y 2014/2015 (biopilas II, gráfico inferior).

**Tabla 5.1.** Características fisicoquímicas del suelo y variables ambientales registradas y calculadas en las biopilas realizadas durante las campañas antárticas 2013/2014 y 2014/2015.

	Biopilas 1er año (2013/2014)			Biopilas 2do año (2014/2015)		
	CC	BS	Suelo descubierto	CC	BS	Suelo descubierto
Temperatura media (°C)	6,7	6,5	5,2	5,1	5,4	4,9
Diferencia media (ANOVA, p<0,001)	1,3			0,3		
Rango (°C)	17,3		20,3	10		10,5
Amplitud térmica (°C)	0,3 - 18,1		0,0 - 20,3	1,1 - 11,8		0,8 - 12,4
Desvío estándar de los registros de temperatura (°C)	3,6	3,4	3,9	1,73	1,67	2,13
Porcentaje de registros <0°C (Biopila-suelo)	11,80%			23,23%		
Conductividad (dS/m)	0,09	0,42	0	0,07	1,88	0,01
Humedad (%VWC)	22,2	21,4	-	27,1	28,5	7,8
Porcentaje de registros >4,7°C	69,53%		49,21%	63,84%		49,15%
Horas de sol totales (Hrs)	157			108		
Promedio de horas de sol por día (Hrs por día)	3,02			1,89		
Temperatura media del aire (°C)	0,64			1,9		
Grados-hora de derretimiento	340,2	331,4	266,3	284,1	284,6	279
Grados-día de derretimiento	345,6	336,4	272,2	261,1	276,9	232,1
Diferencia (Grados-hora)	68,8			37,1		
Porcentaje de remoción (%)	49,54	75,79	-	41,73	55,04	-

### 5.3.3.3. Degradación de hidrocarburos

Cuando se compararon las eficiencias de remoción entre ambos ensayos (Figura 5.10), la biopila bioestimulada del 1er año (BS-I) evidenció mayor eficiencia que la del año siguiente (BS-II). Desde un valor inicial de 2180 mg kg<sup>-1</sup>, BS-I alcanzó un porcentaje de remoción de hidrocarburos cercano al 76%, en contraste con solo el 55% alcanzado por BS-II, partiendo de una concentración inicial de 6098 mg kg<sup>-1</sup> de gasoil. Respecto a los sistemas control, ambos años evidenciaron un nivel similar de atenuación natural, elevándose hasta el 50% en CC-I y a 42% en CC-II. Cabe destacar que estos valores mencionados de remoción se alcanzaron en solo 40 días para CC-I. Por el contrario, aunque el ensayo a campo se extendió por 50 días en las biopilas II, los valores de remoción alcanzados en CC-II fueron menores.



**Figura 5.10.** Concentración de hidrocarburos totales a lo largo del tiempo para ambos sistemas de las biopilas del primer año (BS-I y CCI) y del segundo año (BS-II y CC-II).

### 5.3.4. Análisis de variables influyentes

#### 5.3.4.1. Variables ambientales

En la Figura 5.11 se presenta la matriz de correlación (función *pairs* en R) para todas las variables ambientales incluidas en el análisis. Este primer paso exploratorio contribuyó a la identificación de comportamientos definidos (lineales, polinómicos, inversos, etc.) entre dos

variables de manera de i) poder predecir cómo se comportaran las variables en función de las otras; ii) identificar y seleccionar factores que impacten significativamente sobre otros factores o sobre la respuesta obtenida; y iii) excluir aquellas que presentan una fuerte correlación entre sí de futuros análisis en pos de evitar el sesgo que puedan llegar a tener en los cálculos estadísticos. En dicha matriz de correlación se puede observar cierta interacción entre las variables de índole biológica entre sí (FDA, recuentos totales y recuentos de bacterias degradadoras), además de correlaciones entre sí de variables abióticas como las temperaturas del suelo, la biopila y la insolación. De esta manera, se observa que estas variables están ligadas, y que la modificación en el comportamiento de una de ellas muy probablemente afecte a las otras.

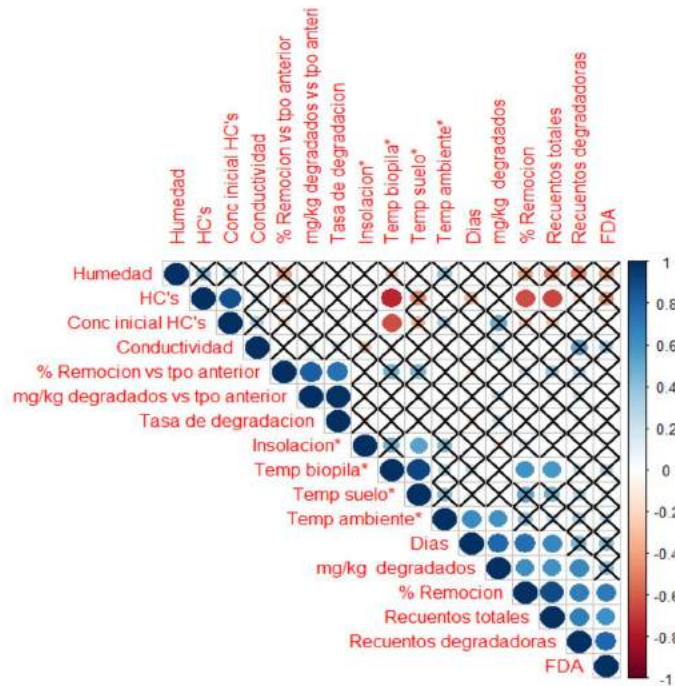
Por otra parte, incluyendo los datos mencionados en la Sección 4.2.5 y graficar las correlaciones entre las variables para los distintos grados de significancia (función *rcorr*), se pueden identificar aquellas variables que tienen un efecto significativo (ya sea positivo o negativo) sobre la eficiencia de remoción. En ese sentido, y considerando un nivel de significancia de 99,9%, se puede observar que estadísticamente las variables que mayor efecto positivo tienen sobre la degradación de hidrocarburos son: i) recuentos totales; ii) recuentos de bacterias degradadoras y iii) FDA (Figura 5.12). Estas tres variables son a su vez, claros indicadores del componente biológico de la remediación, sugiriendo que las diferencias obtenidas en las eficiencias de remoción a lo largo de ambos años se encuentra gobernada por los niveles de actividad biológica alcanzados en los experimentos.

Las temperaturas registradas dentro de las biopilas también tienen un efecto positivo sobre la degradación, aunque menor a la descrita para los recuentos bacterianos y el FDA (Figura 5.12). Sin embargo, cuando el nivel de significancia se reduce a  $\alpha < 0,05$  o  $\alpha < 0,1$  (Figuras 5.13 y 5.14), también la temperatura ambiente (Figuras 5.6 y 5.7) y la temperatura del suelo cobran preponderancia estadística sobre el porcentaje de remoción, indicando cierto efecto positivo de las mismas. Adicionalmente, las temperaturas de las biopilas tienen un efecto positivo directo sobre los recuentos totales, evidenciando el vínculo presente entre los componentes biológicos y físicos cuando se analizan esquemas de biorremediación a campo. Dichas temperaturas, en conjunción con la insolación (la cual presenta a su vez correlación con ellas) representan el aspecto físico de la biorremediación, y los resultados aquí obtenidos demuestran que la eficiencia de los tratamientos también se encuentra parcialmente afectada por dichas características físicas.

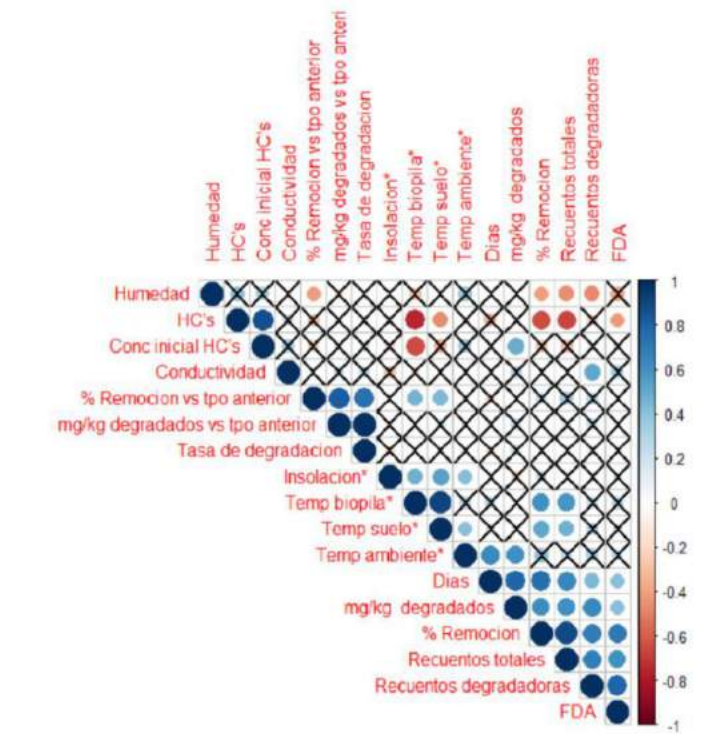


Figura 5.11. Matriz de correlación de todas las variables evaluadas.

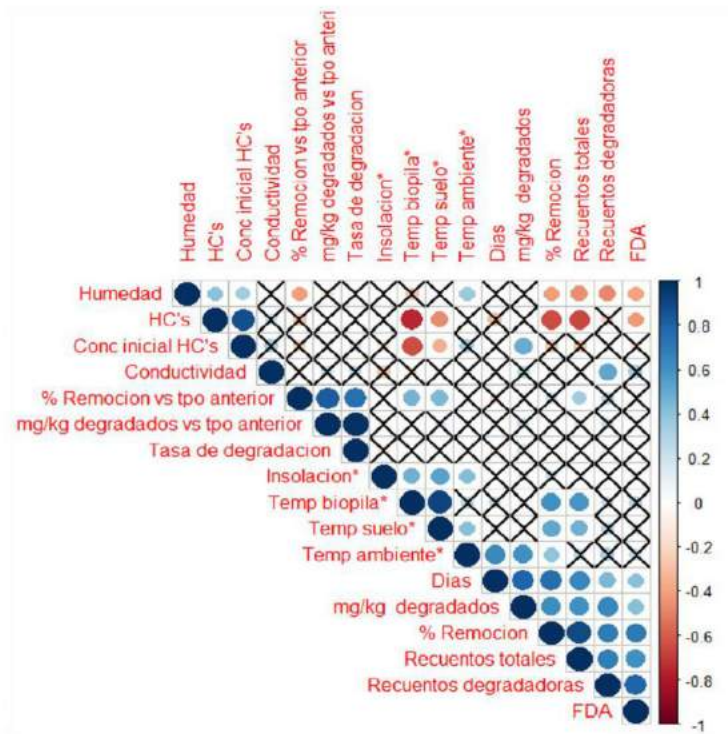
Por último, se puede observar una leve correlación entre la conductividad y los recuentos de bacterias degradadoras (Figura 5.13,  $\alpha < 0,05$ ). La conductividad puede ser visualizada como la presencia de iones en el suelo, y dado que la bioestimulación implica la adición de nutrientes en forma iónica, constituye un resultado de la bioestimulación. Esta correlación por lo tanto, sugeriría que la bioestimulación realizada genera un efecto directo positivo sobre la flora microbiana con capacidad degradadora, favoreciendo por ende la remoción del contaminante.



**Figura 5.12.** Correlación a un nivel de significación  $\alpha = 0,01$ , entre las variables ambientales estudiadas en las biopilas 2013/2014 y 2014/2015.



**Figura 5.13.** Correlación, a un nivel de significación  $\alpha = 0,05$ , entre las variables ambientales estudiadas en las biopilas 2013/2014 y 2014/2015.



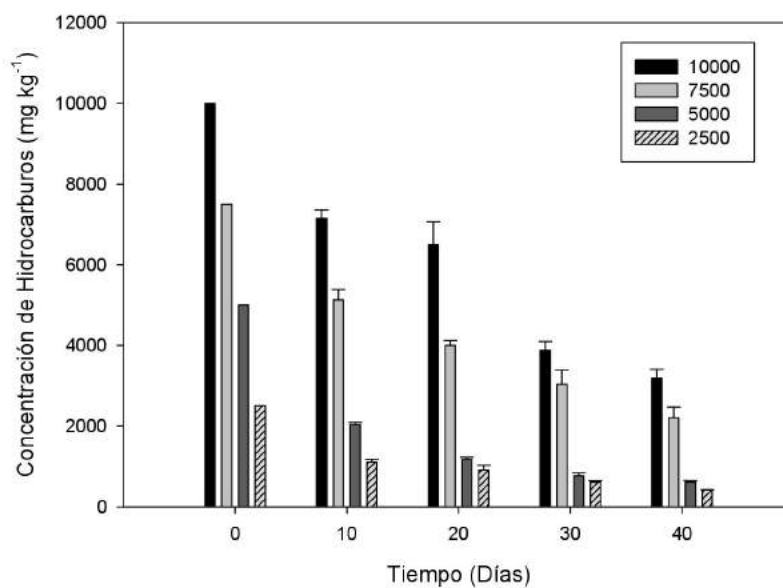
**Figura 5.14.** Correlación, a un nivel de significación  $\alpha = 0,1$ , entre las variables ambientales estudiadas en las biopilas de las CAVs 2013/2014 y 2014/2015.

#### 5.3.4.2. Concentración inicial del contaminante

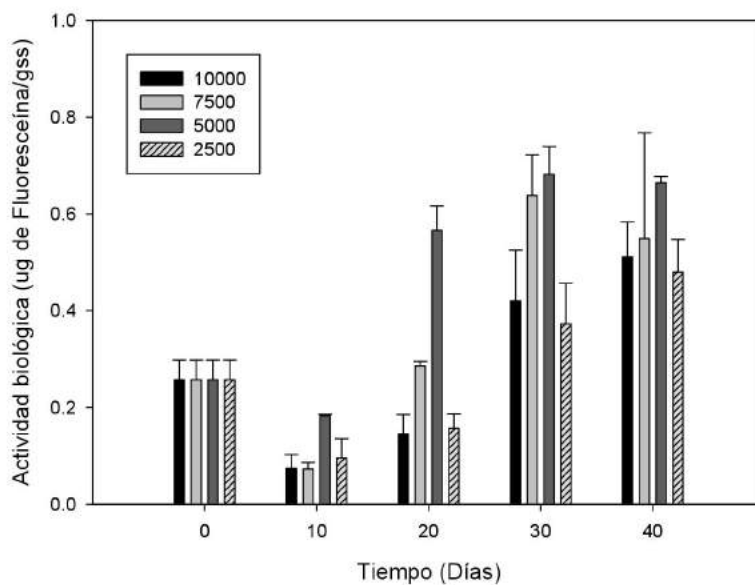
Al analizar el efecto que la concentración inicial del contaminante tuvo sobre la eficiencia de la bioestimulación en los ensayos a mesoescala, se observaron diferencias significativas entre los sistemas que partían de contenidos iniciales de contaminante diferentes (Figura 5.15). El sistema que mayor eficiencia de remoción presentó fue el que se inició con una concentración de 5.000 mg kg<sup>-1</sup> de gasoil, que alcanzó una remoción del 87,84%. Por otro lado, los sistemas con concentraciones iniciales de hidrocarburos de 2.500, 7.500 y 10.000 mg kg<sup>-1</sup> presentaron una remoción final del 83,29; 70,53 y 68,17% respectivamente (Tabla 5.2), sugiriendo que la concentración inicial de contaminante de la cual parte el esquema de biorremediación afecta la eficiencia de la relación C:N:P optimizada.

La actividad biológica, reflejada tanto por el análisis de FDA como por los recuentos de bacterias degradadoras, siguió un patrón similar al de la remoción de hidrocarburos, evidenciando una fuerte correlación entre ambas variables (Figura 5.16). La actividad biológica inferida por el método de FDA exhibió valores máximos en el sistema de 5.000 mg kg<sup>-1</sup> (0,6817 µg Fluoresceína/g suelo seco) a los 30 días de iniciado el experimento. Además, a lo largo de todo el tratamiento, los valores en este sistema fueron mayores que los exhibidos por el resto de los mismos. Por otro lado, el recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos también mostró su valor máximo en el sistema de 5.000 mg kg<sup>-1</sup>; llegando a valores de 2,79 x 10<sup>7</sup> UFC/ml, en este caso a los 20 días de tratamiento. Esta diferencia en las características biológicas entre los sistemas sugiere que la mayor remoción alcanzada en el sistema que tenía una concentración inicial de 5.000 mg kg<sup>-1</sup> se explica desde un mejor desempeño biológico en ese sistema.





**Figura 5.15.** Concentración de hidrocarburos a lo largo del ensayo para los mesocosmos con diferentes concentraciones iniciales de hidrocarburos.



**Figura 5.16.** Actividad biológica a lo largo del ensayo para los mesocosmos con diferentes concentraciones iniciales de hidrocarburos.

**Tabla 5.2.** Eficiencia final de remoción para los sistemas con diferentes concentraciones iniciales de hidrocarburos.

Concentración inicial (mg kg <sup>-1</sup> )	Concentración final (mg kg <sup>-1</sup> )	SD	Remoción (%)
2.500	417,8	4,8	83,29
5.000	608,1	37,8	87,84
7.500	2210,5	259,4	70,53
10.000	3182,6	226,7	68,17

#### 5.4. Discusión

La información referente a la eficiencia de procesos de biorremediación a campo es escasa en el ámbito científico, y prácticamente no hay información respecto a la comparación de eficiencias entre réplicas de ensayos. En los Capítulos 3 y 4, se demostró que la pre-optimización de la relación C:N:P resulta una estrategia exitosa para descontaminar suelos antárticos, tanto a escala laboratorio como en condiciones operativas reales a campo. En el presente capítulo, el objetivo se centró en la comparación de los resultados obtenidos para dos procesos de biorremediación a campo utilizando biopilas, de manera de evaluar la robustez y reproducibilidad del tratamiento aplicado, y analizar los factores que pueden influir sobre la eficiencia final de la estrategia de bioestimulación implementada.

Los resultados obtenidos en este capítulo indican que BS-I fue el sistema con mayor nivel de remoción, alcanzando valores mayores al 75% en un tratamiento de un solo paso de 40 días de duración. En contraste, BS-II solamente alcanzó un 55% de degradación de hidrocarburos en 50 días de ensayo. La atenuación natural, representada por ambos sistemas CC, fue considerablemente menor a los correspondientes sistemas BS en ambos años. Aunque la eficiencia final de los sistemas en biopilas fue diferente para cada año, esta diferencia no sería atribuible a las características de la bioestimulación realizada, ya que en ambos años se aplicó la misma C:N:P obtenida a partir de la optimización previa. Tanto el conteo de bacterias totales como de bacterias degradadoras alcanzaron valores similares ambos años, asegurando que la flora microbiana de los suelos tratados alcanzó niveles que permitían un apropiado desarrollo de la biorremediación. Este hecho se encuentra a su vez respaldado por los valores de FDA obtenidos, en los que la adición de N demostró ser crucial para el desarrollo de la actividad enzimática, obteniéndose valores significativamente mayores, en contraposición a los sistemas control, en los cuales no se registró ningún incremento (Figura 5.3). En cualquier caso, estos eventos, sumados a la correlación encontrada entre los recuentos bacterianos y el grado de remoción, sugieren que la diferencia en la degradación de hidrocarburos entre los sistemas BS y

CC yace predominantemente en el incremento de actividad biológica de la comunidad microbiana ocasionado por la bioestimulación con sales inorgánicas en estos suelos contaminados. Cabe mencionar a su vez, que más allá de que el porcentaje de remoción del segundo año es menor, la cantidad de hidrocarburos removida (como  $\text{mg kg}^{-1}$ ) fue mayor en dicho sistema. En BS-II se removieron más de  $3.000 \text{ mg kg}^{-1}$  de gasoil, contra sólo  $700 \text{ mg kg}^{-1}$  en BS-I. Sin embargo, la utilización del porcentaje de remoción es indiscutiblemente la forma en la que la eficiencia de remoción en procesos de biorremediación es expresada por la comunidad científica, y por ende, es la manera en la cual se analizan y discuten los resultados presentados en este capítulo. De esta forma, los resultados no son sólo comparables entre los ensayos incluidos en esta tesis doctoral, sino también con todos los ensayos de biorremediación disponibles en la literatura.

En cuanto a la reproducibilidad de la bioestimulación, y a partir de las diferencias encontradas en la eficiencia de remoción entre los ensayos realizados en ambos años, cabe preguntarse ¿Cuáles son los factores o variables que pueden afectar la eficiencia de los sistemas bioestimulados en estos ensayos a campo? Los esquemas de bioestimulación aquí descritos fueron realizados de acuerdo a la optimización previa a escala laboratorio. La relación óptima de 100:17,6:1,73 puede ser, sin embargo, no lineal a lo largo de concentraciones de C distintas (o dicho de otra forma, a distintos niveles de contaminación), y por lo tanto, resultar menos eficiente para mayores niveles de contaminación de suelos como los presentes en las biopilas del segundo año. Muchos autores han alcanzado diferentes eficiencias de remoción para suelos con distintos niveles de contaminación (Delille y col., 2008; Beskoski y col., 2011; Kim y col., 2018), pero pocos análisis se han hecho acerca del efecto de ese nivel de contaminación sobre dicha eficiencia. Este trabajo mostró claramente que la eficiencia de remoción de hidrocarburos, al cabo de 40 días de tratamiento, se vio afectada por la concentración inicial del contaminante.

La razón por la cual los sistemas con menor concentración de gasoil fueron los que mayor eficiencia de remoción presentaron puede deberse a varios factores. Por un lado, la optimización previa realizada a escala laboratorio para la bioestimulación de estos suelos, fue realizada con un suelo con baja concentración de hidrocarburos ( $1.200 \text{ mg kg}^{-1}$  aproximadamente). Estos resultados podrían indicar que la optimización realizada para una determinada concentración, puede tener un rango operativo limitado; y cuando los niveles difieren significativamente de aquel que se usó originalmente, la eficiencia disminuye. En tal caso, se debería realizar un nuevo proceso de optimización, explorando el ámbito de concentraciones de contaminante que sea relevante.

