

Evolución de la comunidad microbiana nativa durante el proceso de biodegradación de un residuo procedente de estaciones de servicios

Cambarieri, Luciana

*Facultad Regional Santa Cruz, Universidad Tecnológica Nacional,
Rio Gallegos (9400) Santa Cruz.
luciana_cambarieri@yahoo.com.ar*

Pucci, Graciela Natalia

*Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada,
Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia (9000) Chubut.
puccigraciela@gmail.com*

Acuña, Adrián Javier

*Facultad Regional Santa Cruz, Universidad Tecnológica Nacional,
Rio Gallegos (9400) Santa Cruz
adrianjacuna@yahoo.com.ar*

Fecha de recepción: 14/06/2019

Fecha de aprobación: 19/09/2019²

RESUMEN

La biodegradación es un proceso natural mediante el cual los microorganismos transforman los contaminantes en compuestos menos tóxicos.

El objeto de este trabajo es evaluar la respuesta de una comunidad microbiana nativa presente en un suelo, durante el proceso de biodegradación de un residuo generado en estaciones de servicio.

Se tomaron muestras de residuos líquidos de una estación de servicio en la ciudad de Río Gallegos. El hidrocarburo extraído se analizó mediante GC/MS. Se realizaron ensayos de biorremediación en microcosmos a base de suelo no contaminado durante 100 días con una relación C:N:P: de 100:2,5:0,25, 10% de humedad y 3 % del residuo. Se monitoreó por cuantificación del dióxido de carbono generado por la mineralización de hidrocarburos. Muestras de suelos fueron tomadas a diferentes tiempos para cuantificar hidrocarburos por GC/FID, conteo de bacterias aerobias totales (BAT) y bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH). También se monitoreó la comunidad bacteria por el análisis de los ácidos grasos microbianos extraídos directamente desde las muestras. El residuo presentó una composición de hidrocarburos rica en n-alcanos comprendidos entre C12 y C25. La mineralización alcanzó a un valor máximo de 14000 mg CO₂.kg_{suelo}⁻¹ y alrededor de un 80% de biodegradación. La biodegradación fue realizada principalmente por bacterias y actinomices, observándose que la comunidad bacteria se fue modificando a medida que la concentración de hidrocarburos disminuyó.

Palabras Claves: biodegradación, hidrocarburos, bacterias, lixiviado

² **Primer Premio**; categoría: Gestión de la Calidad, Calidad Ambiental, Higiene y Seguridad Industrial y Responsabilidad Social Empresaria; XII COINI (Río Gallegos, 2019)
AACINI – Revista Internacional de Ingeniería Industrial, N° 1 – junio de 2020 – pp. 5-16
ISSN en trámite

Evolution of the native microbial community during the biodegradation process of a residue from service stations

ABSTRACT

Biodegradation is a natural process by which microorganisms transform pollutants into less toxic compounds.