Por otro lado, al usar la relación entre C:N:P dicha optimización se realiza independizándose de la concentración inicial de C, ya que siempre se mantiene una relación fija entre estos compuestos. Sin embargo, el efecto que el nivel inicial de C tiene sobre la

microbiota es muy diverso. Concentraciones muy bajas de compuestos carbonados pueden generar una inhibición del crecimiento microbiano simplemente debido a la falta de sustrato biodisponible. Por el contrario, niveles muy elevados de hidrocarburos puede presentar un efecto tóxico sobre una gran parte de la comunidad microbiana, originando una disminución en la población capaz de degradar el xenobiótico o, al menos, un retardo en su metabolismo tanto en aguas y sedimentos (Joye y col., 2016) como en suelos (Leahy y Colwell., 1990; van Dorst y col., 2014; Wolinska y col., 2016). Esto último es lo que parece desprenderse de los resultados obtenidos en el ensayo de mesocosmos. Si bien la eficiencia de remoción se ve disminuida para los sistemas con niveles más altos de GOA, estos valores parecen verse más afectados por un retraso en el inicio de la actividad degradadora, que por un descenso tangible de su actividad metabólica, ya que los indicadores de dicha actividad fueron en aumento hasta el final del ensayo. Es probable que estos sistemas necesiten mayor cantidad de días de tratamiento para alcanzar los mismos niveles de actividad biológica que aquellos con menores concentraciones de contaminantes. De ser así, los resultados indicarían que la concentración inicial de GOA en suelo puede influir en el tiempo de tratamiento necesario para su biorremediación, siendo niveles altos de contaminante una variable clave que alargaría los procesos de remediación de estos suelos.

Más allá del efecto que las propiedades biológicas puedan tener sobre el suelo, difícilmente sean las únicas variables que afecten la eficiencia del tratamiento. Como se desprende de los resultados obtenidos en el análisis estadístico de las variables ambientales, estas también estarían jugando un papel importante en la efectividad del esquema de biorremediación a campo. En este sentido, de acuerdo a nuestros resultados, la temperatura ambiente (en menor medida) y las temperaturas alcanzadas en el suelo descubierto y dentro de la biopila tienen un efecto tangible sobre la remoción. Dichas temperaturas estarían, a su vez, afectadas por la cantidad de horas de sol (insolación), la cual fue considerablemente mayor durante el ensayo del primer año. Como ya se mencionó en el Capítulo 4, el material de color negro del cual están formadas las geomembranas utilizadas favorecen la absorción de radiación solar, posiblemente generando comparativamente un incremento mayor de la temperatura en las biopilas. Este efecto explicaría que un año con mayor insolación presente a su vez mayores valores de temperatura promedio dentro de la biopila, favoreciendo a su vez una mayor actividad biológica. Además, se pudo observar una clara correlación entre los días con altas cantidades de hora de sol, y un aumento retardado de la temperatura del suelo dentro de la biopila (Figura 5.9), sugiriendo que la insolación puede generar no sólo un efecto agudo sobre la temperatura de la biopila, sino un cierto efecto retardado, aumentando la temperatura promedio de este suelo. Esto implicaría que, por ejemplo, la acumulación de días soleados, o incluso períodos de días de sol con intermitencias cortas de días nublados, puedan generar un aumento considerable de la

temperatura del suelo tratado, y por ende, una mayor remoción de los contaminantes. Además, el resultado del cálculo de los “grados-día” o “grados-hora” para ambos experimentos resalta el papel preponderante que la temperatura podría tener sobre la remoción. Estos valores fueron marcadamente mayores para el primer año (335°C acumulados para las biopilas I, versus 284°C para las biopilas II) generando que la diferencia entre biopilas y suelo descubierto sea prácticamente el doble para el ensayo del primer año (68,8°C acumulados, versus 37,1°C en II). Cabe destacar que pese a que el uso más frecuentemente utilizado en el ámbito de la geología es el que calcula los “grados-día”, en el trabajo realizado en esta tesis resulta más apropiado el uso de “grados-hora”. Como se mencionó previamente, esto se justifica en el hecho de que la utilización del concepto en geología se encuentra vinculado usualmente a movimientos y estadíos del permafrost, pero evaluándose en años o incluso decenas de años. En ese sentido, un valor diario de temperatura promedio resulta suficientemente preciso para la finalidad del estudio. En el trabajo actual sin embargo, en el cual solo se analiza un periodo de tiempo de meses, y ya que se dispone de medidas horarias de la temperatura en suelo, resulta indispensable y mucho más informativo adaptar el concepto diario a algo horario, permitiendo de esa forma calcular los grados acumulados por hora, dando lugar a los “grados-hora”.

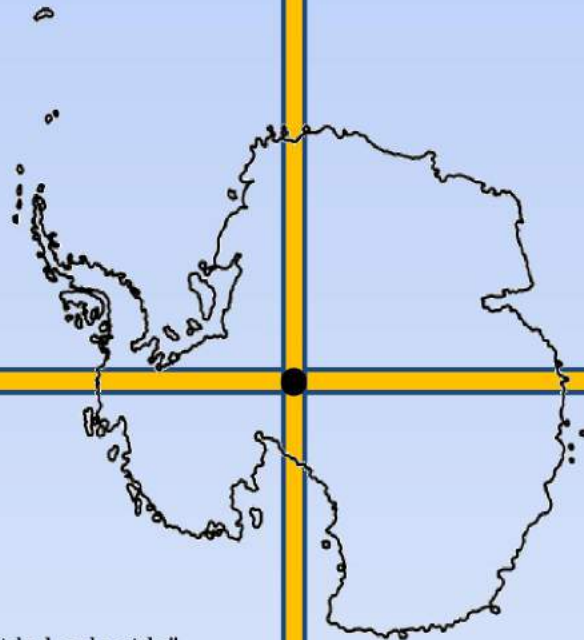
En el capítulo anterior, se hipotetizó que la amplitud térmica dentro de las biopilas (en comparación con las incubaciones isotérmicas realizadas en escala laboratorio) puede favorecer diferentes “nichos térmicos”, y por lo tanto, favorecer la biodegradación de distintas fracciones o componentes del contaminante a diferentes temperaturas, mediante la acción de distintos géneros bacterianos. En ese sentido, la mayor remoción alcanzada en las biopilas del primer año puede ser parcialmente atribuible a la mayor amplitud térmica registrada ese año. Tanto el rango de temperatura como la amplitud resultaron considerablemente más amplios para el año I, hecho reafirmado por la desviación estándar de las temperaturas calculado para cada año. Si se considera que el desvío estándar representa la varianza presente en los datos, se puede concluir que el desvío estándar de la temperatura de las biopilas del primer año indica que un mayor número de esos “nichos térmicos” fueron alcanzados, favoreciendo una mayor biodegradación.

### **5.5. Conclusión**

La realización de un segundo estudio a campo utilizando biopilas como sistemas experimentales para el tratamiento de suelos antárticos contaminados con hidrocarburos, y la combinación de esos resultados con los obtenidos de estudios en mesocosmos tendientes a investigar la influencia de algunos factores ambientales claves, permite concluir que los sistemas

poseen respuestas que parecen ser reproducibles y otras que difieren de proceso en proceso y parecen requerir una optimización caso por caso. Resultó evidente que ante la bioestimulación con N y P existe una respuesta general y reproducible de la microbiota natural, la cual incrementa muy significativamente los recuentos tanto de BHAT como de BDH. Dicho incremento se acompaña de un aumento de la actividad biológica y una eliminación de los contaminantes que resulta significativamente mayor que en los sistemas controles. Sin embargo, los niveles de eficiencia de los procesos mostraron ser fuertemente dependientes del nivel inicial de hidrocarburos, sugiriendo que debe optimizarse la bioestimulación para suelos con rangos muy diferentes de hidrocarburos. Por otro lado, la disposición de la biopila en una geomembrana de alta densidad tiene un efecto amortiguador de las oscilaciones térmicas que parece favorecer el proceso. Sin embargo, es importante tener en cuenta que este efecto depende, a su vez, de los niveles de radiación solar y los tiempos de insolación. Es evidente que dichos niveles de insolación y radiación, si bien pueden estimarse a partir datos meteorológicos históricos de la zona a tratar, no son predecibles, de manera que es importante considerar que la duración/eficiencia de un proceso de biorremediación de las características acá establecidas, puede requerir tiempos diferentes de acuerdo a las condiciones climáticas particulares del periodo de tratamiento. Esta información es particularmente importante para un sitio como la Antártida, donde la posibilidad de tratamiento efectivo se reduce a unos pocos meses del periodo estival. Si bien son necesarios estudios adicionales para comprender más profundamente la interacción de estos factores ambientales, este estudio representa un aporte original y novedoso al conocimiento, aún muy escaso, de los procesos de biorremediación de combustibles en suelos antárticos.

## **6. Diversidad microbiana en suelos antárticos contaminados con gasoil**



“La uniformidad es la muerte. La diversidad es la vida”

*Mijaíl Bakunin*

## **6.1. Parte I: Aislamiento y caracterización de cepas microbianas siccófilas degradadoras de hidrocarburos**

### **6.1.1. Introducción**

El suelo antártico contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo ofrece una combinación de factores poco frecuente que lo convierte en una fuente interesante de microorganismos adaptados al estrés. Por un lado, dada su inaccesibilidad y la escasez de estudios previos los ecosistemas antárticos continúan proveyendo la oportunidad de encontrar microorganismos previamente no descritos (Selbmann y col., 2014; Huang y col., 2017; Li y col., 2017; Pantucek y col., 2017; Pikuta y col., 2017). Por otro lado, las bajas temperaturas a las cuales se encuentran permanentemente expuestos estos microorganismos conlleva el desarrollo de estrategias de supervivencia y crecimiento en esas condiciones que pueden resultar de interés en variadas áreas de la biotecnología. La contaminación con hidrocarburos representa un desafío adicional para estos microorganismos, ya que las expone a compuestos potencialmente tóxicos, pero que puede ser a su vez fuente de carbono y energía. Todos estos factores resultan en mecanismos de adaptación que pueden ser potencialmente aprovechados en aplicaciones biotecnológicas. Dentro de dichas aplicaciones se encuentra la inoculación con microorganismos, estrategia de biorremediación conocida como bioaumentación. Esta estrategia ha sido frecuentemente fuente de controversia y muchos estudios a lo largo de los años han analizado su eficiencia con resultados disímiles (Forsyth y col., 1995; Gentry y col., 2004; El Fauntraoussi y Agathos, 2005; Mrozik y Piotrowska-Seget Z, 2010; Saeed-Safdari y col., 2018).

En muchos de los casos, el éxito de la inoculación parece ser aleatorio y muy dependiente de cada escenario y cada condición. Frecuentemente, las cepas inoculadas no pudieron ser detectadas luego de un cierto tiempo por métodos dependientes de cultivo (Goldstein y col., 1985), y en algunos casos ni siquiera por métodos moleculares independientes de cultivo (Bouchez y col., 2000a; Bouchez y col., 2000b). Esto ha sugerido que los inóculos no siempre logran establecerse en la matriz a tratar. Si bien el éxito de establecerse puede depender de la presencia en los suelos de una flora microbiana bien adaptada al contaminante (suelo crónicamente contaminado) o no (suelos agudamente contaminados), hay una clara competencia por el nicho ecológico que los inóculos generados en el ámbito del laboratorio parecen muchas veces no poder superar y que impide su establecimiento. En este sentido, en los suelos antárticos bajo estudio, la utilización del bioaumentación como estrategia de primera elección, no mejoró significativamente la eficiencia del proceso en comparación con aquella obtenida en sistemas donde sólo se aplicó bioestimulación (Ruberto y col., 2003; Ruberto y col., 2006; Ruberto y col., 2008; Ruberto y col., 2009). Si bien estos estudios previos han mostrado



claramente que la primera acción de elección para biorremediar un suelo antártico crónicamente contaminado con hidrocarburos es la bioestimulación, tanto la existencia de una fracción recalcitrante luego de la bioestimulación de dichos suelos, como la ocurrencia de un evento agudo de contaminación sobre un suelo prístino, representan situaciones para las cuales la utilización del bioaumentado aun se tiene como una alternativa a investigar en pos de lograr procesos de biorremediación más eficientes.

En pos de evaluar la aplicabilidad del bioaumentado es imprescindible conocer, al menos en parte, la composición y dinámica de la comunidad de microorganismos en el suelo a tratar. En el caso de los suelos antárticos que son el foco de este trabajo de tesis, la obligación es aún mayor debido a que, como lo establece el Protocolo Ambiental de Madrid de 1991, no está permitida la introducción deliberada de especies foráneas al continente antártico, incluso microorganismos. Es por ello que, al evaluar el desarrollo de procesos que involucren el bioaumentado en estos suelos, deben utilizarse únicamente cepas bacterianas y fúngicas autóctonas, a las cuales se les haya estudiado sus capacidades catabólicas, y evaluado su potencial aplicabilidad en forma de inóculo. Como parte de un aprovechamiento máximo de las capacidades catabólicas de las cepas involucradas en el bioaumentado, muchas veces se busca explotar la habilidad de ciertos microorganismos para producir surfactantes (biosurfactantes), que secretados a la matriz en la cual se encuentran inmersos, aumentan la biodisponibilidad de los hidrocarburos, facilitando su degradación por la flora presente y aumentando el éxito de la biorremediación.

En esta primera parte del capítulo, se incluyen los resultados obtenidos del estudio de microorganismos degradadores de hidrocarburos a partir de suelos de Base Carlini. El estudio de estos microorganismos se realizó bajo la hipótesis que, cepas productoras de biosurfactantes o con amplia diversidad catabólica y buena cinética de crecimiento representan potenciales candidatos para la realización de una etapa complementaria de bioaumentado que podría elevar la eficiencia de remoción obtenida en una primera etapa de bioestimulación optimizada, al poner el foco en aquellos compuestos que resultaron refractarios a la actividad degradadora de los microorganismos involucrados en dicha primera etapa.

Para ello, se aislaron, purificaron e identificaron cepas microbianas habitantes de los suelos contaminados con hidrocarburos, así como también de cepas rizosféricas de *Deschampsia antarctica*, una de las dos plantas vasculares naturales del continente antártico. Esta especie vegetal se encuentra presente en suelos impactados por derivados del petróleo en ese continente, y su rizósfera proporciona un nicho ecológico alternativo en la búsqueda de microorganismos de interés biotecnológico al presentar una batería de capacidades enzimáticas diferente a los organismos del suelo libre de plantas (Teixeira y col., 2010; Peixoto y col., 2016).

## 6.1.2. Materiales y métodos

### 6.1.2.1. Obtención de las cepas

A partir de suelo contaminado con gasoil proveniente de Base Carlini, se realizaron cultivos de enriquecimiento para aislar cepas microbianas presentes. Los cultivos se realizaron en medio salino basal (MSB), con el agregado de gasoil antártico (1%) como única fuente de carbono y energía. Luego de una incubación inicial de 15 días a 15°C y 250 rpm de agitación, se tomaron muestras que se sembraron en el mismo medio agarizado (15 g l<sup>-1</sup> de agar agar), incubándose durante 10 días más a 15°C. Las colonias desarrolladas que mostraron morfologías diferenciales se repicaron y subcultivaron hasta obtener a cada una de ellas como cultivo puro (confirmado por tinción de Gram).

Por otro lado, a partir de la rizósfera de *Deschampsia antarctica* se aislaron cepas microbianas siguiendo el mismo procedimiento. Para realizar los cultivos de enriquecimiento, 3 plantas originarias de Base Carlini fueron removidas de la misma zona contaminada durante la campaña 2013/2014, almacenadas y transportadas al continente a 4°C. Una vez en el laboratorio, fueron desplantadas, se seccionaron las raíces con su rizósfera y se cultivaron en el mismo medio líquido mencionado previamente. Posteriormente, se sembraron 100 µl del cultivo en un medio agarizado. Luego de 15 días a 15°C, se seleccionaron, aislaron y purificaron las cepas que presentaban morfotipos distintivos.

### 6.1.2.2. Extracción de ADN, amplificación por PCR e identificación

A partir de las cepas puras obtenidas del suelo contaminado y de la rizósfera de *D. antártica* se extrajo el ADN genómico total utilizando un kit comercial apropiado (Mobio Power Soil) y se realizó una amplificación por PCR de la región V<sub>3</sub>-V<sub>4</sub> del gen del rARN 16S para bacterias y del ITS (Internal Transcribed Spacer, Lott y col., 1993) utilizando los primers ITS-4 e ITS-5; así como de la región D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub> a través de los primers NL-1 y NL-4, en ambos casos para hongos (subunidades 26S, Kurtzman y Robnett, 1997). Las secuencias resultantes de la amplificación contenían alrededor de 1500 pb para bacterias, y 600 pb para el ITS y el NL. Los productos de la amplificación por PCR fueron purificados utilizando el kit Wizard® (Promega), y secuenciados en la unidad genómica del Instituto de Biotecnología CNIA-INTA, utilizando un secuenciador capilar automático modelo ABI3130XL (Applied Biosystems, EEUU). El Clasificador Bayesiano

Ingenuo (Wang y col., 2007) derivado del RDP Release 10 (<http://rdp.cme.msu.edu>, Cole y col., 2005) fue utilizado para asignar las secuencias obtenidas a un género bacteriano con un nivel de confianza del 95%. La aplicación Seqmatch de esa misma página de internet y la aplicación EZtaxon-2 de la plataforma EzBioCloud (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>) se usaron para hallar las secuencias más cercanas en cuanto a similitud de secuencia génica, de manera de sugerir las afiliaciones más probables de los aislamientos a nivel de especie (99,5%).

Las secuencias de los primers utilizados se incluyen en la Tabla 6.1, mientras que las condiciones de la reacción de PCR se muestran en la Tabla 6.2. La identificación, número de acceso y los porcentajes de similitud respectiva con cepas bacterianas, de levaduras y de hongos filamentosos se incluyen en la sección de resultados. Las condiciones en las cuales se realizó la amplificación se describen en la Tabla 6.3.

**Tabla 6.1.** Secuencia de los primers utilizados para la amplificación por PCR.

<b>Bacteria</b>	Secuencia del primer
27F	5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'
1492R	5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'
<b>Levaduras/Hongos</b>	
ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'
ITS5	5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'
NL1	5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3'
NL4	5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3'

**Tabla 6.2.** Composición de la mezcla de reacción para la PCR.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
ADN (2-5 ng $\mu\text{l}^{-1}$ )	2,0 $\mu\text{l}$
Buffer Taq 10x	5,0 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,0 $\mu\text{l}$
dNTP's (2,5 mM)	2,5 $\mu\text{l}$
Primer forward (50 pmol $\mu\text{l}^{-1}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
Primer reverse (50 pmol $\mu\text{l}^{-1}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
Taq polimerasa	0,2 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O miliQ	37,3 $\mu\text{l}$
Volumen final de reacción: 50 $\mu\text{l}$	

**Tabla 6.3.** Condiciones de la amplificación por PCR.

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
94°C	3 min	1
94°C	1 min	
55°C	1 min	X 35
72°C	2 min	
72°C	5 min	1

### 6.1.2.3. Selección y testeo de cepas con potencial biotecnológico

Para la búsqueda de cepas con alta capacidad de producción de biosurfactantes, se utilizó el cultivo en placas con medio CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio)/Azul de Metileno agarizado, según Siegmund y Wagner (1991) y optimizado por Tabuchi (2004). Este medio de selección permite una rápida detección visual, al formarse halos de color azul/violáceo alrededor de las colonias que produzcan y liberen surfactantes al medio, debido a la interacción y posterior precipitación entre el CTAB, el Azul de Metileno y el biosurfactante. A su vez, las cepas que produzcan biosurfactantes adheridos a la membrana celular (frecuente en el género *Rhodococcus* sp.), teñirán las colonias hacia un color azul/violáceo. El mecanismo exacto para la formación de esta coloración se desconoce. Este medio surgió como alternativa al frecuentemente utilizado Agar Sangre, que presentaba un alto número de falsos positivos.

Por otro lado, en busca de cepas microbianas que puedan potencialmente utilizarse como inóculo en el desarrollo de una estrategia de bioaumentación, se evaluaron las velocidades de crecimiento, los perfiles de crecimiento a distintas temperaturas y las capacidades metabólicas para degradar distintos compuestos derivados del petróleo de cada una de las cepas obtenidas. Se determinaron los diámetros de las colonias en medios agarizados apropiados para determinar las velocidades de crecimiento a 15°C, y los perfiles de crecimiento a distintas temperaturas. Las mediciones del diámetro de las colonias se realizaron cada 5 días, considerándose como punto de corte la obtención de 3 mediciones consecutivas con el mismo valor.

Además, se incubaron las cepas identificadas en medios de cultivo líquidos conteniendo MSB más el agregado de 1% de distintos hidrocarburos derivados del petróleo para evaluar su crecimiento y determinar sus capacidades catabólicas. Estos cultivos se incubaron durante 21 días a 15°C y 200 rpm en un agitador orbital con control de temperatura.

### 6.1.3. Resultados

#### 6.1.3.1. Identificación de las cepas aisladas

A partir de la selección de cepas con morfotipos diferentes y su posterior aislamiento, purificación e identificación, se obtuvieron 19 microorganismos provenientes de suelo antártico contaminado con GOA con la capacidad de crecer y desarrollarse en medios que presentaban dicho contaminante como única fuente de carbono y energía. A su vez, se obtuvieron 8 morfotipos más provenientes de la rizósfera de *D. antarctica*. De los microorganismos obtenidos del suelo, 6 fueron bacterias, 5 levaduras y 8 hongos filamentosos pertenecientes en su mayoría a los géneros *Cadophora* sp. y *Penicillium* sp. Por su parte, la rizósfera de *Deschampsia* permitió obtener 7 cepas bacterianas (en su mayoría pertenecientes al género *Rhodococcus* sp.) y un hongo filamentosos (Tabla 6.4).

#### 6.1.3.2. Evaluación del potencial biotecnológico

En la Tabla 6.5 se muestra, para todas las cepas identificadas, la capacidad de crecimiento en agar glucosa-peptona así como el crecimiento y producción de surfactantes en medio agar CTAB/Azul de metileno. Las cepas bacterianas con mayor capacidad de producción de surfactante resultaron las identificadas como 9 y 14, ambas asignadas al género *Pseudomonas*. Las Figuras 6.1 y 6.2 muestran la formación del halo de surfactante (color violeta) que permitió la identificación positiva como productoras de surfactante de dichas cepas. La cepa 14 fue la que mostró la mayor capacidad de crecimiento en medio CTAB/AM y produjo el mayor halo de producción de surfactante, por lo cual se decidió utilizar la misma para estudios posteriores. Por otro lado, luego de analizar los perfiles y velocidades de crecimiento se decidió también evaluar el desempeño de la cepa fúngica denominada D8, proveniente de la rizósfera de *Deschampsia*, y perteneciente al género *Penicillium (glabrum)*. Esta cepa mostró un crecimiento muy rápido, así como capacidad de inhibir el crecimiento de otros hongos cuando se los cultivó en la misma placa de medio agarizado.

Una vez elegida *Pseudomonas* sp. 14 como la cepa con mayor potencial para la producción de surfactante, se investigó si hay condiciones particulares que desencadenan la producción del surfactante, o si por el contrario se trata de una síntesis constitutiva del mismo. Con ese fin, se llevó a cabo un estudio que se resume en la Tabla 6.6 y que buscó evaluar el efecto de los

distintos componentes del medio de *screening* utilizado (CTAB/AM), así como también de la presencia de hidrocarburos sobre la obtención o no del compuesto de interés.

Los resultados indicaron que esta cepa de *Pseudomonas* no puede crecer a costa del Azul de Metileno ni del CTAB exclusivamente, descartando que en los sistemas en los que se encontró crecimiento, el mismo se deba al consumo de estos compuestos. Sin embargo, no se registró crecimiento en el sistema 7 (con CTAB/AM más la presencia de Glucosa, Tabla 6.6), pese a que en un *screening* previo esta cepa había crecido en medios con Glu como única fuente de carbono. Respecto a la producción de surfactante, todos los sistemas que incluían la presencia de hidrocarburos demostraron presencia de surfactantes al finalizar el cultivo, evidenciado por la formación de emulsiones entre las fases acuosa y orgánica. Dicha emulsión puede observarse en la Figura 6.3.

**Tabla 6.4.** Características morfológicas de las colonias y su identificación a nivel género. Entre paréntesis las especies cuya cepa tipo mostró el mayor nivel de similitud con el aislamiento.

Cepa	Características de la colonia	Género (especie sugerida)	% Similitud
1	Puntiforme translúcida	<i>Variovorax</i> sp. ( <i>ginsengisoli</i> )	99,3%
2	Blanca cremosa	<i>Glaciozyma</i> sp. ( <i>martinii</i> )	99%
3	Beige, se incrusta en el agar. Desarrolla superficie marrón oscura	<i>Chalara constricta</i> / <i>Cadophora</i> sp.	100%/99,8%
4	Blanco-amarillenta translúcida	<i>Pseudomonas</i> sp. ( <i>frederikbergensis</i> )	98,95%
5	Marrón, penetra el agar. Desarrolla filamentos	<i>Cadophora</i> sp. ( <i>fastigiata, malorum</i> )	100%
6	Puntiforme amarillenta translúcida	<i>Pseudomonas</i> sp. ( <i>frederikbergensis</i> )	99,19%
7	Blanca cremosa	<i>Glaciozyma</i> sp. ( <i>martinii</i> )	99%
8	Amarilla cremosa	<i>Sphingomonas</i> sp. ( <i>aerolata</i> )	99,35%
9	Blanca mucosa translúcida	<i>Pseudomonas</i> sp. ( <i>brenneri</i> )	99,4%
10	Hongo con desarrollo negro	<i>Cadophora</i> sp. ( <i>fastigiata, malorum</i> )	100%
11	Hongo marrón. Penetra el agar	<i>Cadophora</i> sp. ( <i>fastigiata, malorum</i> )	100%
12	Levadura. Colonia blanca cremosa.	<i>Cryptococcus</i> sp. ( <i>laurentii</i> )	99%
14	Blanca mucosa translúcida	<i>Pseudomonas</i> sp. ( <i>brenneri</i> )	99,57%
15	Naranja con centro negro. En el reverso es rosa	<i>Aspergillus</i> sp. ( <i>protuberus, versicolor</i> )	100%
16	Naranja con centro negro difuso. En el reverso es clara	<i>Aspergillus</i> sp. ( <i>protuberus, versicolor</i> )	100%
17	Amarilla-anaranjada. En el reverso anaranjada	<i>Aspergillus</i> sp. ( <i>protuberus, versicolor</i> )	100%
18	Blanca pastosa	<i>Glaciozyma</i> sp. ( <i>martinii</i> )	99%
19	Blanco amarillenta cremosa	<i>Caulobacter</i> sp. ( <i>henricii</i> )	99,13%
20	Hongo con desarrollo negro que penetra el agar	<i>Cadophora</i> sp. ( <i>malorum</i> )	100%

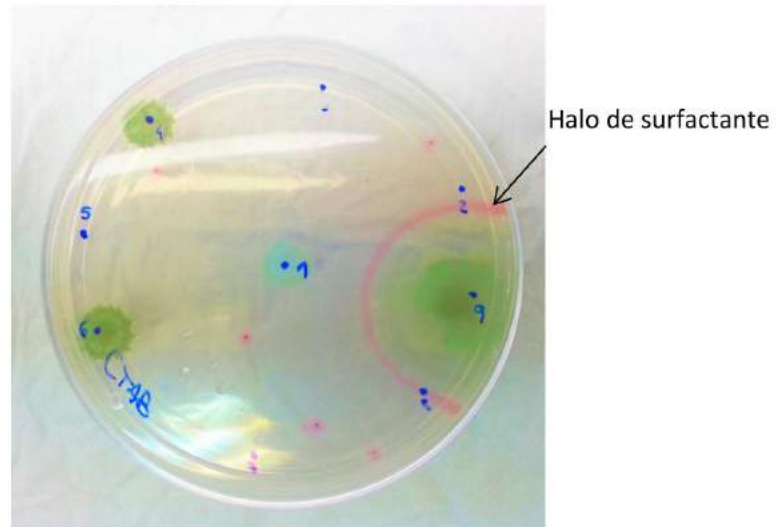
**Rizósfera de *Deschampsia antarctica***

D1	Blanca grande mucosa brillante	<i>Rhodococcus</i> sp. ( <i>erythropolis</i> )	100%
D2	Blanca grande mucosa brillante	<i>Rhodococcus</i> sp. ( <i>erythropolis</i> )	100%
D3	Blanca grande mucosa brillante. En medio con GOA crema puntiforme	<i>Rhodococcus</i> sp. ( <i>qingshengii</i> )	99,6%
D4	Blanca grande mucosa brillante	<i>Acinetobacter</i> sp. ( <i>johnsonii</i> )	99,5%
D5	Amarilla, pequeña puntiforme, brillante, bordes regulares	<i>Arthrobacter</i> sp. ( <i>psychrochitiniphilus</i> )	99,1%
D6	Blanca grande mucosa brillante	<i>Rhodococcus</i> sp. ( <i>erythropolis</i> )	99,9%
D7	Blanca grande mucosa brillante	<i>Rhodococcus</i> sp. ( <i>qingshengii</i> )	100%
D8	Hongo miceliar. En APG fondo naranja, micelio aéreo verde que esporula	<i>Penicillium</i> sp. ( <i>glabrum</i> )	100%

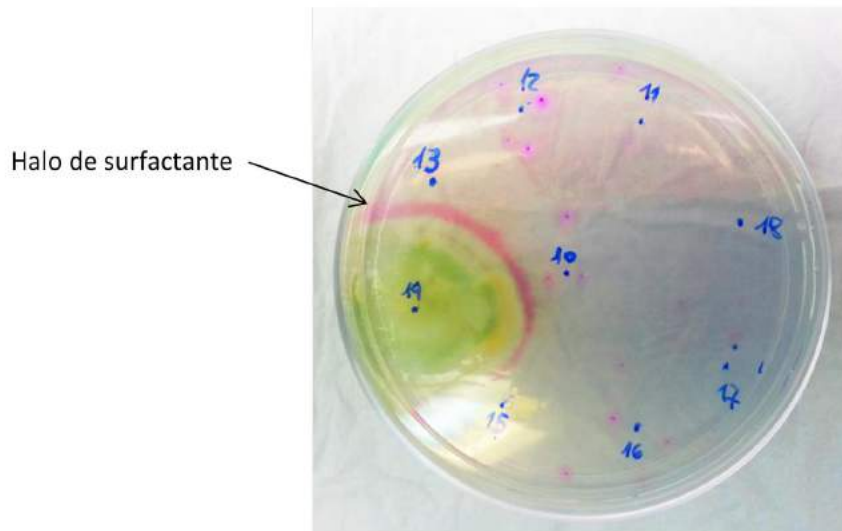
**Tabla 6.5.** Screening de la capacidad de producción de surfactante de las cepas obtenidas. (+) Presenta la característica. (-) Ausencia de la característica. (\*) Tinción de la colonia azul-violáceo. Entre paréntesis las especies cuya cepa tipo mostró el mayor nivel de similitud con el aislamiento.

Cepa	Género (especie sugerida)	Crecimiento en Glucosa + Peptona	Crecimiento en Agar CTAB/AM	Producción de surfactante
1	<i>Variovorax</i> sp. ( <i>ginsengisoli</i> )	+	+	*
2	<i>Glaciozyma</i> sp. ( <i>martinii</i> )	-	-	-
3	<i>Chalara</i> sp. ( <i>constricta</i> )/ <i>Cadophora</i> sp.	+	-	*
4	<i>Pseudomonas</i> sp. ( <i>frederikbergensis</i> )	+	+	-
5	<i>Cadophora</i> sp. ( <i>fastigiata, malorum</i> )	-	-	-
6	<i>Pseudomonas</i> sp. ( <i>frederikbergensis</i> )	+	+	-
7	<i>Glaciozyma</i> sp. ( <i>martinii</i> )	-	-	-
8	<i>Sphingomonas</i> sp. ( <i>aerolata</i> )	+	-	*
9	<i>Pseudomonas</i> sp. ( <i>brenneri</i> )	+	++	*
10	<i>Cadophora</i> sp. ( <i>fastigiata malorum</i> )	+	-	++
11	<i>Cadophora</i> sp. ( <i>fastigiata malorum</i> )	-	-	-
12	<i>Cryptococcus</i> sp. ( <i>laurentii</i> )	-	-	-
14	<i>Pseudomonas</i> sp. ( <i>brenneri</i> )	+	+++	++++
15	<i>Aspergillus</i> sp. ( <i>protuberus, versicolor</i> )	-	-	-
16	<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-
17	<i>Aspergillus</i> sp. ( <i>protuberus, versicolor</i> )	+	-	+
18	<i>Glaciozyma</i> sp. ( <i>martinii</i> )	-	-	-
19	<i>Caulobacter</i> sp. ( <i>henricii</i> )	-	-	-
20	<i>Cadophora</i> sp. ( <i>malorum</i> )	+	+	-
D1	<i>Rhodococcus</i> sp. ( <i>erythropolis</i> )	+	-	*
D2	<i>Rhodococcus</i> sp. ( <i>erythropolis</i> )	+	-	*
D3	<i>Rhodococcus</i> sp. ( <i>qingshengii</i> )	+	+ (tardío)	++
D4	<i>Acinetobacter</i> sp. ( <i>johnsonii</i> )	+	+	*
D5	<i>Arthrobacter</i> sp. ( <i>psychrochitiniphilus</i> )	-	-	-
D6	<i>Rhodococcus</i> sp. ( <i>erythropolis</i> )	-	-	-
D7	<i>Rhodococcus</i> sp. ( <i>qingshengii</i> )	-	-	-
D8	<i>Penicillium</i> sp. ( <i>glabrum</i> )	+	+	*





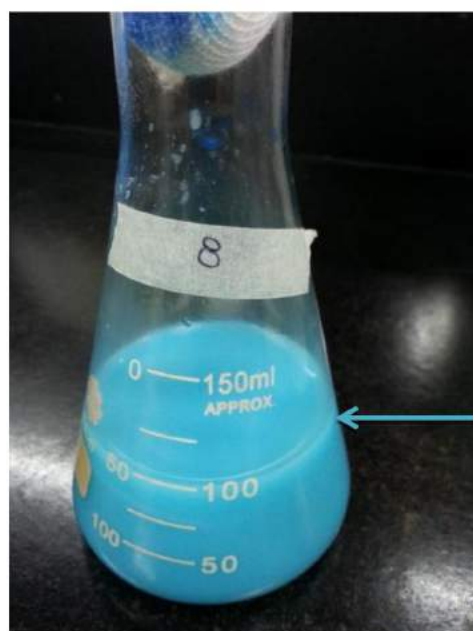
**Figura 6.1.** Halo violeta indicador de producción y liberación de biosurfactantes en la cepa seleccionada (*Pseudomonas* 9) en agar CTAB/AM.



**Figura 6.2.** Halo violeta indicador de producción y liberación de biosurfactantes en la cepa seleccionada (*Pseudomonas* 14) en agar CTAB/AM.

**Tabla 6.6.** Evaluación de la producción de surfactante por la cepa *Pseudomonas* 14.

Sistema	Glu	AM	CTAB	C12	GOA	Crecimiento	Biosurfactante
1	-	+	-	-	-	-	-
2	-	-	+	-	-	-	-
3	+	-	+	+	-	+	+
4	+	-	+	-	+	++	+
5	+	-	-	+	-	+++	+
6	+	-	-	-	+	+++	+
7	+	+	+	-	-	-	-
8	+	+	+	-	+	+++	+



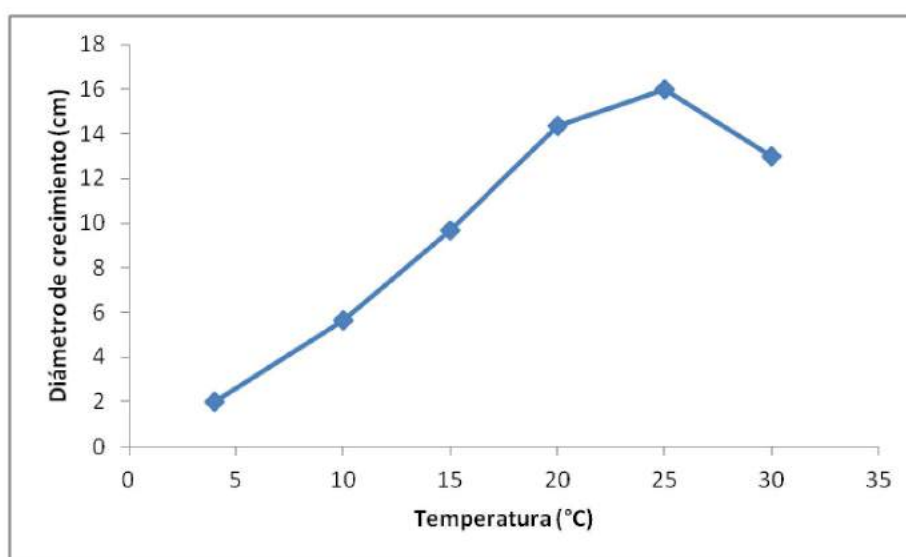
Emulsión entre fase orgánica y acuosa generada por el surfactante

**Figura 6.3.** Producción de surfactante por la cepa *Pseudomonas* 14 en medio líquido adicionado con GOA. Corresponde al sistema 8 de la Tabla 6.6.

En relación a los estudios con la cepa fúngica *Penicillium* D8, su temperatura óptima de crecimiento fue 25°C (Figura 6.4), por lo que se caracterizó a este hongo como *sicrotolerante*. Además, D8 registró crecimiento en todas las fuentes de carbono evaluadas, incluso petróleo crudo, evidenciando su potencial para ser aplicado en esquemas de biorremediación de suelos contaminados por distintas fuentes de compuestos derivados del petróleo (Tabla 6.8).

**Tabla 6.7.** Diámetro de crecimiento de *Penicillium* sp. (D8) a distintas temperaturas.

Temperatura (°C)	Diámetro crecimiento (cm)			Promedio (cm)
4	2	2	2	<b>2,00</b>
10	6	6	5	<b>5,67</b>
15	10	10	9	<b>9,67</b>
20	14	15	14	<b>14,33</b>
25	17	15	16	<b>16,00</b>
30	13	12	14	<b>13,00</b>



**Figura 6.4.** Perfil de crecimiento de *Penicillium* sp. (D8) a distintas temperaturas.

**Tabla 6.8.** Perfil de crecimiento de *Penicillium* sp. (D8) con distintos hidrocarburos como fuente de carbono y energía.

Hidrocarburo	Crecimiento
C <sub>11</sub>	+
C <sub>12</sub>	+
C <sub>13</sub>	+
C <sub>14</sub>	+
C <sub>16</sub>	+
GOA <sup>a</sup>	+
GON <sup>b</sup>	+
Petróleo	+

<sup>a</sup>Gas Oil Antártico. <sup>b</sup>Gas Oil Naval

#### 6.1.4. Discusión

El suelo antártico contaminado con hidrocarburos representa, sin lugar a dudas, una fuente interesante de microorganismos con potencial para ser utilizados en aplicaciones biotecnológicas. Todos los microorganismos identificados en este trabajo se encuentran relacionados con otros que han sido reportados previamente como herramientas biotecnológicas.

La detección de varias cepas del género *Pseudomonas* en los suelos estudiados puede ser considerada como una característica habitual de dichos suelos. Los miembros de la familia Pseudomonadaceae son reportados como frecuentes habitantes de suelos contaminados con hidrocarburos (Cantwell y col., 1978) y han mostrado poseer una gran capacidad para degradarlos, por lo que se los considera candidatos promisorios para el desarrollo de estrategias de bioaumentación, principalmente si se tiene en cuenta que son típicos estrategas r, con una rápida tasa de consumo de fuentes de energía disponible, como los hidrocarburos de estos suelos.

En el suelo contaminado, se aisló una cepa del género *Caulobacter*. Los miembros de este género son bacterias prostecadas, habitan principalmente en hábitats acuáticos (Maeda y col., 2009) y están bien adaptadas a condiciones oligotróficas, como suelen ser los suelos antárticos (Wolf-Rainer y col., 1999). Se ha reportado que juega un rol importante en el ciclo de materia orgánica en condiciones de baja concentración de nutrientes y baja temperatura (Stanley y col., 1987). Estos grupos bacterianos (tanto la familia *Pseudomonadaceae* como el género *Caulobacter*) se consideran responsables de la mineralización de una importante fracción de material orgánico disuelto en ambientes acuáticos.

Por otra parte, *Variovorax* ha sido reportado como un género prevalente en suelos antárticos contaminados con hidrocarburos, junto con *Pseudomonas*, *Sphingomonas* y *Rhodococcus* (Saul y col., 2005). El aislamiento obtenido a partir de este suelo, *Variovorax ginsengisoli*, fue recientemente descrito como una especie novedosa, con actividad desnitrificante (Wan-Taek y col., 2010). Si esta actividad se confirmara en el aislamiento de la cepa *Variovorax* obtenida, puede convertirse en un desarrollo interesante para procesos de biorremediación a bajas temperaturas bajo condiciones anaeróbicas.

Otra de las cepas aisladas, *Sphingomonas aerolata* fue reportada por Aislabie y col. (2000) para suelos antárticos, como así también reportada en hielo de 4.200 años de antigüedad (Chistner y col., 2000, 2001). Los miembros del género *Sphingomonas* son comúnmente reportados para suelos de regiones frías contaminados con hidrocarburos (Saul y col., 2005).

En cuanto a las levaduras aisladas, *Glaciozyma* fue reportada para ambientes fríos a lo largo de todo el mundo, como en glaciares de los Alpes o los Apeninos, y suelos y aguas de Antártida. Las dos especies pertenecientes a este nuevo género fueron descritas en 2011 (Turchetti y

col., 2011). Recientemente, Hashin y col. (2013) caracterizaron una proteína anticongelante de *Glaciozyma antarctica* PI12, lo que resalta el potencial biotecnológico que presenta este microorganismo.

Varios de los aislamientos provenientes de los suelos contaminados fueron clasificados como miembros del género *Cadophora*. Esta observación no es sorprendente, ya que los hongos del género *Cadophora* han sido aislados con frecuencia de suelos antárticos contaminados con hidrocarburos, si bien su capacidad de catabolizar estos compuestos no siempre ha sido confirmada (Aislabie y col., 2014). Su aparente abundancia en suelos contaminados de áreas frías y el escaso conocimiento acerca del rol de estos microorganismos en los procesos de degradación de hidrocarburos convierte a estos aislamientos en sistemas de gran interés para los futuros estudios sobre estrategias de bioaumentación con suelos de Base Carlini. Además, otra cepa antártica de esta especie mostró producción y liberación de exudados con actividad inhibitoria del crecimiento sobre otros hongos, como *Diploidia mais* (Ruberto y col., 2011).

En cuanto a los hongos pertenecientes al género *Aspergillus*, son bien conocidos por su amplia distribución, expresión de proteínas heterólogas, producción de toxinas y aplicación en la producción de alimentos fermentados, entre otras aplicaciones. Una cepa psicrófila o psicrotolerante de este hongo puede resultar un modelo interesante para la producción de enzimas activas a baja temperatura así como diversos metabolitos secundarios.

*Cryptococcus laurentii* es considerado un hongo psicrófilo, con muy poco crecimiento por sobre los 30°C y una temperatura óptima de crecimiento en 15°C, que es frecuentemente encontrado en suelos antárticos (Tosi y col., 2002). Cepas de este hongo han sido reportadas como degradadoras de atrazina en suelos agronómicos y propuestas como microorganismos de gran utilidad en procesos de biorremediación (Evy y col., 2012).

Adicionalmente, el hallazgo de cepas de varios miembros del género *Pseudomonas*, además de *Caulobacter*, *Sphingomonas* y *Variovorax* sugiere que en caso de lograr una asociación de estos microorganismos en el laboratorio, se tornaría en una opción adecuada para desarrollar herramientas biológicas para la remediación de suelos de regiones frías. La asociación natural que ocurre entre microorganismos (consorcios) generada de manera artificial (en el laboratorio) puede proveer algunas ventajas al momento de reintroducirlos en el suelo en forma de bioaumentación, sobrepasando al menos parcialmente las problemáticas que presenta este procedimiento. La existencia de relaciones sinérgicas entre dichas cepas debe ser estudiada en una etapa posterior.

Como ejemplo, e hipotetizando, la capacidad de *Cryptococcus laurentii* de metabolizar compuestos orgánicos recalcitrantes podría ser agregada a las asociaciones bacterianas mencionadas previamente, reforzando el potencial degradativo de las mismas, y proveyendo al sistema de alguna de las características propias de los hongos, como la producción de

exoenzimas, la habilidad para degradar polímeros, o su alta actividad incluso con bajos niveles de actividad de agua en el suelo.

Nuevos *screenings* utilizando diferentes condiciones son necesarios de manera de poder aislar otros microorganismos que permitan una buena complementación de esta herramienta de biorremediación. En ese sentido, aquellas bacterias que presenten una estrategia *k* (con la habilidad para utilizar nutrientes escasos a largo plazo), como pueden ser las cepas de *Rhodococcus* o *Arthrobacter*, parecieran ser a priori candidatos apropiados para dicha asociación en pos de buscar un proceso biodegradativo más completo.

Las dos cepas aisladas, seleccionadas e identificadas como buenas candidatas para la realización de un bioaumentación en este capítulo no han sido reportadas previamente en el continente antártico. Por el lado de *Pseudomonas* sp. (*brenerii*), si bien está ampliamente registrada la capacidad de producción de biosurfactantes del género *Pseudomonas* (Sørensen J y Nybroe, 2004), la especie seleccionada en este trabajo no posee reportes previos de producción de compuestos tensioactivos. Sin embargo, los buenos niveles de producción de surfactante, sumado al buen índice de emulsificación obtenido para el mismo en ensayos preliminares permiten hipotetizar que la cepa en cuestión posee una gran potencialidad como complemento de las estrategias de remediación implementadas en este trabajo de tesis.

Finalmente, *Penicillium glabrum* es un hongo filamentoso ubicuo, distribuido mundialmente. Es frecuentemente encontrado en la industria alimenticia como contaminante principal de quesos (Pitt y Hockings, 1997) y aguas (Ancasi y col., 2006; Nevarez y col., 2009). Además, hasta la fecha, su uso como herramienta de biorremediación es muy escaso (Tastan, 2017). Esta especie tampoco ha sido reportada previamente en Antártida; sin embargo, la alta velocidad de crecimiento y el buen crecimiento registrado a 10 y 15°C (temperaturas frecuentemente registradas en suelos antárticos) indican que su uso es potencialmente factible. Adicionalmente, la amplia versatilidad catabólica (creciendo sobre todas las fuentes de hidrocarburos ensayadas, incluido petróleo) y la capacidad de esporular (facilitando la generación de niveles elevados de biomasa necesarios para la realización de bioaumentación) lo convierten en un gran candidato a la hora de evaluar una segunda etapa de biorremediación sobre los suelos contaminados.

Esta etapa del estudio representa sólo un primer paso. Es claro que se requerirán más ensayos, involucrando las cepas seleccionadas para evaluar su efectividad como herramientas biológicas a utilizar en una segunda etapa de un proceso de biorremediación secuencial de estos suelos antárticos contaminados, luego de una etapa de bioestimulación realizada en primera instancia.

## **6.2. Parte II. Cambios en la comunidad bacteriana durante los procesos de biorremediación a campo**

### **6.2.1. Introducción**

Como se describió en capítulos anteriores, la bioestimulación involucrando la optimización de variables clave como los niveles de Nitrógeno (N) y Fósforo (P) a agregar al suelo, ha demostrado ser un método simple, barato y efectivo para aplicar en estos suelos de Antártida (Martínez Álvarez y col., 2017). Sin embargo, la remoción de contaminantes no es llevada a cabo por la totalidad de la flora microbiana, ya que sólo ciertos grupos prevalecen por sobre otros, en una dinámica compleja durante la cual algunos grupos microbianos dominan, muchas veces de manera transitoria, el proceso de remediación. Conocer y comprender esta dinámica permitiría no sólo obtener información importante del proceso, sino también habilitaría la posibilidad de favorecer a aquellos grupos más adecuados en el momento oportuno y así, al menos hipotéticamente, incrementar la eficiencia de remoción de contaminantes. Por estas razones, la comprensión de los cambios que sufren las comunidades microbianas de suelos los bajo el tratamiento de biorremediación a campo es crucial para alcanzar resultados óptimos. Entender la dinámica de la comunidad microbiana es también relevante si se piensa en una potencial estrategia secuencial del tratamiento. En esta parte del capítulo, se analizan los cambios en la comunidad microbiana de suelos antárticos crónicamente contaminados con gasoil a lo largo de un proceso de bioestimulación *on-site*, comparando los dos sistemas de biopilas dispuestos en los ensayos descritos en el Capítulo 4.

### **6.2.2. Materiales y métodos**

El suelo para la conformación de las biopilas se obtuvo de la zona circundante a los tanques de almacenamiento de gasoil en la Base Carlini (Arg.) como se describió en la sección 4.2.1. Se tomaron muestras cada 10 días, durante un período de tratamiento de 40 días (5 muestreos por biopila), durante la campaña antártica de verano 2013/2014. El ADN genómico total fue extraído del suelo mediante el uso de un kit apropiado (Mobio, Power Soil).

#### **6.2.2.1. Construcción de la biblioteca de amplicones 16S rRNA**

La composición de la biblioteca involucró dos reacciones de PCR distintas: una PCR de amplicones y una PCR index. Durante la PCR de amplicones, el ADN extraído y purificado fue utilizado como templado para los siguientes *primers*:

5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'

y

5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3',

en donde la región subrayada representa la secuencia de nucleótidos del adaptador *overhang*, mientras que la región no subrayada representa el blanco de secuencias locus-específicas de la región conservada del dominio V<sub>3</sub> y V<sub>4</sub> del rARN 16S. Estas secuencias fueron diseñadas en base a un par de *primers* reportados previamente, que presentaban una cobertura mayor a nivel de phyla para las bibliotecas de amplicones de alrededor de 500pb (Klindworth y col., 2013). La mezcla de reacción de la PCR y las condiciones de ciclado se muestran en las Tablas 6.9 y 6.10 respectivamente. La amplificación se realizó en un Mastercycler Nexus (Eppendorf, Hamburg, Germany).

**Tabla 6.9.** Composición de la mezcla de reacción de la PCR.

Reactivo	Volumen (μl)
AND Metagenómico (5 ng/μl)	2,5
<i>Primer Forward</i> (1μM)	5,0
<i>Primer Reverse</i> (1μM)	5,0
2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix <sup>a</sup>	12,5

<sup>a</sup> de KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA.

**Tabla 6.10.** Condiciones del ciclado de la PCR de amplicones del ADN obtenido de los suelos de las biopilas.

Paso	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Duración
Desnaturalización inicial	1	95	3 min
Desnaturalización		95	30 s
<i>Annealing</i>	25	55	30 s
Extensión		72	30 s
Extensión final	1	72	5 min
<i>Hold</i>	-	4	-



Los productos amplificados resultaron en una secuencia de aproximadamente 550 pb. Los amplicones fueron centrifugados a  $1000 \times g$  a  $20^{\circ}\text{C}$  durante 1 min para coleccionar la condensación y luego purificados usando perlas Agencourt AMPure XP. Para la elución, se usaron  $52,5 \mu\text{l}$  de Tris 10 mM (pH 8,5). Posteriormente,  $50 \mu\text{l}$  del sobrenadante se transfirieron a tubos de microcentrífuga. Durante la PCR *index*, se utilizaron  $5 \mu\text{l}$  del amplicon purificado. La mezcla de reacción para esta PCR se muestra en la Tabla 6.11. La mezcla fue mezclada vigorosamente 10 veces mediante pipeteo y centrifugación a  $1000 \times g$  a  $20^{\circ}\text{C}$  durante 1 min. La amplificación se realizó en un Mastercycler Nexus siguiendo las condiciones de ciclado resumidas en la Tabla 6.12. Luego de la amplificación, la biblioteca de amplicones fue purificada utilizando perlas Agencourt AMPure XP.  $27,5 \mu\text{l}$  of 10 mM Tris (pH 8,5) fueron utilizados como buffer de elución y  $25 \mu\text{l}$  del sobrenadante fueron transferidos a un tubo de microcentrífuga. La calidad de la biblioteca de amplicones fue validada corriendo  $1 \mu\text{l}$  de una dilución 1:50 en un Chip de Alta Sensibilidad para ADN (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) y visualizado en un Bioanalizador Agilent Technologies 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). La distribución de fragmentos esperada para la biblioteca de amplicones se encontraba alrededor de las 630 pb. Adicionalmente, la cantidad de ADN en la biblioteca fue determinada utilizando un Fluorómetro Qubit® 2.0.

**Tabla 6.11.** Composición de la mezcla de la PCR *index*.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{l}$ )
Amplicon	5
Nextera XT <i>Index Primer 1</i> (N7xx) <sup>a</sup>	5
Nextera XT <i>Index Primer 2</i> (S5xx) <sup>a</sup>	5
2X KAPA <i>HiFi HotStart ReadyMix</i> <sup>b</sup>	25
Agua grado PCR	10

<sup>a</sup> de Nextera® XT Index kit (Illumina, San Diego, CA, USA).

<sup>b</sup> de KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA.

**Tabla 6.12.** Condiciones de ciclado para la PCR *index*.

Paso	Número de ciclos	Temperatura( $^{\circ}\text{C}$ )	Duración
Desnaturalización inicial	1	95	3 min
Desnaturalización		95	30 s
<i>Annealing</i>	8	55	30 s
Extensión		72	30 s
Extensión final	1	72	5 min
<i>Hold</i>	-	4	-

### 6.2.2.2. Normalización de la biblioteca de amplicones del 16S, pooling, desnaturalización y carga de muestra en MiSeq

La concentración de ADN fue calculada en base a la concentración y tamaño de los amplicones de ADN determinados en el Fluorómetro Qubit® 2.0 y el Bioanalizador Agilent Technologies 2100, respectivamente, utilizando la ecuación:

$$C = \frac{A}{660 \times \text{tamaño promedio de la biblioteca}} \times 10^6$$

donde C es la concentración de ADN (nM) y A es la concentración de amplicones de ADN en ng/μl.

La biblioteca de amplicones fue normalizada a 4 nM mediante dilución con 10 mM Tris (pH 8,5). Aquellas bibliotecas con índices únicos fueron combinadas al mezclar 5 μl de la solución de ADN diluida de cada biblioteca. La generación de los *clusters* fue preparada utilizando el Kit de Reactivos v3 para MiSeq® (600 ciclos) (Illumina, San Diego, CA, USA). En este paso, las bibliotecas de amplicones combinadas fueron desnaturalizadas mediante el agregado de 0,2N NaOH en un tubo de microcentrífuga. La solución resultante fue mezclada en vortex y centrifugada a 280 x g a 20°C por 1 min. Luego se incubó 5 min a temperatura ambiente para lograr la desnaturalización del ADN en cadenas simples. Al tubo de muestra conteniendo el ADN desnaturalizado se le agregaron 990 μl de buffer de hibridación HT1 generando una solución con concentración final de 4 pM de ADN desnaturalizado en 1 mM de NaOH. La solución se invirtió reiteradas veces y se centrifugó para asegurar un correcto mezclado. La biblioteca de amplicones desnaturalizada y diluida fue luego colocada en hielo para combinarla con la biblioteca PhiX.

La biblioteca PhiX fue diluida hasta 4 nM con 10 mM de buffer Tris (pH 8,5) y desnaturalizada siguiendo el mismo protocolo que la biblioteca de amplicones. 30 μl de este control desnaturalizado y diluido fueron mezclados con 570 μl de la biblioteca de amplicones. La biblioteca combinada fue luego incubada a 96°C durante 2 min. Los tubos se invirtieron 1 o 2 veces luego de la incubación y se colocaron inmediatamente en hielo durante 5 min previo a ser cargados en el secuenciador.

### 6.2.2.3. *Secuenciación de los amplicones de 16S rRNA*

La biblioteca combinada (conteniendo el control PhiX) fue cargado en el MiSeq y sometida a una secuenciación multiplex 2 x 300 pb con bordes apareados usando un secuenciador Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) disponible en el High Impact Research Institute at the University of Malaya (Malasia).

### 6.2.2.4. *Procesamiento de las secuencias obtenidas*

Las secuencias resultantes fueron procesadas utilizando el software Qiime®, incluyendo un chequeo de control de calidad para descartar las secuencias no aptas para ser analizadas. El procesamiento (*pipeline*) utilizado incluía:

**Función QC:** El primer paso incluyó un control de calidad de las secuencias obtenidas, a través de la plataforma FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), que realiza una evaluación de la calidad de cada uno de los pares de bases identificados, en su posición determinada, evaluado para las secuencias generadas por cada uno de los *primers* utilizados sobre cada muestra (2 secuencias por muestra, primer *forward* y primer *reverse*). Por la naturaleza de la secuenciación, este “score” decae al acercarse a los pares de base finales de la secuencia. En este caso, un score de 30 en el Quality Control (QC) fue establecido como parámetro, por lo que el largo de las secuencias fue delimitado por la primera base con un valor de QC menor a 30. Este paso generó en promedio el descarte de un 4,57% de las secuencias (16.141 secuencias descartadas de un total de 352.975)

**Función Paired:** A continuación, se emparejaron las secuencias generadas por cada primer para una misma muestra mediante la función “paired”. Este paso generó secuencias unificadas por muestra, por medio de la superposición de las secuencias generadas por los *primers forward* y *reverse*, y expresada en lenguaje FASTA.

**Función Dereplication:** Una vez obtenida las secuencias correspondiente a cada muestra en formato FASTA, se identificaron las secuencias únicas de manera de evitar contemplar copias de una misma secuencia en los análisis posteriores. Se obtuvo un promedio de 27.375 secuencias únicas por muestra.

**Función descarte de singletons:** Es este paso, se descartaron aquellas secuencias que aparecían un número muy bajo de veces ya que pueden deberse a errores de la secuenciación.

En este caso en particular, se descartaron aquellas secuencias que presentaban una abundancia menor a 5 en la base de datos.

**Función chimera:** Se consideran quimeras a las secuencias que aparecen como la fusión de otras dos o más secuencias formadas durante la PCR (Smith y col., 2010; Thompson y col., 2002; Meyerhans y col., 1990; Judo y col., 1998; Odelberg, 1995). Mediante este paso, se descartaron 606 (2,7%) secuencias por presentar formaciones quiméricas, dejando 21.686 secuencias aptas en promedio por muestra.

**Función cluster:** A cada una de las secuencias obtenidas, se les adjudicó un OTU (Unidad Taxonómica Operativa), con un determinado grado de rigurosidad. En este caso, al tratarse de la región hipervariable V<sub>3</sub>-V<sub>4</sub> del gen del 16S rRNA, se consideró apropiado utilizar un valor laxo de agrupamiento, por lo que los OTU's fueron asignados con una rigurosidad del 95%.

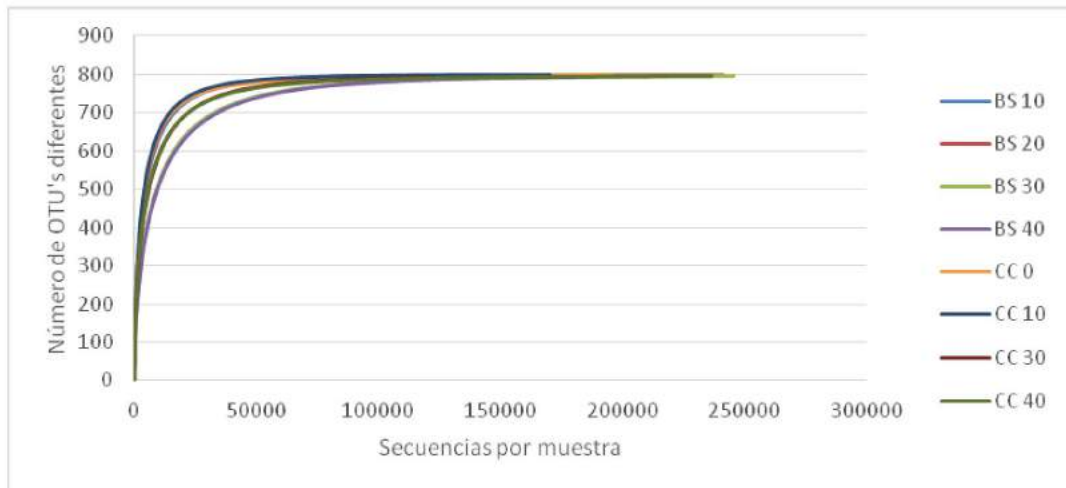
**Función assign taxonomy:** Una vez obtenida la tabla de OTU's para cada muestra, se les asignó su grupo taxonómico comparándolas con las secuencias contenidas en la base de datos Silva rRNA Database Project (<https://www.arb-silva.de>) para bacterias. Se consideró un 97% de similitud como valor de corte para establecer la filiación de cada secuencia a nivel de género.

Los resultados fueron luego procesados con el software R para su análisis estadístico. Mediante el uso del paquete estadístico *vegan*, se calcularon índices de diversidad microbiana en las muestras en estudio (índices de Shannon, Simpson e inversa de Simpson).

### 6.2.3. Resultados

Para la realización e inclusión de los gráficos correspondientes a la biblioteca de amplicones, y para una visualización más clara, solamente se tuvieron en cuenta aquellos grupos bacterianos que representaron al menos el 1% del total de las secuencias en algún momento del ensayo (desde el tiempo inicial 0 hasta los 40 días), tanto para el sistema BS como el CC.

Las curvas de rarefacción dan una idea clara y gráfica acerca de si la cantidad de secuencias obtenidas luego de la secuenciación es satisfactoria para las muestras evaluadas. Esto se visualiza como un comportamiento asintótico de las secuencias de cada muestra hacia un valor máximo. Las asíntotas obtenidas evidencian que se alcanzó una cobertura apropiada de las secuencias presentes en la muestra, y que un mayor número de secuencias evaluadas ya no redundará en un mayor número de OTU's descriptos. En este caso, todas las muestras fueron satisfactoriamente cubiertas en cuanto a sus secuencias (Figura 6.5).



**Figura 6.5.** Curvas de rarefacción para la secuenciación de las muestras evaluadas.

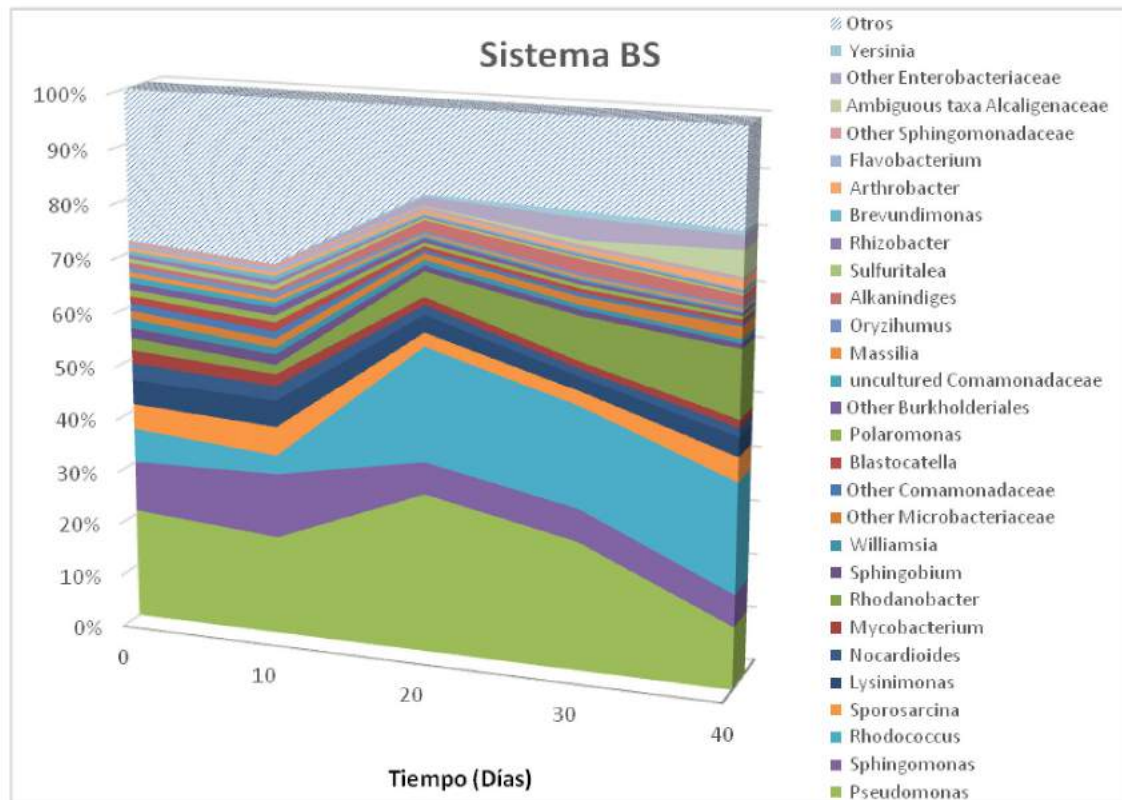
La riqueza (S) del suelo de los tratamientos, evaluada como la cantidad de OTU's diferentes obtenidos luego de la secuenciación, se mantuvo alrededor de los 800 OTU's a lo largo de todo el ensayo, tanto para BS como para CC, con un leve descenso en el número hacia el final del ensayo (Tabla 6.13). Cuando se compara la riqueza observada con la riqueza esperada (chao1), casi no se registran diferencias en el número de OTU's obtenido en comparación con el esperado, indicando nuevamente que la secuenciación presentó valores de cobertura muy satisfactorios.

**Tabla 6.13.** Riqueza (S) observada y riqueza estimada (chao1) para cada muestra, calculada como número de OTU's diferentes obtenidos.

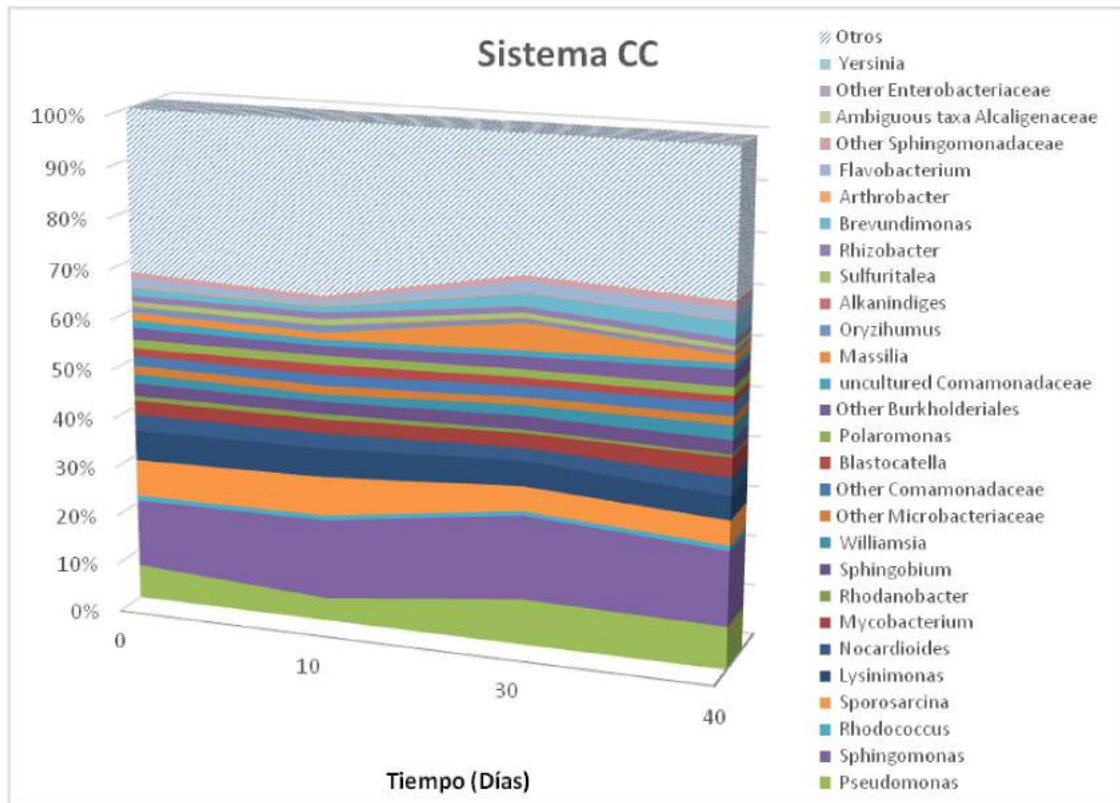
	BS 0	BS 10	BS 20	BS 30	BS 40	CC 0	CC 10	CC 30	CC 40
S, observado	800	801	796	792	791	801	799	792	795
S, chao1	801	802	797	796	799	804	799	796	800

Los resultados de la biblioteca de amplicones mostraron que en la biopila control (CC), la comunidad bacteriana permaneció prácticamente sin cambios significativos durante todo el período experimental (Figura 6.8), mientras que el sistema BS (en el que se alcanzó más de un 75% de remoción de hidrocarburos) evidenció considerables cambios en la proporción de algunos de los géneros bacterianos a lo largo del tiempo (Figura 6.7). El cambio más significativo en el sistema BS consistió en un temprano incremento del género *Pseudomonas* sp., especialmente notorio entre los días 10 y 20 de tratamiento, que elevó en aproximadamente un 10% (de 20,6% a 29,8% de las secuencias totales obtenidas) la proporción de los integrantes de este género dentro de la comunidad. Esta dominancia del género *Pseudomonas* se fue atenuando progresivamente hasta alcanzar un 11% al final del tratamiento. El incremento de los miembros del género *Pseudomonas* pareció estar principalmente acompañado por un descenso del género

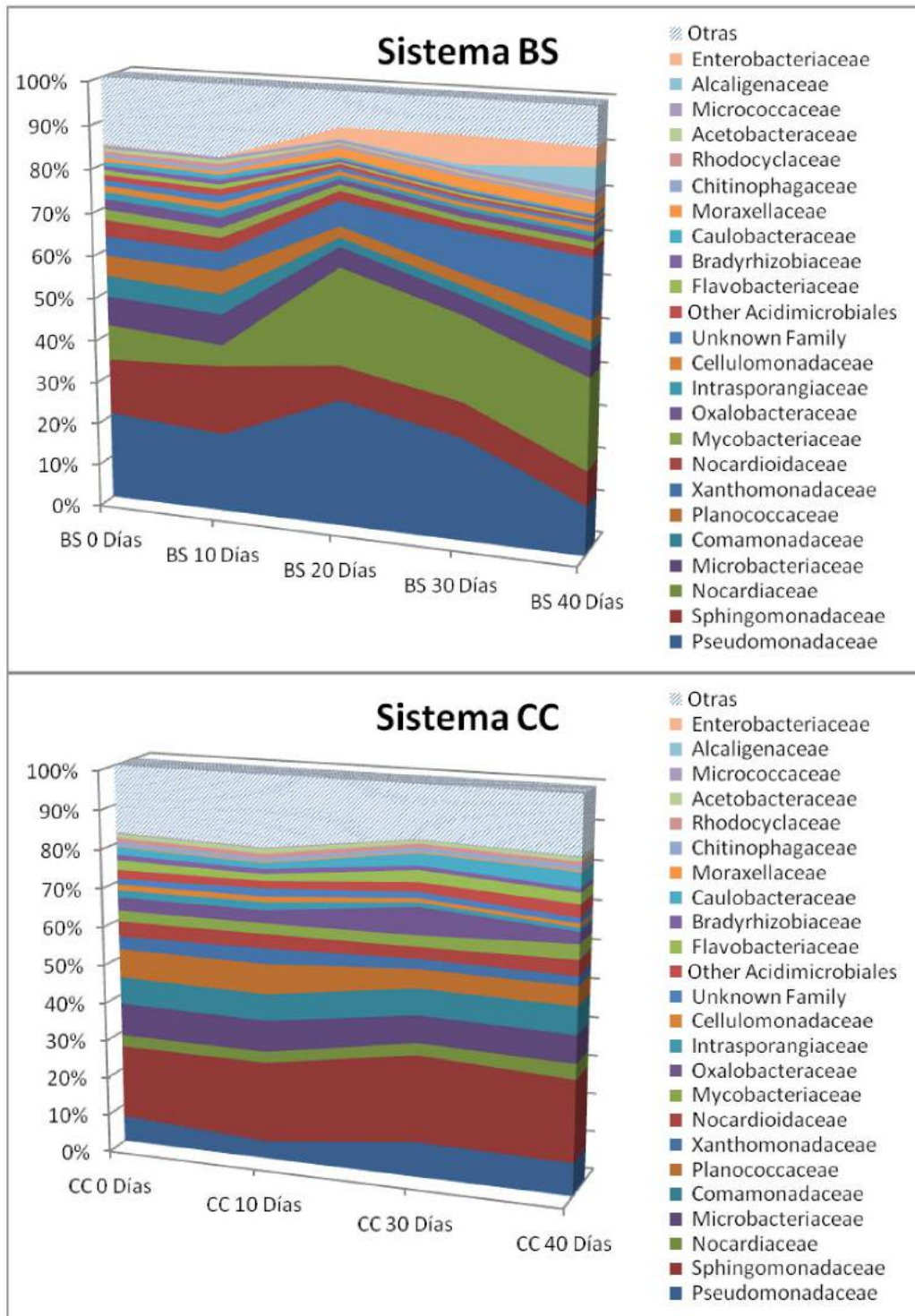
*Sphingomonas*, cuyos miembros han sido frecuentemente reportados como habitantes de suelos contaminados y que se mantuvo como el principal grupo presente en el suelo CC durante todo el ensayo (alrededor del 15%). Además, el incremento del género *Pseudomonas* fue acompañado también por un notorio incremento (de 3,5% a 21% aproximadamente) de *Rhodococcus* sp. entre los días 10 y 20 (que se mantuvo hasta el final del ensayo) y de *Rhodanobacter* sp. entre los días 20 y 40 del experimento.



**Figura 6.7. Géneros bacterianos mayoritarios a lo largo del ensayo para el sistema bioestimulado (BS). Muestrados tomados cada 10 días (del día 0 al día 40).**

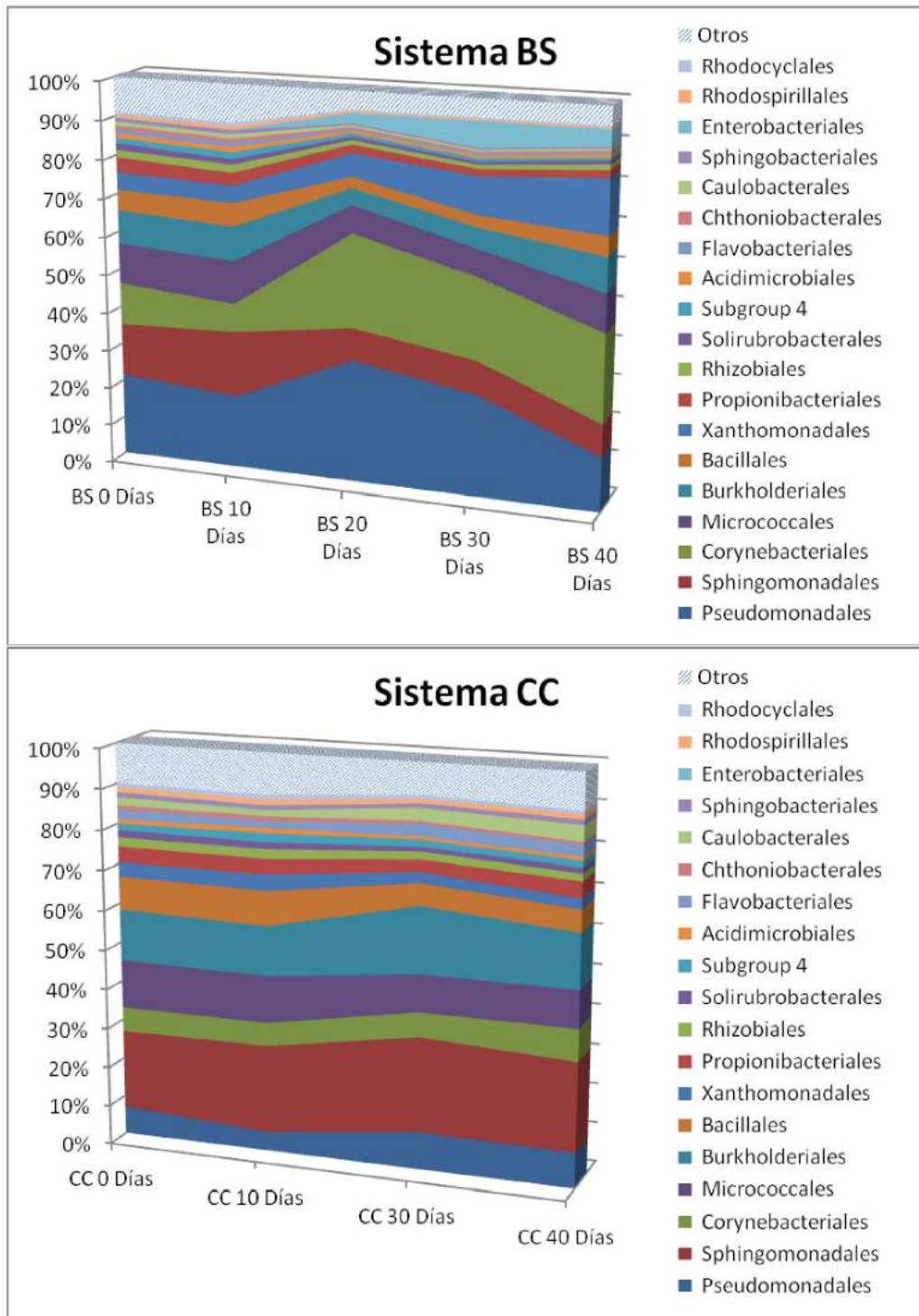


**Figura 6.8. Géneros** bacterianos mayoritarios a lo largo del ensayo para el sistema control (CC). Muestras tomadas cada 10 días (del día 0 al día 40). El muestreo correspondiente al día 20 no se incluye por problemas metodológicos.

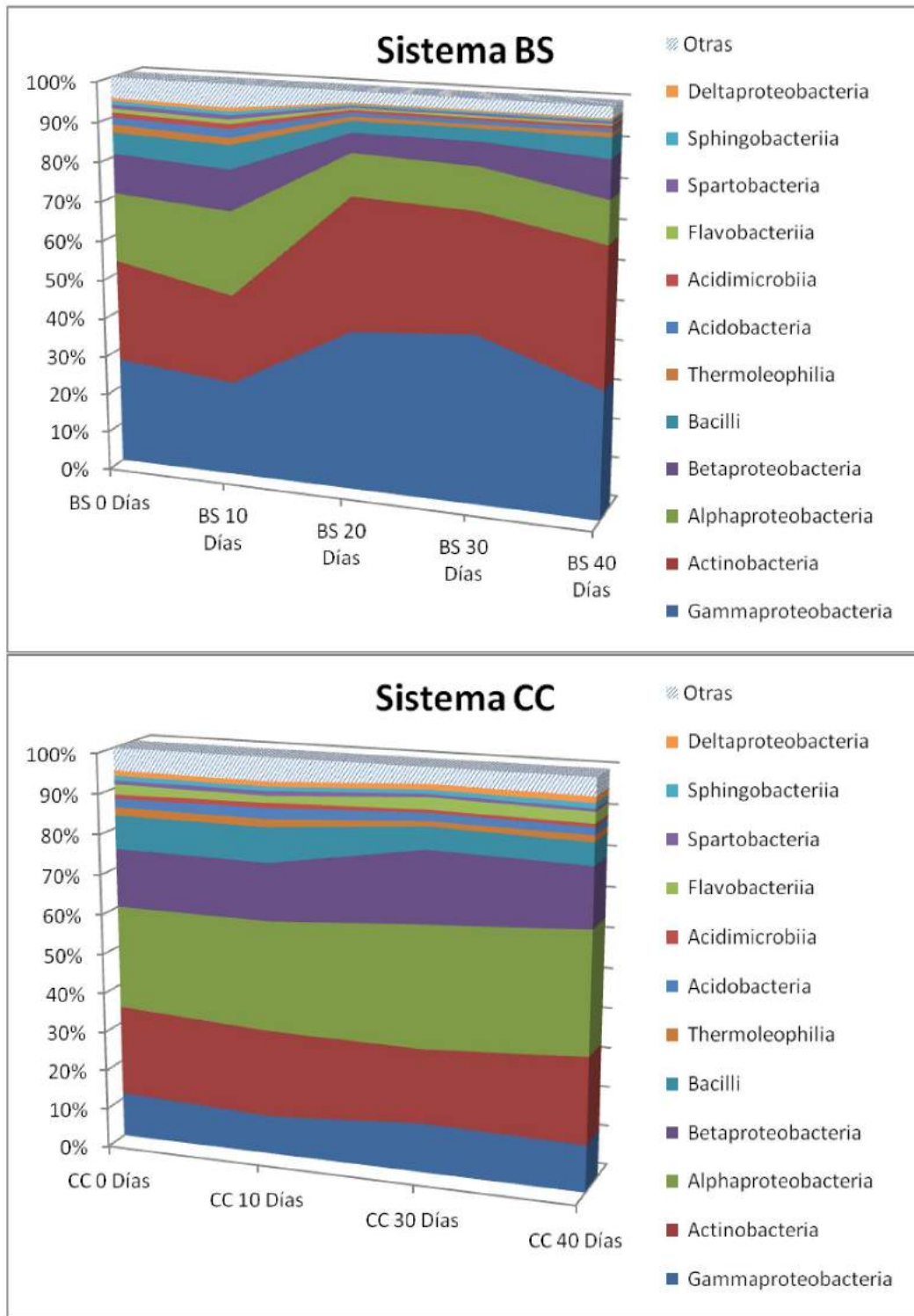


**Figura 6.9.** Familias bacterianas mayoritarias a lo largo del ensayo para el sistema control (CC). Muestrados tomados cada 10 días (del día 0 al día 40). El muestreo correspondiente al día 20 no se incluye por problemas metodológicos.

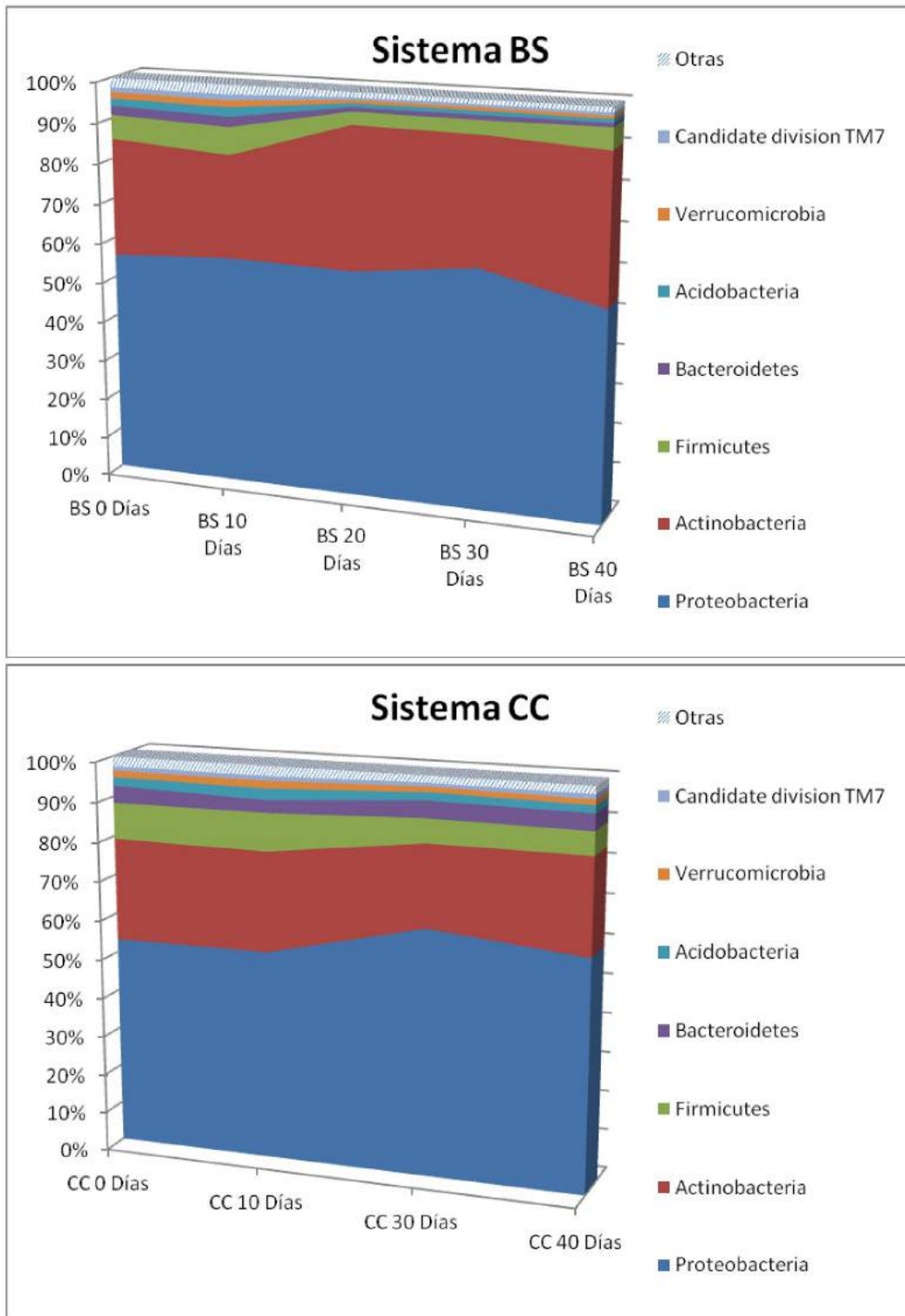




**Figura 6.10.** Órdenes bacterianos mayoritarios a lo largo del ensayo para el sistema control (CC). Muestrados tomados cada 10 días (del día 0 al día 40). El muestreo correspondiente al día 20 no se incluye por problemas metodológicos.

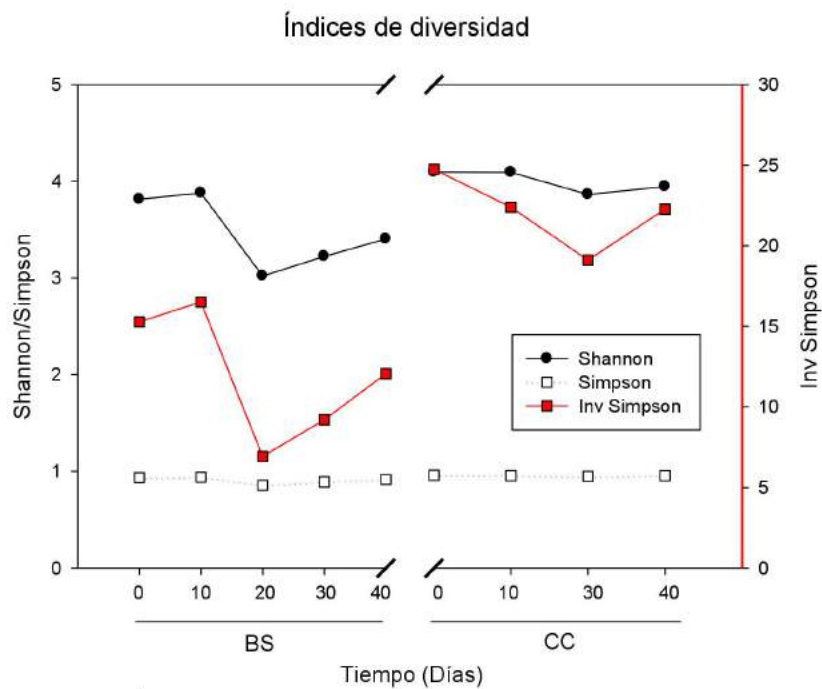


**Figura 6.11.** Clases bacterianas mayoritarias a lo largo del ensayo para el sistema control (CC). Muestras tomadas cada 10 días (del día 0 al día 40). El muestreo correspondiente al día 20 no se incluye por problemas metodológicos.



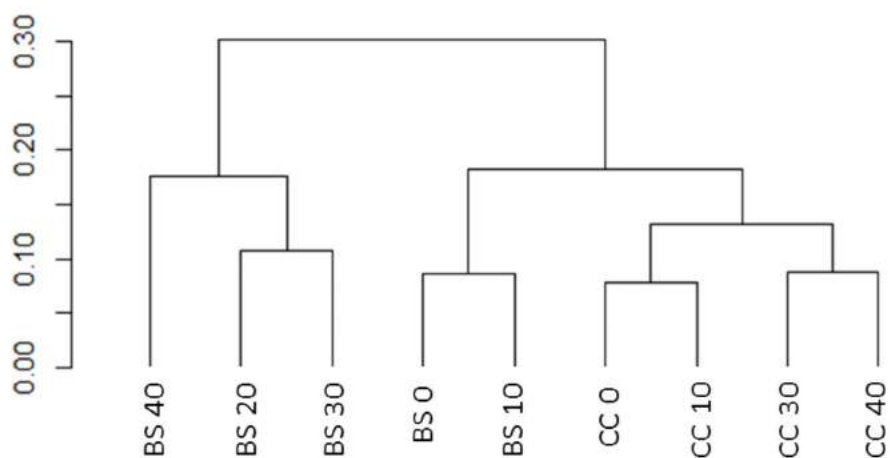
**Figura 6.12.** Filos bacterianos mayoritarios a lo largo del ensayo para el sistema control (CC). Muestras tomadas cada 10 días (del día 0 al día 40). El muestreo correspondiente al día 20 no se incluye por problemas metodológicos.

Respecto a los valores de diversidad microbiana obtenidos en las biopilas, puede observarse en la Figura 6.13 que los tres índices (Shannon, Simpson e inversa de Simpson) indicaron que la diversidad es menor en el sistema BS a lo largo de todo el ensayo, con un importante descenso en sus valores alrededor de los 20-30 días. Puede observarse que los valores de diversidad partieron desde un nivel menor para el sistema BS tras el agregado de los nutrientes. Hacia el tiempo final (40 días) los valores de diversidad aumentaron en todos los sistemas, pero en ningún caso alcanzaron los valores iniciales (Figura 6.13).



**Figura 6.13.** Índices de diversidad microbiana calculados a partir de los OTU's obtenidos para cada muestra. Los índices de Shannon (●) y Simpson (□) se corresponden al eje Y de la izquierda, mientras que Simpson Inverso (■) corresponde al eje Y de la derecha.

Por último, el dendrograma resultante del árbol de clasificación de las muestras originado por el paquete *vegan* en el software estadístico R, muestra que el tiempo final del ensayo (BS 40) fue el que más se diferenció del resto de las muestras (Figura 6.14). Ello indica que el agregado de sales no solo produce un cambio inicial en las comunidades de dichos suelos, sino que dicho cambio se mantiene e incluso se acentúa a lo largo del tratamiento. Por ende, las diferencias entre las comunidades se hacen mayores en el transcurso de la biodegradación del contaminante, alcanzando una estructura significativamente diferente con respecto al suelo no tratado.



**Figura 6.14.** Dendrograma mostrando el agrupamiento de las diferentes muestras de acuerdo a su similitud.

#### 6.2.4. *Discusión*

Los datos recolectados en este capítulo demuestran que los procesos de biodegradación de un contaminante (en este caso, hidrocarburos derivados del petróleo) acarrearán consigo un amplio abanico de cambios asociados en las comunidades microbianas asociadas a los mismos. Ha quedado en evidencia que no sólo la presión de selección que ejerce el contaminante es determinante de la comunidad del suelo, sino que la optimización de las condiciones físico-químicas del mismo a través de la bioestimulación efectuada, desencadena cambios en la comunidad que persisten e incluso se profundizan a lo largo del proceso de remediación, hasta alcanzar estados significativamente distintos de aquellos de los que partieron.

El estudio particular de las comunidades presentes en el suelo tratado de las biopilas presentadas en el Capítulo 4, permite observar que el agregado de sales gatilla un efecto casi inmediato sobre las comunidades, evidenciado por las diferencias registradas entre BS 0 y CC 0 en todas las categorías taxonómicas (Figuras 6.7 a 6.12). Estas diferencias son detectadas incluso sólo unas pocas horas después del agregado del N y P (luego del mezclado de las biopilas), momento en que se tomaron las muestras de suelo de tiempo 0. Por más que este cambio tan rápido parezca difícil de justificar desde el punto de vista de la cinética de crecimiento de los microorganismos, comportamientos similares han sido observados en reiteradas ocasiones por

miembros del grupo de trabajo en el cual está inmerso este trabajo de tesis. Estos resultados abren una muy interesante puerta a estudios más profundos a fin de intentar comprender los motivos de estos cambios tan rápidos de la microbiota al agregado de nutrientes.

La evaluación de las etapas más avanzadas del proceso mostraron que los géneros *Pseudomonas* y *Rhodococcus* parecen responder a una dinámica de estrategias r y k, respectivamente (van Elsas y col., 2007), donde los primeros explotan un recurso abundante e incrementan su participación en la comunidad para luego ceder la dominancia a los segundos, que proliferan en condiciones de menor abundancia y de manera más estable. Si bien las condiciones en las cuales comienza el incremento de *Rhodococcus* (días 10 a 20) parecen distar de poder ser consideradas de escasez; ya que la concentración de hidrocarburos presente en el suelo era alrededor de 880 mg kg<sup>-1</sup> (lo que representaría un recurso aun abundante en comparación con las condiciones naturales del suelo prístino); las características químicas de los contaminantes remanentes, su interacción con el suelo y por ende su biodisponibilidad podrían estar favoreciendo, a partir del día 20, el desarrollo de microorganismos con una estrategia de crecimiento de tipo lento (k), como lo son los miembros de este género. Podría hipotetizarse también, que los miembros de este género, y de otros géneros que proliferan en tiempos más avanzados de tratamiento, son capaces de degradar compuestos diferentes (quizás más complejos) que los que degradan microorganismos con una rápida tasa de crecimiento, o incluso degradar intermediarios resultantes del metabolismo de ellos.

Por otro lado, en relación al incremento del género *Rhodanobacter*, (partiendo del 2% hasta llegar a aproximadamente el 13% del total de las secuencias), miembros de este género han sido reportados como resistentes a condiciones exigentes de pH e incluso a la presencia de metales pesados, además de ser capaces de llevar a cabo un proceso de desnitrificación completo (Prakash y col., 2012). La capacidad de eliminar NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como N<sub>2</sub> debe ser tenida en cuenta en un proceso que suplementa N como estrategia de bioestimulación y de ahí la importancia de comprender la dinámica de este género. Otro de los géneros que presenta un incipiente aumento hacia el final del ensayo es *Alcaligenes* sp. Este grupo también ha sido reportado como habitante de suelos contaminados con hidrocarburos (Sun y col., 2017) y con la capacidad metabólica de degradarlos. Sin embargo, el dato más llamativo es el incremento de éste género en suelos que han sido tratados mediante el agregado de nutrientes (Viñas y col., 2005), indicando que sus miembros adquieren un rol activo en la degradación de los compuestos que resultan recalcitrantes a los géneros dominantes previos.

Es importante destacar la estabilidad demostrada en la comunidad bacteriana del sistema CC. Por un lado, permite visualizar la estructura de la comunidad y la dinámica bacteriana del suelo estudiado en condiciones “no perturbadas”, es decir, sin el agregado de sales. Por otro lado, la estabilidad de los amplicones obtenidos en el sistema CC a lo largo del tiempo garantiza que la

metodología utilizada para la extracción de ADN y generación de la biblioteca de amplicones es robusta y correcta, validando los resultados obtenidos en este capítulo. En estos suelos contaminados de forma crónica en Base Carlini *Sphingomonas* y *Pseudomonas* fueron los géneros bacterianos más abundantes durante los 40 días del ensayo (Figuras 6.7 y 6.8). Ambos grupos son conocidos por su capacidad de utilización de hidrocarburos derivados del petróleo como fuente de carbono y energía (Leys y col., 2004; Sørensen y Nybroe, 2004) y su dominancia en estos suelos podría ser indicadora del carácter crónico de la contaminación de los mismos.

Los tres índices indicadores de diversidad calculados a partir de las secuencias permiten alcanzar las mismas conclusiones. El impacto de un contaminante sobre una matriz habitualmente genera una reducción en su diversidad (Mukherjee y col., 2014; Xie y col., 2016), ya que resulta en una presión de selección que favorece a aquellos microorganismos con capacidad para tolerar y/o degradar dicho contaminante, en desmedro de aquellos que no poseen esa capacidad. En este caso, adicionalmente, el agregado de sales de N y P llevado a cabo para la bioestimulación también parece haber generado un impacto sobre la flora del suelo como se mencionó previamente, ya que los índices de diversidad del sistema BS parten de un valor menor al del sistema CC ya desde el inicio del experimento. Esa diferencia en la diversidad se mantiene a lo largo de todo el ensayo, siendo siempre menor para el sistema bioestimulado. Este efecto podría indicar que sólo una porción de la flora habitante del suelo es capaz de aprovechar el agregado de los nutrientes para degradar los hidrocarburos, y dicha porción es seleccionada positivamente por sobre otras sin esa capacidad catabólica. Hacia el día 20 del ensayo, hay un drástico descenso en los indicadores de diversidad en el sistema BS, coincidente con el marcado aumento de la proporción de *Rhodococcus* y *Rhodanobacter*. Todos estos efectos sobre la comunidad se confirmaron, a su vez, con el análisis del dendrograma de las muestras de acuerdo a su similitud, en cual se evidencian claramente dos grupos principales: por un lado, las muestras pertenecientes a los controles a lo largo de todo el ensayo, junto a los tiempos iniciales (0 y 10) del sistema bioestimulado; y por otro, los tiempos finales de dicho sistema (20, 30 y 40). El drástico descenso mencionado previamente en los indicadores de diversidad coincide pues con el inicio de una nueva rama en el árbol de diversidad sugiriendo un cambio marcado de abundancias en la comunidad bacteriana del sistema BS a partir de ese tiempo. Ese cambio de dominancia no solo reduce la diversidad del sistema, sino que además empieza a generar una diferenciación más profunda respecto de los tiempos anteriores así como también del sistema CC. Puede observarse a su vez que esa diferenciación alcanza su máximo a tiempo final (BS 40), luego de una progresión constante en el tiempo, en la cual, mientras más tiempo transcurría del experimento, más se diferenciaban las comunidades de las biopilas entre sí. La comunidad presente en BS 40 resulta ser por lo tanto la más distintiva de todos los tiempos evaluados, al igual que reportara Vazquez y col. (2009) trabajando en sistemas similares sobre suelos

antárticos. Estos datos permiten concluir que la bioestimulación llevada a cabo no solo incrementa los valores de remoción de hidrocarburos obtenidos por el mero balanceo de la relación C:N:P como se concluyera en el Capítulo 3, sino que acarrea además un cambio profundo en la estructura y jerarquías de dominancia de la comunidad bacteriana, generando una especialización de sus componentes hacia la degradación del contaminante. El entendimiento de dichos cambios representa un paso clave para asegurar esquemas de bioestimulación aún más eficientes.

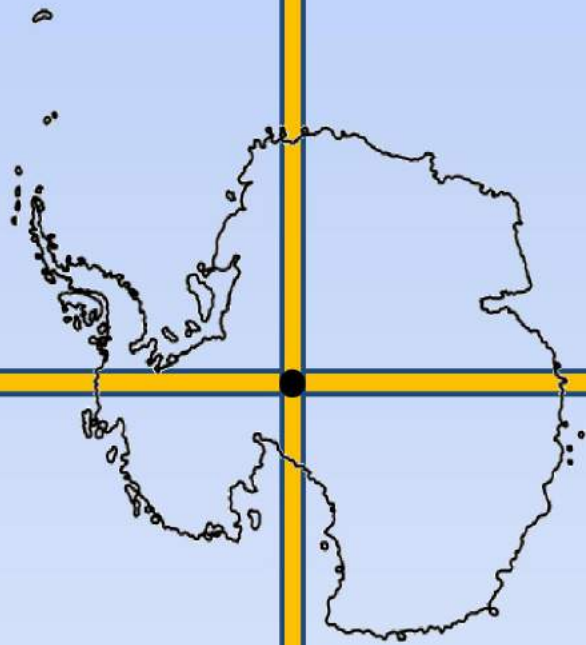
### 6.3. Conclusión

La búsqueda realizada en este capítulo se hallaba centrada en la obtención de cepas microbianas con capacidades metabólicas tales que las tornen en candidatos aptos para enfrentar una segunda etapa en el proceso de biorremediación desarrollado en los capítulos previos. La selección de cepas con buena producción de tensioactivos de índole biológico o con buena cinética y diversidad catabólica realizadas en este Capítulo, constituyen el primer paso en el desarrollo de la estrategia de bioaumento secuencial propuesta en este trabajo. En adelante, se necesitarán desarrollar más estudios en pos de definir la utilidad y eficiencia de los microorganismos elegidos en aumentar los niveles de remoción de hidrocarburos de suelos antárticos.

Por otro lado, el análisis de las secuencias de amplicones de 16S rARN realizado en la segunda parte de este Capítulo, permitió dilucidar, al menos parcialmente, la dinámica que sigue la estructura de la comunidad bacteriana a lo largo de un proceso de bioestimulación en biopilas como el realizado en el Capítulo 4. El comportamiento que siguieron los géneros *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Rhodanobacter* permitió identificar una típica estrategia del tipo r/k a lo largo de la remediación de los suelos. Además, se pudo identificar un claro efecto del agregado de las sales de N y P sobre la comunidad de los suelos, alterando su dinámica de manera casi inmediata. Por último, la comunidad microbiana del sistema control permaneció prácticamente inalterada a lo largo de todo el ensayo, sugiriendo que: i) el agregado de sales en forma de bioestimulación es el principal conductor de los cambios encontrados en las comunidades del suelo a lo largo del tratamiento; y ii) la mera aireación del suelo no produce cambios sustanciales en su comunidad.



## 7. Resumen



“Escribir en forma breve toma mucho más tiempo que escribir largo y tendido”

*Carl Friedrich Gauss*

### 7.1. Resumen

Los enormes niveles de producción y consumo de combustibles derivados del petróleo a lo largo de todo el mundo generan indefectiblemente episodios de contaminación. La Antártida no se ve exenta de esta problemática, con numerosos eventos registrados a lo largo de los años en suelos, aguas y sedimentos de este continente, como consecuencia de las actividades de almacenamiento y transporte de combustible que allí se realizan para la generación de electricidad y el movimiento de vehículos. Para recuperar estos suelos de la contaminación se cuenta con numerosas técnicas, basadas en diferentes fundamentos. Entre ellas, la biorremediación resulta la más adecuada, al remover el contaminante en niveles elevados, de forma amigable con el medio ambiente, a un costo considerablemente bajo, y sobre todo, sin un requerimiento significativo de infraestructura y logística, característica clave para el desarrollo de estos tratamientos en el continente antártico.

Particularmente para los suelos de este continente, la biorremediación es llevada a cabo principalmente por microorganismos. Dada la legislación que rige sobre la Antártida, dichos microorganismos deben ser autóctonos, lo que junto con las estrictas condiciones ambientales obliga al desarrollo de procesos de biorremediación con microorganismos sicrófilos o sicrotolerantes. El desafío consta, por ende, en alcanzar una alta eficiencia de remoción *on-site* que permita la recuperación de la matriz contaminada, a partir de la utilización de dichos microorganismos. Este desarrollo presentaría la ventaja de no requerir costosos procesos de calefacción ni de traslado del suelo.

El objetivo de este trabajo de tesis fue el desarrollo de procesos eficientes de recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos, mediante una optimización previa de las variables clave del proceso de bioestimulación, y el posterior escalado del proceso a campo en condiciones operativas reales en una base antártica argentina. La optimización comprendió hallar la relación C:N:P que maximizara la remoción de los hidrocarburos por parte de la flora microbiana habitante del suelo, utilizando la metodología estadístico-matemática de Superficie de Respuesta a escala laboratorio.

Una vez obtenida esta relación que optimizó la remoción, se evaluó el desempeño de la estrategia a campo, bajo condiciones operativas y ambientales reales y a escalas mayores.. Para ello, se conformaron biopilas *in-situ* en una base antártica argentina durante los meses de verano 2013/2014. El diseño de las biopilas fue en forma de pirámide truncada debido a su buena relación superficie/volumen. En ellas, el suelo se dispuso sobre geomembranas de alta densidad, inertes frente a hidrocarburos y que evitan el lixiviado o diseminación del contaminante. El diseño probó ser adecuado para el tratamiento *on-site* de los suelos, así como

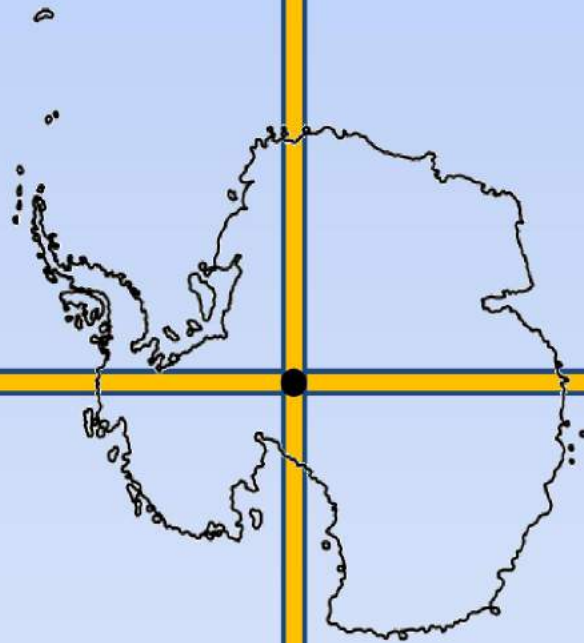
también lo fue la relación C:N:P optimizada, alcanzándose niveles de remoción del contaminante superiores al 75% en apenas 40 días de tratamiento.

A fin de evaluar la reproducibilidad de este desarrollo, el diseño fue replicado al año siguiente, durante el verano 2014/2015. Además de analizar el desempeño del nuevo tratamiento, se evaluó la influencia de distintas variables sobre la eficiencia del mismo, sobre todo de factores como la temperatura ambiente, la temperatura de las biopilas y del suelo, las horas de sol, la concentración inicial del contaminante y la conductividad, entre otras. Estas variables, a diferencia de lo que ocurre en el laboratorio, donde la posibilidad de control es mucho mayor, frecuentemente no son controlables en los ensayos a campo. Este estudio permitió dilucidar no sólo el rol que las variables ambientales y fisicoquímicas tienen en los ensayos de biorremediación a campo en la Antártida, sino también su influencia sobre los aspectos biológicos del proceso. En ese sentido, las temperaturas alcanzadas dentro de las biopilas (vinculadas fuertemente a las horas de sol totales recibidas) resultaron clave en los valores de eficiencias alcanzadas. Además, si bien el nivel inicial de contaminación del suelo mostró influir sobre la eficiencia del proceso, esta variable no puede ser controlada en el desarrollo elegido, pero bien puede conocerse de antemano el desempeño que dichos niveles puedan tener a lo largo de distintos niveles de contaminación. Esta comprensión permitirá planear y diseñar los tratamientos *on-site* con mayor conocimiento de la situación, buscando maximizar su eficiencia.

Adicionalmente, el estudio de los géneros microbianos habitantes de estos suelos, así como el conocimiento de sus capacidades catabólicas puede contribuir enormemente al desarrollo de esquemas mixtos y/o secuenciales de biorremediación. Por un lado, conocer las dinámicas de las comunidades bacterianas en los suelos tratados permite dilucidar y comprender el rol que cada género o grupo bacteriano cumple en cada uno de los estadios del tratamiento. Este estudio permitió entender que las alternancias en la comunidad bacteriana entre estrategias r (como *Pseudomonas* sp.) y estrategias k (*Rhodococcus* sp.) resultaron ser los principales cambios que sufre la comunidad a lo largo de un proceso de biorremediación. Estos cambios se deberían por ende a una degradación diferencial de los hidrocarburos a manos de cada uno de esos grupos. Por otro lado, el aprovechamiento de cepas con capacidad de producción de biosurfactantes o aquellas con una alta velocidad de crecimiento y amplias capacidades catabólicas, puede considerarse de un gran interés para complementar la bioestimulación previamente ensayada. El bioaumento secuencial (posterior a la bioestimulación) realizado con cepas con estas capacidades presenta el potencial de poder aumentar la eficiencia de remoción total del tratamiento, al verse favorecida la degradación de aquellos compuestos que resultaron recalcitrantes en la primera etapa de bioestimulación. Las cepas de *Pseudomonas* sp. y *Penicillium* sp. aisladas, identificadas y caracterizadas en este trabajo de tesis presentan dicho potencial.

Los resultados, herramientas biológicas y conclusiones obtenidos de este trabajo de tesis permiten afrontar exitosamente el tratamiento de suelos antárticos contaminados (y de regiones frías en general a lo largo de todo el mundo) en procesos *on-site* en Antártida, haciendo innecesario el transporte de los mismos fuera del área antártica para su tratamiento, reduciendo el costo de su tratamiento y, por ende, aumentando su factibilidad.

## 8. Conclusiones generales



“La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más comunicable”

*Leonardo Da Vinci*

### 8.1. Conclusiones generales

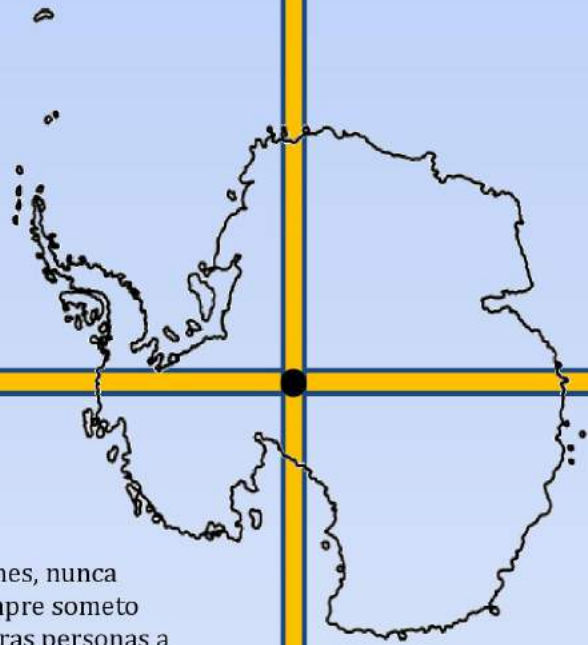
Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis y el análisis realizado sobre ellos permiten concluir que:

- Es posible realizar procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos *on-site* en el continente antártico bajo condiciones climáticas adversas. Estos procesos son factibles debido al aprovechamiento del potencial catabólico de microorganismos psicrotolerantes. En estas condiciones puede alcanzarse una eficiencia de remoción de hidrocarburos de al menos 80%, en tiempos acordes con el corto período estival antártico.
- La optimización a escala laboratorio de la relación C:N:P asociada a una estrategia de bioestimulación, aumenta considerablemente la eficiencia del proceso y es indispensable para lograr altos niveles de remoción. Adicionalmente, el uso de la herramienta estadística de la Superficie de Respuesta permitió obtener dicha relación óptima involucrando un número reducido de unidades experimentales y obteniendo una muy buena robustez estadística.
- El uso de geomembranas de alta densidad para conformar biopilas, resultó en una estrategia apropiada para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos *on-site*. El diseño elegido proveyó no sólo de aislamiento del suelo circundante, evitando lixiviados y proporcionando una buena relación superficie/volumen, sino que además generó un efecto de protección térmica sobre el suelo tratado que favoreció la biodegradación de los hidrocarburos por parte de la microflora habitante del suelo. De esta forma, se alcanzaron valores de remoción superiores al 75% en apenas 40 días de tratamiento.
- La repetición del ensayo al año siguiente, permitió evaluar la reproducibilidad del método, e identificar aquellas variables (ya sea ambientales, fisicoquímicas o biológicas) que afectan de forma más significativa la eficiencia de remoción de hidrocarburos en los ensayos a campo realizados. En ese sentido, tras la obtención de valores de remoción moderadamente menores durante la repetición de dicho ensayo, se arribó a la conclusión de que los factores que parecen tener mayor efecto sobre dicha eficiencia de remoción incluyen: i) la temperatura del suelo dentro de la biopila (variable asociada a la temperatura del suelo y las horas de sol totales); ii) los valores de recuentos de bacterias totales y degradadoras alcanzadas en el suelo, así como también la actividad biológica de los suelos

tratados (ambas variables están estrechamente vinculadas) y; iii) la concentración inicial del contaminante, afectando la linealidad de la relación optimizada C:N:P.

- Durante el desarrollo del tratamiento en biopilas, miembros del género *Pseudomonas* llevarían a cabo un primer estadio de biodegradación, para luego ceder su dominancia a los géneros *Rhodococcus* y *Rhodanobacter* que llevan a cabo una segunda etapa de remoción del contaminante. Este tipo de comportamiento parece seguir la dinámica típica de estrategias r/k. Parte del contaminante es degradado por aquellos individuos con tasa de crecimiento rápido, para luego disminuir su número en favor de los estrategias de crecimiento más lento, que catabolizan los metabolitos resultantes de aquella primera instancia de degradación, o aquellos compuestos que los primeros no pudieron degradar por no poseer la maquinaria enzimática necesaria.
- Los suelos antárticos han probado poseer una enorme diversidad de microorganismos con capacidades metabólicas muy variadas. En ese sentido, la búsqueda orientada hacia la complementación de la estrategia de bioestimulación, permitió la elección de dos cepas (una bacteria y un hongo) con capacidades metabólicas de interés al considerar la realización de un bioaumentación secuencial. El screening realizado como parte de este trabajo de tesis resultó en la selección de una cepa productora de biosurfactantes (*Pseudomonas brenerii*) y otra con una buena cinética y diversidad catabólica (*Penicillium glabrum*). Sin embargo, debido a los altos niveles de remoción obtenidos durante la primera etapa, las grandes cantidades de suelo a tratar, la escasez de infraestructura apropiada para su realización, y el alto costo que este desarrollo implicaría, deberán realizarse más estudios a fin de definir si una segunda etapa secuencial por bioaumentación como la propuesta en los objetivos de esta tesis resulta factible y viable. Esos estudios deberían también evaluar esa factibilidad tanto frente a suelos con contaminación crónica como aguda.
- El desarrollo optimizado resultante de este trabajo permite la aplicación de esta estrategia de biorremediación en escalas operativas reales no sólo en bases antárticas, sino en regiones de clima frío a lo largo de todo el mundo, resultando en una herramienta probadamente eficiente, amigable con el medio ambiente, de bajo costo y con escasos requerimientos logísticos.

## 9. Bibliografía



“Yo siempre desconfío de mis conclusiones, nunca creo seriamente en lo que pienso, y siempre someto mi punto de vista al punto de vista de otras personas a las que considero más calificadas que yo, para verificar si la posición que asumo frente a algo en particular es cierta o no”

*Marcelo Bielsa*



- Adam G y 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.
- Agarry SE, Owabor CN, Yusuf RO (2012) Enhanced Bioremediation of Soil Artificially Contaminated with Kerosene: Optimization of Biostimulation Agents through Statistical Experimental Design. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*, 3:120. doi:10.4172/2157-7463.1000120
- Ahn JH, Kim MS, Kim MC, Lim JS, Lee GT (2006) Analysis of bacterial diversity and community structure in forest soils contaminated with fuel hydrocarbons. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16:704.
- Aislabe J, Foght J, Saul D (2000) Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from oil near Scott Base, Antarctica. *Polar Biology*, 23:183-188.
- Aislabe J, Balks MR, Foght JM, Waterhouse EJ (2004) Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and management. *Environmental Science and Technology*, 38(5):1265-74.
- Aislabe J, Saul D, Foght JM (2006) Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles*, 10:171-9. doi:10.1007/s00792-005-0498-4.
- Alexander M (2000) Ageing, bioavailability and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science and Technology*, 34:4259-4265. <http://dx.doi.org/10.1021/es001069+>.
- Almeida Bezerra M, Santelli RE, Oliveira PE, Villar LS, Escalera LA (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76:965-977. doi:10.1016/j.talanta.2008.05.019
- Ancasi EG, Carrillo L, Benitez Ahrendts MR (2006) Moulds and yeasts in bottled water and soft drinks. *Revista Argentina de Microbiología*, 38:93-96.
- Andreolli M, Albertarelli N, Lampis S, Brignoli P, Khoei NS, Vallini G (2016) Bioremediation of diesel contamination at an underground storage tank site: a spatial analysis of the microbial community. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32(6). <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1967-2>
- ASTM Method D7066-04 (2011) Standard Test Method for dimer/trimer of chlorotrifluoroethylene (S-316) Recoverable Oil and Grease and Nonpolar Material by Infrared Determination. PA, USA.
- ATCM 1964, Reino Unido. Draft recommendation on oil pollution. WP05, III ATCM.
- ATCM 2008, Chile. Background to the pollution incident caused by the sinking of the MS Explorer. IP11, XXXI ATCM, CEP XI.
- Bagi A, Pampanin DM, Lanzén A, Bilstad T, Kommedal R (2014) Naphthalene biodegradation in temperate and arctic marine microcosms. *Biodegradation*, 25(1):111-25. doi: 10.1007/s10532-013-9644-3
- Balba MT, Al-Daher R, Al-Awadhi N, Chino H, Tsuji H (1998) Bioremediation of oil contaminated desert soil: the Kuwaiti experience. *Environment International*, 24:163-173.
- Banat IM, Rahman KSM, Thahira-Rahman J (2002) Bioremediation of hydrocarbon pollution using biosurfactant producing oil degrading bacteria. In: *Oil and hydrocarbon spills III*; Brebbia CA, editor
- Bardi L, Mattei A, Steffan S, Marzona M (2000) Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with b-cyclodextrine as surfactant to enhance bioavailability. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 709-713.
- Bento FM, Camargo FAO, Okeke BC, Frankenberger WT (2005) Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology* 96:1049-1055.
- Beskoski V, Gojic-Cvijovic G, Milic J, Ilic M, Miletic S, Solevic T, Vrvic M (2011) Ex situ bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) – A field experiment. *Chemosphere*, 83:34-40.
- Bhatnagar S y Kumari R (2013) Bioremediation: A sustainable tool for environmental management – A review. *Annual Review & Research in Biology*, 3(4):974-993
- Biswas D, Dutta S, Saha R (2006) Effect of *Pseudomonas sp.* on diesel and other petroleum fractions. *Journal of the Indian Chemical Society*, 83:1185.
- Bockheim JG (1982) Properties of a chronosequence of ultraxerous soils in the Transantarctic Mountains. *Geoderma*, 28:239-255
- Bodour AA, Drees KP, Maioer RM (2003) Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid Southwestern soils. *Applied Environmental Microbiology*, 69 (6):3280-3287.

- Bouchez T, Patureau D, Dabert P, Juretschko S, Dore' J, Delgene's P, Moletta R, Wagner M (2000a) Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environmental Microbiology*, 2:179–190.
- Bouchez T, Patureau D, Dabert P, Wagner M, Delgene's JP, Moletta R (2000b) Successful and unsuccessful bioaugmentation experiments monitored by fluorescent in situ hybridization. *Water Science and Technology*, 41:61–68.
- Box GEP y Wilson KB (1951) On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistic Society Series B*, 13:1.
- Boyd D (1976) Normal freezing and thawing degree-days from normal monthly temperatures. *Canadian Geotechnical Journal*, 13:176-180.
- Bragg JR, Prince RC, Harner EJ, and Atlas RM (1994) Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature*, 368:413–418.
- Brakstad OG, Booth AM, Faksness LG, Aislabie J, (2009) Microbial degradation of petroleum compounds in cold marine water and ice. In: Bej, AK, Atlas, RM (Eds.), *Polar microbiology: the ecology, biodiversity and bioremediation potential of microorganisms in extremely cold environments*. CRC Press, New York, 231–253.
- Bray RH y Kurtz LT (1945) Determination of total phosphorus in soils. *Soil Science* 53:39-45.
- Bronikowski A, Bennet A, Lenski R (2001) Evolutionary adaptation to temperature. VIII. Effects of temperature on growth rate in natural isolates of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* from different thermal environments. *Evolution* 55(1): 33-40.
- Brown KW, Donnelly KC and Deuel LE (1983) Effects of mineral nutrients, sludge application rate, and application frequency on biodegradation of two oily sludges. *Microbial Ecology*, 9:363-373.
- Brown LD, Cologgi DL, Gee KF, Ulrich AC (2016) Bioremediation of Oil Spills on Land, In: *Oil Spills Science and Technology*. Chapter 12, 700-724. Elsevier.
- Cai Z, Zhou QX, Peng SW, Li KN (2010) Promoted biodegradation and microbiological effects of petroleum hydrocarbons by *Impatiens balsamina* L. with strong endurance. *Journal of Hazardous Materials* 183(1-3):731-737.
- Cantwell SG, Lau EP, Watt DS, Fall RR (1978) Biodegradation of Acyclic Isoprenoids by *Pseudomonas* Species. *Journal of Bacteriology*, 135(2):324-333.
- Cébron A, Beguiristain T, Bongoua-Devisme J, Denonfoux J, Faure P, Lorgeoux C, Ouvrard S, Parisot N, Peyret P, Leyval C (2015) Impact of clay mineral, wood sawdust or root organic matter on the bacterial and fungal community structures in two aged PAH-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18):13724-13738.
- Almeida C, Eguereva E, Kehraus S, Siering C, König G (2010) Hydroxylated Sclerosporin Derivatives from the Marine-derived Fungus *Cadophora malorum*. *Journal of Natural Products*, 73(3): 476–478. doi:10.1021/np900608d.
- Chagas-Spinellia ACO, Katob MT, de Limac ES, Gavazzad S (2012) Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. *Journal of Environmental Management*. 113:510–516.
- Chang W, White L, Ghoshal S (2011) Comparison of the effects of variable site temperatures and constant incubation temperatures on the biodegradation of petroleum hydrocarbons in pilot-scale experiments with field-aged contaminated soils from a cold regions site. *Chemosphere*, 82:872-878.
- Chauhan M, Chauhan RS, Garlapati VK (2013) Modeling and Optimization Studies on a Novel Lipase Production by *Staphylococcus arlettae* through Submerged Fermentation. *Enzyme Research*. Article ID 353954, doi:10.1155/2013/353954.
- Cheng HH y Mulla DJ (1999) The soil environment. In: *Bioremediation of contaminated soils*. Adriano, D.C. et al. (Ed.) Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1-13.
- Chong CW, Annie Tan GY, Wong RCS, Riddle MJ, Tan IKP (2009) DGGE fingerprinting of bacteria in soils from eight ecologically different sites around Casey Station, Antarctica. *Polar Biology*, 32:853–860.
- Chong W, Dyen M, Spagnuolo L, Simon P, Whyte L, Ghoshal S (2010) Biodegradation of semi- and non-volatile petroleum hydrocarbons in aged, contaminated soils from a sub-Arctic site: laboratory pilot-scale experiments at site temperatures. *Chemosphere*, 80(3):319-326.
- Christner BC, Mosley-Thompson E, Thompson LG, Zagorodnov V, Sandman K, Reeve JN (2000) Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice. *Icarus* 144:479–485.

- Christner BC, Mosley-Thompson E, Thompson LG, Reeve JN (2001) Isolation of bacteria and 16S rDNAs from Lake Vostok accretion ice. *Environmental Microbiology*, 3:570–577.
- CIA, Agencia Central de Inteligencia (2006) Press Release: CIA World Factbook 2006.
- Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam SA, McGarrell DM, Tiedje JM (2005) The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 33 (Database Issue), D294–D296. <http://doi.org/10.1093/nar/gki038>
- CONCAWE (1985) Health Aspects of Petroleum Fuels. Potential Hazards and Precautions for Individual Classes of Fuels (Report No. 85/51), The Hague 23-29
- Coulon F y Delille D (2003) Effects of biostimulation on growth of indigenous bacteria in sub-Antarctic soil contaminated with oil hydrocarbons. *Oil Gas Science and Technology*, 58:469–479. <http://dx.doi.org/10.2516/ogst:2003030>.
- Coulon F, Pelletier E, St Louis R, Gourhant L, Delille D (2004) Degradation of petroleum hydrocarbons in two sub-antarctic soils: influence of an oleophilic fertilizer. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(8):1893-1901.
- Coulon F, Al Awadi M, Cowie W, Mardlin D, Pollard S, Cunningham C, Risdon G, Arthur P, Semple K, Paton G (2010) When is a soil remediated? Comparison of biopiled and windrowed soils contaminated with bunker-fuel in a full-scale trial. *Environmental Pollution*, 158(10):3032-3040.
- Curtis TP, Sloan WT, Scannell JW (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 99(16):10494-9.
- De Jesus H, Peixoto R, Cury J, van Elsas J, Rosado A (2015) Evaluation of soil bioremediation techniques in an aged diesel spill at the Antarctic Peninsula. *Environmental biotechnology*, 99:10815-10827. doi 10.1007/s00253-015-6919-0.
- Dean-Ross D, Moody JD, Freeman JP, Doerge DR, Cerniglia CE (2001) Metabolism of anthracene by a *Rhodococcus* species. *FEMS Microbial Letters*, 204(1):205-211.
- Delille D, Coulon F, Pelletier E (2004) Effects of temperature warming during a bioremediation study of natural and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-Antarctic soils. *Cold Regions Science and Technology*, 40:61–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coldregions.2004.05.005>.
- Delille D, Pelletier E, Coulon F (2007) The influence of temperature on bacterial assemblages during bioremediation of a diesel fuel contaminated sub-Antarctic soil. *Cold regions science and technology* 48:74-83.
- Delille D y Coulon F (2008) Comparative mesocosm study of biostimulation efficiency in two different oil-amended sub-antarctic soils. *Microbial Ecology*, 56(2):243-52
- Dias R, Ruberto L, Hernandez E, Vazquez S, Lo Balbo A, Del Panno MT, Mac Cormack WP (2012) Bioremediation of an aged diesel oil-contaminated Antarctic soil: Evaluation of the “on site” biostimulation strategy using different nutrient sources. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 75:96–103.
- Dias R, Ruberto L, Calabro A, Lo Balbo A, Del Panno MT, Mac Cormack WP (2014) Hydrocarbon removal and bacterial community structure in on-site biostimulated biopile systems designed for bioremediation of diesel-contaminated Antarctic soil. *Polar biology*, 38 (5):677-687
- Dibble JT y Bartha R (1979) Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and environmental microbiology*, 37 (4):729-739.
- Dong Y, Lang Z, Kong X, Lu D, Liu Z (2015) Kinetic and multidimensional profiling of accelerated degradation of oil sludge by biostimulation. *Environmental Science: Process and Impacts*, 17:763. <http://dx.doi.org/10.1039/c4em00428k>.
- Dott W, Feidieker D, Steiof M, Becker PM, Kampfer P (1995) Comparison of ex situ and in situ techniques for bioremediation of hydrocarbon-polluted soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 35:301-316.
- El Fantroussi S y Agathos S (2005) Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology*, 8:268–275.
- Energy Information Administration - EIA - Official Energy Statistics from the U.S. Government.

- EPA (1994) Chapter IV Biopiles. *EPA Methods IV-10*. Environmental Protection Agency, Washington DC, USA.
- EPA (1994) Chapter V Landfarming, pp V1-V23. *EPA Methods*. Environmental Protection Agency, Washington DC, USA.
- EPA (1998) An Analysis of Composting As an Environmental Remediation Technology.
- EPA (2004) Enhanced aerobic bioremediation contents, Chapter XII. *EPA Methods*. Environmental Protection Agency, Washington DC, USA.
- EPA, Toxic Substances Control Act (TSCA). Chemical Substance Inventory.
- Evy A, Lakshmi V, Nilanjana D (2012) Biodegradation of atrazine by *Cryptococcus laurentii* isolated from contaminated agricultural soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 2:450-457.
- Ferguson S, Franzmann P, Revill A, Snape I, Rayner J (2003) The effects of nitrogen and water on mineralisation of hydrocarbons in diesel-contaminated terrestrial Antarctic soils. *Cold Regions Science and Technology*, 37:197-212. doi:10.1016/S0165-232X(03)00041-7.
- Ferguson S, Powell S, Snape I, Gibson J, Franzmann P (2008) Effect of temperature on the microbial ecology of a hydrocarbon-contaminated Antarctic soil: Implications for high temperature remediation. *Cold Regions Science and Technology*, 53:115-129. doi:10.1016/j.coldregions.2007.04.006
- Fernandez Melcon C, Piñeiro Barcia M. Superficie de respuesta: Métodos y Diseños. <https://es.scribd.com/document/228795306/Superficie-de-Respuesta>.
- Filler D, Lindstrom J, Braddock J, Johnson R, Nickalaski R (2001) Integral biopile components for successful bioremediation in the Arctic. *Cold Regions Science and Technology*, 32:143-156.
- Forsyth JV, Tsao YM, Bleam RD (1995) Bioremediation: when is bioaugmentation needed? R.E. Hinchee, J. Fredrickson, B.C. Alleman (Eds.) In: *Bioaugmentation for Site Remediation*, Columbus Battele Press. 1-14
- Franzmann PD (1996) Examination of Antarctic prokaryotic diversity through molecular comparisons. *Biodiversity and Conservation*, 5:1295-1305.
- Garneau MÈ, Michel C, Meisterhans G, Fortin N, King TL, Greer CW, Lee K (2016) Hydrocarbon biodegradation by Arctic sea-ice and sub-ice microbial communities during microcosm experiments, Northwest Passage (Nunavut, Canada). *FEMS Microbiology Ecology*, 92(10):fiw 130. doi: 10.1093/femsec/fiw130
- Gee GW y Bauder JW (1986) Particle-size analysis in: Klute, A. (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 1*, second ed. *Physical and Mineralogical Methods American Society of Agronomy/Soil Science Society of America*, Madison, WI, pp. 383-411. Agronomy Monograph No. 9.
- Genovese M, Denaro R, Cappello S, Di Marco G, La Spada G, Giuliano L, Genovese L, Yakimov MM (2008) Bioremediation of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes-contaminated soil: a biopile pilot experiment. *Journal of Applied Microbiology* 105:1694-1702.
- Gentry TJ, Rensing C, Pepper IL (2004) New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 34: 447-494.
- Goldstein RM, Mallory LM, Alexander M (1985) Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Applied Environmental Microbiology*, 5:977-983.
- Gomez F y Sartaj M (2013) Field scale ex-situ bioremediation of petroleum contaminated soil under cold climate conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 85:375-382. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.08.003>
- Gomez F y Sartaj M (2014) Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 89:103-109. <http://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.010>
- Greer CW (2009) Bioremediation of contaminated sites in the Canadian Arctic: monitoring performance and the effects of biostimulation using molecular methods. In: Bej, A.K., Aislabie, J., Atlas, R.M. (Eds.), *Polar Microbiology: The Ecology, Biodiversity and Bioremediation Potential of Microorganisms in Extremely Cold Environment*. CRC Press, Boca Raton, Florida.

- Guglielmin M, Evans CJE, Cannone N (2008) Active layer thermal regime under different vegetation conditions in permafrost areas. A case study at Signy Island (Maritime Antarctica). *Geoderma*, 144:73-85.
- Harayama S, Kasai Y, and Hara A (2004) Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current Opinion in Biotechnology*, 15:205-214.
- Harvey AN, Snape I, Siciliano SD (2011) Validating potential toxicity assays to assess petroleum hydrocarbon toxicity in polar soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31 (2):402-407.
- Hashim NHF, Bharudin I, Nguong DLS, Higa S, Bakar FDA, Nathan S, Rabu A, Kawahara H, Illias RM, Najimudin N, Mahadi NM, Murad AMA (2013) Characterization of Afp1, an antifreeze protein from the psychrophilic yeast *Glaciozyma Antarctica* PI12. *Extremophiles*, 17:63-73.
- Head IM, Jones DM, and Roling WF (2006) Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews in Microbiology* 4:173-182.
- Horner-Devine MC, Carney KM, Bohannon BJM (2004) An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 271:113-122. doi 10.1098/rspb.2003.2549
- Huang Y, Wei Z, Danzeng W, Kim M, Zhu G, Zhang Y, Liu Z, Peng F (2017) *Sphingomonas antarctica* sp. nov., isolated from Antarctic tundra soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67: 4064-4068, doi: 10.1099/ijsem.0.002253.
- Hughes KA, Bridge P, Clark MS (2007) Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Science of The Total Environment*, 372(2-3):539-548.
- Huygens D, Boeckx P, Templer P, Paulino P, Van Cleemput O, Oyarzún C, Müller C, Godoy R (2008) Mechanisms for retention of bioavailable nitrogen in volcanic rainforest soils. *Nature Geoscience*, 1:543 -548.
- Inoue Y y Katayama A (2011) Two-scale evaluation of remediation technologies for a contaminated site by applying economic input-output life cycle assessment: Risk-cost, risk-energy consumption and risk-CO<sub>2</sub>emission. *Journal of Hazardous Materials*, 192:1234-1242.
- Instituto Argentino del Petróleo y el Gas. <http://www.iapg.org.ar/estadisticasnew/index.htm>
- Islam MZ y Rowe RK (2009) Permeation of BTEX through unaged and aged HDPE geomembranes. *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental engineering*, 135 (8):1130e1140
- IUSS Working Group WRB (2007) World reference base for soil resources. *World soil resources reports* n° 103. FAO, Rome
- Jensen HI (1916) Report on Antarctic soils. *Reports of Science Investigations of the British Antarctic Expedition 1907-1909*. Part IV. Geology 2:89-92
- Joye SB, Kleindienst S, Gilbert JA, Handley KM, Weisenhorn P, Overholt WA, Kostka JE (2016) Responses of microbial communities to hydrocarbon exposures. *Oceanography* 29(3):136-149, <http://dx.doi.org/10.5670/oceanog.2016.78>.
- Kauppi S, Sinkkonen A, Romantschuk M (2011) Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: comparison of biostimulation and bioaugmentation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65:359-368
- Kim J, Lee AH, Chang W (2018) Enhanced bioremediation of nutrient-amended, petroleum hydrocarbon-contaminated soils over a cold-climate winter: The rate and extent of hydrocarbon biodegradation and microbial response in a pilot-scale biopile subjected to natural seasonal freeze-thaw temperatures. *Science of the Total Environment*, 612:903-913.
- Kuehl RO (2001) Diseños con superficie de respuesta in: *Diseño de experimentos*. International Thompson editors. Mexico 423-467.
- Kurtzman y Robnett (1997) Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(5):1216-1223.
- Leahy JG y Colwell RR (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 54(3):305-315.
- Leake JR (2004) Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4):422-8.

- Lee M, Kim MK, Singleton I, Goodfellow M, Lee ST (2006) Enhanced biodegradation of diesel oil by a newly identified *Rhodococcus baikonurensis* EN3 in the presence of mycolic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 100 (2):325-333.
- Leys NM, Ryngaert A, Bastiaens L, Verstraete W, Top E, Springael D (2004) Occurrence and Phylogenetic Diversity of Sphingomonas Strains in Soils Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied Environmental Microbiology*, 70(4):1944-1955.
- Li AZ, Lin LZ, Zhang MX, Zhu HH (2017) *Arenibacter antarcticus* sp. nov., isolated from marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67:4601-4605, doi: 10.1099/ijsem.0.002340
- Li L, Cunningham CJ, Pas V, Philp JC, Barry DA, Anderson P (2011) Field trial of a new aeration system for enhancing biodegradation in a biopile. *Chemosphere*, 24:124-137. doi:10.1016/j.wasman.2003.06.001
- Li X, Wang X, Ren Z, Zhang Y, Li N, Zhou Q (2015) Sand amendment enhances bioelectrochemical remediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Chemosphere*, 141:62-70.
- Lim CK, Bay HH, Aris A, Abdul Majid Z, Ibrahim Z (2013) Biosorption and biodegradation of Acid Orange 7 by *Enterococcus faecalis* strain ZL: optimization by response surface methodological approach. *Environmental Science Pollution Research International* 20(7):5056-5066. doi: 10.1007/s11356-013-1476-5.
- Lim MW, Lau EV, Poh PE (2016) A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil — Present works and future directions. *Marine Pollution Bulletin*, 109:14-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.023>
- Lima-Morales D, Jáuregui R, Camarinha-Silva A, Geffers R, Pieper DH, Vilchez-Vargas R (2016) Linking Microbial Community and Catabolic Gene Structures during the Adaptation of Three Contaminated Soils under Continuous Long-Term Pollutant Stress. *Applied Environmental Microbiology* 82(7):2227-2237. doi: 10.1128/AEM.03482-15.
- Liu P, Tsung CC, Liang-Ming W, Chun-Hsuan K, Po-Tseng P, Sheng-Shung C (2011) Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65:1119-1127.
- Liu P, Wang S, Huang S, Wang M (2012) Effects of soil organic matter and ageing on remediation of diesel-contaminated soil. *Journal of Environmental Technology* 33(23):2661-2672. <http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2012.673017>
- Lott TJ, Kuykendall RJ, Reiss E (1993) Nucleotide sequence analysis of the 5.8S rDNA and adjacent ITS2 region of *Candida albicans* and related species. *Yeast*, 9(11):1119-1206.
- Mac Cormack WP y Fraile ER (1997) Characterization of a hydrocarbon degrading psychrotrophic Antarctic bacterium. *Antarctic Science*, 9(2):150-155.
- Mac Cormack WP y Ruberto LAM (2003) Eliminación de hidrocarburos en la Antártida. *Ciencia Hoy*, 13(77):40-47
- Maeda R, Nagashima H, Widada J, Iwata K, Omori T (2009) Novel marine carbazole-degrading bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 292(2):203-209. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01497.x>
- Magnuson JJ, Crowder LB, Medvick PA (1979) Temperature as an Ecological Resource. *American Zoology* 19(1):331-343 doi:10.1093/ich/19.1.331.
- Makkar RS y Rockne KJ (2003) Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology Chemistry*, 22(10):2280-2292.
- Margesin R, Gander S, Zacke G, Gounot AM, Schinner F (2003) Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts. *Extremophiles*, 7(6):451-458.
- Margesin R, Moertelmaier C, Mair J (2013) Low-temperature biodegradation of petroleum hydrocarbons (n-alkanes, phenol, anthracene, pyrene) by four actinobacterial strains. *International Biodegradation and Biodeterioration*, 84:185-191.
- Martínez Álvarez LM, Lo Balbo A, Mac Cormack WP, Ruberto LAM (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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coldregions.2015.07.005>
- Martínez Álvarez LM, Ruberto LAM, Lo Balbo A, Mac Cormack WP (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
- Mason RL (2003) *Statistical design and analysis of experiments*, Chapter 17, 2<sup>nd</sup> Ed, John Wiley and Sons, Inc.
- McCraw JD (1960) Soils of the Ross Dependency, Antarctica. A preliminary note. *New Zealand Society of Soil Science and Processes* 4:30-35.
- McCraw JD (1967) Soils of Taylor Dry Valley, Victoria Land, Antarctica, with notes on soils from other localities in Victoria Land. *New Zealand Journal of Geology and Geophysics*, 10:498-539
- McWatters R, Wilkins D, Spedding T, Hince G, Raymond B, Lagerewskij G, Terry D, Wise L, Snape I (2016) On site remediation of a fuel spill and soil reuse in Antarctica. *Science of The Total Environment*, 571:963-973. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.084>
- Mikan CJ, Schimel JP, Doyle AP (2002) Temperature controls of microbial respiration in arctic tundra soils above and below freezing. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:1785-1795. [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00168-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00168-2).
- Mohajeri L, Aziz HA, Zahed MA, Mohajeri S, Kutty SRM, Isa MH (2011) Response surface analysis and modeling of n-alkanes removal through bioremediation of weathered crude oil. *Water Science and Technology* 64(3):618-626.
- Mohammed N, Allayla RI, Nakhla GF, Farooq S, Husain T (1996) State-of-the-art review of bioremediation studies. *Journal of Environmental Science and Health*, A31:1547.
- Mohn WW, Radziminski CZ, Fortin MC, Reimer KJ (2001) On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57:242-247.
- Montgomery D (2008) *Design and analysis of experiments*. Chapter 10-11, 7<sup>th</sup> Ed, John Wiley and Sons, Inc.
- Morgan P y Watkinson RJ (1989) Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. *CRC Critical reviews in Biotechnology*, 8(4):305-333.
- Mrozik A y Piotrowska-Seget Z (2010) Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, 165:363-375.
- Mukherjee S, Juottonen H, Siivonen P, Quesada C, Tuomi P, Pulkkinen P, Yrjälä K (2014) Spatial patterns of microbial diversity and activity in an aged creosote-contaminated site. *The ISME Journal*, 8:2131-2142. doi:10.1038/ismej.2014.151
- Mumford KA, Rayner JL, Snape I, Starck SC, Stevens GW, Gore DB (2013) Design, installation and preliminary testing of a permeable reactive barrier for diesel fuel remediation at Casey Station, Antarctica. *Cold Regions Science and Technology*, 96:96-107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coldregions.2013.06.002>
- Nevarez L, Vasseur V, Le Madec A, Le Bras MA, Coroller L, Leguerinel I, Barbier G (2009) Physiological traits of *Penicillium glabrum* strain LCP 08.5568, a filamentous fungus isolated from bottled aromatised mineral water. *International Journal of Food Microbiology*, 130(3):166-171.
- Nowicka D, Ginter-Kramarczyk D, Holderna-Odachoska A, Budnik I, Kaczorek E, Lukaszewski Z (2013) Biodegradation of oxyethylated fatty alcohols by bacteria *Microbacterium* strain E19. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91:32-38
- Okere UV, Cabrerizo A, Dachs J, Jones KC, Semple KT (2012) Biodegradation of phenanthrene by indigenous microorganisms in soils from Livingstone Island, Antarctica. *FEMS Microbiology Letters*, 329(1):69-77. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02501.x
- Pantucek R, Sedlacek I, Indrakova A, Vrbovska V, Maslanova I, Kovarovic V, Svec P, Kralova S, Kristofova L, Keklakova J, Petras P, Doskar J (2017) *Staphylococcus edaphicus* sp. nov., isolated in Antarctica, harbours *mecC* gene and genomic islands with suspected role in adaptation to extreme environment. *Applied Environmental Microbiology*. En prensa. doi: 10.1128/AEM.01746-17

- Pepper IL y Gerba CP (2015) *Cultural methods In Environmental Microbiology*, Chapter 10:195-212 Academic Press, San Diego.
- Pikuta EV, Lyu Z, Hoover RB, Liu Y, Patel N, Busse H, Lawson P (2017) *Williamwhitmania taraxaci* gen. nov., sp. nov., a proteolytic anaerobe with a novel type of cytology from Lake Untersee in Antarctica, description of *Williamwhitmaniaceae* fam. nov., and emendation of the order *Bacteroidales* Krieg 2012. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67:4132-4145, doi: 10.1099/ijsem.0.002266
- Pitt JI y Hocking AD (1997) *En: Fungi and Food Spoilage*. (Second ed.), Blackie Academic and Professional.
- Pond KL, Huang YS, Wang Y, Kulpa CF (2002) Hydrogen isotopic composition of individual *n*-alkanes as an intrinsic tracer for bioremediation and source identification of petroleum contamination. *Environmental Science and Technology*, 36(4):724-728.
- Prakash O, Green SJ, Jasrotia P, Overholt WA, Canion A, Watson DB, Brooks SC, Kotska JE (2012) *Rhodanobacter denitrificans* sp. nov., isolated from nitrate-rich zones of a contaminated aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62:2457-2462.
- Public Law 96-510, 96th US Congress. Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act.
- R Core Team (2014) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>
- Raymond T, King CK, Raymond B, Stark JS, Snape I (2017) Oil pollution in Antarctica, In: *Oil Spill Science and Technology*. Chapter 14:759-793. Elsevier.
- Redfield SC, Ketchum BH and Richards FA (1963) in *The Sea* (ed. Hill, M. N.) 26-77 Wiley New York.
- Rojas-Avelizapa N, Roldán-Carrillo T, Zegarra-Martínez H, Muñoz-Colunga AM, Fernández-Linares LC (2007) *Chemosphere*, 66(9):1595-1600
- Ron E y Rosenberg E (2010) Role of Fertilizers: Biostimulation. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 2501-2504.
- Rowe RK, Mukunoki T, Lindsay H (2011) Effect of temperature on BTEX permeation through HDPE and fluorinated HDPE geomembranes. *Soils and Foundations*, 51(6):1103-1114
- Ruberto L, Vazquez SC, Mac Cormack WP (2003) Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydro-carbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52:115-125.
- Ruberto L, Vazquez SC, Curtosi A, Mestre MC, Pelletier E, Mac Cormack WP (2006) Phenanthrene biodegradation in soils using an Antarctic bacterial consortium. *Bioremediation Journal*, 10:191-201.
- Ruberto L, Vazquez SC, Mac Cormack WP (2008) Bacteriology of extremely cold soils exposed to hydrocarbon pollution. In: *Microbiology of Extreme Soils*, Soil Biology Series 13, Chap. 12ed. Dion, P. and Nautiyal, C.S. 247-274. Berlin: Springer-Verlag, Heidelberg
- Ruberto L, Dias R, Lo Balbo A, Vazquez S, Hernandez E, Mac Cormack WP (2009) Influence of nutrients addition and bioaugmentation on the hydrocarbon biodegradation of a chronically contaminated Antarctic soil. *Journal of applied microbiology*, 106:1101-1110. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04073.x
- Ruberto L, Levin G, Hernandez E, Stchigel A, Blanco M, Mac Cormack W (2011) Isolation of a fungus from a hydrocarbon contaminated Antarctic soil and characterization of it exudate. XLVII Reunión Anual de la SAIB, Potrero de los Funes, San Luis, Argentina.
- Ruberto LAM, Mac Cormack WP, Giuliotti AM, Merini LJ (2013) Microcosms: A Key Tool for the Scaling Up of Soil Bio/Phytoremediation Processes. In: *Advances in Environmental Research - Volume 30*. Editors: Justin Daniels. 01/2013: 201-228; Nova Publisher., ISBN: 978-1-62948-204-0.
- Saeed-Safadari M, Kariminia H, Rahmati M, Fazlollahi F, Polasko A, Mahendra S, Wilding W, Fletcher T (2018) Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 342:270-278. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.044>.
- Sangam HP y Rowe RK (2001) Migration of dilute aqueous organic pollutants through HDPE geomembranes. *Geotextiles and Geomembranes*, 19 (6):329-357.



- Saul DJ, Aislabie JM, Brown CE, Harris L, Foght JM (2005) Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 53:141–155
- Schafer A, Snape I, Siciliano SD (2007) Soil biogeochemical toxicity end points for subantarctic islands contaminated with petroleum hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(5):890–897.
- Schafer AN, Snape I, Siciliano SD (2009) Influence of liquid water and soil temperature on petroleum hydrocarbon toxicity in Antarctic soil. *Environmental Toxicology Chemistry* 28(7):1409–1415. doi: 10.1897/08-434.1.
- Scheibye K, Christensen JH, Johnsen AR (2017) Biodegradation of crude oil in Arctic subsurface water from the Disko Bay (Greenland) is limited. *Environmental Pollution*, 223:73–80. doi: 10.1016/j.envpol.2016.12.032
- Selbmann L, Turchetti B, Yurkov A (2014) Description of *Taphrina antarctica* f.a. sp. nov., a new anamorphic ascomycetous yeast species associated with Antarctic endolithic microbial communities and transfer of four *Lalaria* species in the genus *Taphrina*. *Extremophiles*, 18:707. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0651-z>
- Sharma P y Schiewer S (2016) Assessment of crude oil biodegradation in arctic seashore sediments: effects of temperature, salinity, and crude oil concentration. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(15):14881–14888. doi: 10.1007/s11356-016-6601-9
- Shi H, Zhang L, Yue L, Zheng G (2008) Petroleum Hydrocarbon Contamination in Surface Sediments of Beiluohe Basins, China. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81:416–421. doi:10.1007/s00128-008-9419-4
- Siegmund I y Wagner F (1991) New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques*, 5(4):265–268
- Singh R, Bishnoi NR, Kirrolia A (2013) Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* an innovative bioremediation tool in multi metals ions from simulated system using multi response methodology. *Bioresource Technology*, 138:222–234. doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.100.
- Smith RP, Schlub TE, Grimm A, Venturi V, Chopra A, Mallal S, Davenport MP, Mak J (2010) Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. *Gene*, 469:45–51. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.08.009>
- Snape I, Harvey P, Ferguson S, Rayner J, Revill A (2005) Investigation of evaporation and biodegradation of fuel spills in Antarctica. I: A chemical approach using GC–FID. *Chemosphere*, 61:1485–1494. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.04.108
- Snape I, Ferguson SH, Harvey P, Riddle M (2006) Investigation of evaporation and biodegradation of fuel spills in Antarctica: II—Extent of natural attenuation at Casey Station. *Chemosphere*, 63(1):89–98.
- Soil Survey Staff (1999) Soil taxonomy: a basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys, 2nd edn.
- Sørensen J y Nybroe O (2004) *Pseudomonas* in the Soil Environment. In: Ramos JL. (eds) *Pseudomonas*. Springer, Boston, MA.
- Stanley T, Konopka AE, Dalmasso P (1987) Spatial and temporal distribution of *Caulobacter spp.* in two mesotrophic lakes. *FEMS Microbiology Ecology*, 45:1–6.
- Sun L, Zhu G, Liao X, Yan X (2017) Interactions between *Pteris vittata* L. genotypes and a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacterium (*Alcaligenes sp.*) in arsenic uptake and PAH-dissipation. *Environmental Pollution*, 230:862–870.
- Tabuchi Yagui TR (2004) Optimización del uso de agar con cetiltrimetilamonio bromuro y azul de metileno para la selección de cepas de *Pseudomonas spp.* Productoras de rhamnolípidos. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- Tang J, Lu X, Sun Q, Zhu W (2012) Aging effect of petroleum hydrocarbons in soil under different attenuation conditions. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 149:109–117. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.12.020>

- Tastan BE (2017) Clean up fly ash from coal burning plants by new isolated fungi *Fusarium oxysporum* and *Penicillium glabrum*. *Journal of Environmental Management*, 200:46-52.
- Tausz J y Donath P (1930) Über die Oxydation des Wasserstoffs und der 609 Kohlenwasserstoffe Mittels Bakterien. *Hoppe Seylers Z Physiological Chemistry*, 190:141-168. <http://dx.doi.org/10.1515/bchm2.1930.190.3-6.141>.
- Thomassin-Lacroix EJM, Eriksson M, Reimer KJ, Mohn WW (2002) Biostimulation and bioaugmentation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59:551-556
- Thompson JR, Marcelino LA, Polz MF (2002) Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Research*, 30(9):2083-2088
- Tosi S, Casado B, Gerdol R, Caretta G (2002) Fungi isolated from Antarctic mosses. *Polar Biology*, 25:262-268.
- Turchetti B, Thomas Hall SR, Connell LB, Branda E, Buzzini P, Theelen B, Muller WH, Boekhout T (2011) Psychrophilic yeasts from Antarctica and European glaciers: description of *Glaciozyma* gen. nov., *Glaciozyma martini* sp. nov. and *Glaciozyma watsoniisp.* nov. *Extremophiles*, 15:573-586.
- Tyagi M, da Fonseca M, Manuela R, de Carvalho CC (2011) Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2):231-241 <http://link.springer.com.ezproxy.wlv.ac.uk/article/10.1007/s10532-010-9394-4>.
- Van Dorst J, Siciliano SD, Winsley T, Snape I, Ferrari B (2014) Bacterial targets as potential indicators of diesel fuel toxicity in subantarctic soils. *Applied Environmental Microbiology*, 80(13):4021
- Van Dorst JM, Hince G, Snape I, Ferrari B (2016) Novel Culturing Techniques Select for Heterotrophs and Hydrocarbon Degraders in a Subantarctic Soil. *Scientific Reports*, 6:36724. doi: 10.1038/srep36724.
- Van Elsas JD, Torsvik V, Hartmann A, Øbreås L, Jansson JK (2007) The Bacteria and Archaea in soil. En: *Modern Soil Microbiology*, 2nd Edition. van Elsas, Jansson & Trevors (Eds). CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Chapter 4, 83-106.
- Van Hamme JD y Ward OP (2001) Volatile hydrocarbon biodegradation by a mixed-bacterial culture during growth on crude oil. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(6):356-362.
- Vázquez S, Nogales B, Ruberto L, Hernández E, Christie-Oleza J, Lo Balbo A, Bosch R, Lalucat J, Mac Cormack W (2009) Bacterial Community Dynamics during Bioremediation of Diesel Oil-Contaminated Antarctic Soil. *Microbial Ecology* 57:598-610. doi:10.1007/s00248-008-9420-9.
- Vázquez S, Nogales B, Ruberto L, Mestre C, Christie-Oleza J, Ferrero M, Bosch R, Mac Cormack WP (2013) Characterization of bacterial consortia from diesel-contaminated Antarctic soils: towards the design of tailored formulas for bioaugmentation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 77:22-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.11.002>.
- Vemette S y Christofer S (2008) Using the rate of accumulated freezing and thawing degree days as a surrogate for determining freezing depth in a temperate forest soil. *Middle States Geographer*, 41:68-73.
- Vieira P, Faria S, Vieira RB, De França FP, Cardoso VL (2009) Statistical analysis and optimization of nitrogen, phosphorus, and inoculum concentrations for the biodegradation of petroleum hydrocarbons by response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25:427-438.
- Viñas M, Sabaté J, Espuny MJ, Solanas AM (2005) Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11):7008-7018. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7008-7018.2005>
- Waksman SA (1927) Transformation of organic matter; En: *Principles of soil microbiology*. Ed Bailliere, Tindal and Cox, London.
- Walkley A y Black IA (1934) An examination of the Degtjareff method for determining organic carbon in soils: effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Science* 63:251-263.

- Walworth J, Pond A, Snape I, Rayner J, Ferguson S, Harvey P (2007) Nitrogen requirements for maximizing petroleum bioremediation in a sub-Antarctic soil. *Cold Regions Science and Technology*, 48:84–91.
- Wang K, Yan PS, Cao LX (2014) Chitinase from a Novel Strain of *Serratia marcescens* JPP1 for Biocontrol of Aflatoxin: Molecular Characterization and Production Optimization Using Response Surface Methodology. *Biomed Research International*, Article ID 482623, 8 pages. doi: 10.1155/2014/482623.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16): 5261–5267. <http://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wan-Taek I, Qing-Mei L, Kang-Jin L, Se-Young K, Sung-Taik L, Tae-Hoo Y (2010) *Variovorax ginsengisoli* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60:1565–1569.
- Whelan MJ, Coulon F, Hince G, Rayner J, McWatters R, Spedding T, Snape I (2015) Fate and transport of petroleum hydrocarbons in engineered biopiles in polar regions. *Chemosphere*, 131:232-240.
- Whyte LG, Bourbonniere L, Bellerose C, Greer CW (1999) Bioremediation assessment of hydrocarbon-contaminated soils from the high Arctic. *Bioremediation Journal* 3(1):69–79.
- Wolińska A, Kuźniar A, Szafranek-Nakoneczna A, Jastrzębska N, Roguska E, Stępniewska Z (2016) Biological Activity of Autochthonic Bacterial Community in Oil-Contaminated Soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227:130. <http://doi.org/10.1007/s11270-016-2825-z>
- Wolf-Rainer A, Strompl C, Meyer H, Lindholst S, Moore E, Christ R, Vancanneyt M, Tindali BJ, Bennisar A, Smit J, Tesar M (1999) Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundirnonas* and *Caulobacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49:1053-1073.
- Wu WJ, Ahn BY (2014) Statistical Optimization of Ultraviolet Irradiate Conditions for Vitamin D2 Synthesis in Oyster Mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) Using Response Surface Methodology. *PLoS One*, 15;9(4):e95359. doi: 10.1371/journal.pone.0095359.
- Xie Y, Fan J, Zhu W, Amombo E, Lou Y, Chen L, Fu J (2016) Effect of Heavy Metals Pollution on Soil Microbial Diversity and Bermudagrass Genetic Variation. *Frontiers in Plant Science*, 7:755. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00755>
- Yagi JM, Neuhauser EF, Ripp JA, Mauro DM, Madsen EL (2010) Subsurface ecosystem resilience: long-term attenuation of subsurface contaminants supports a dynamic microbial community. *The ISME Journal* 4:131-143.
- Yergeau E, Arbour M, Brousseau R, Juck D, Lawrence JR, Masson L, Whyte LG, Greer CW (2009) Microarray and real-time PCR analyses of the responses of high-arctic soil bacteria to hydrocarbon pollution and bioremediation treatments. *Applied Environmental Microbiology*, 75(19):6258-67. doi: 10.1128/AEM.01029-09.
- Yergeau E, Sanschagrin S, Beaumier D, Greer CW (2012) Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel-contaminated Canadian high arctic soils. *PLoS One*, 7(1):e30058. doi: 10.1371/journal.pone.0030058.
- Zahed MA, Aziz HA, Mohajeri L, Mohajeri S, Kutty SRM, Isa MH (2010) Application of statistical experimental methodology to optimize bioremediation of n-alkanes in aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 184:350-356.
- Zhang ZN, Zhou QX, Peng SW, Cai Z (2010) Remediation of petroleum contaminated soils by joint action of *Pharbitis nil* L. and its microbial community. *Science of the Total Environment*, 408(22):5600-5605.
- Zhang W, Li J, Huang G, Song W, Huang Y (2011) An experimental study on the biosurfactant-assisted remediation of crude oil and salt contaminated soils. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 46(3):306-313
- Zhou E y Crawford RL (1995) Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. *Biodegradation*, 6(2):127–140.
- Zhou J, Wang J, Shi K, Xia XJ, Zhou YH, Yu JQ (2012) Hydrogen peroxide is involved in the cold acclimation-induced chilling tolerance of tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 60:141–149 10.1016/j.plaphy.2012.07.010

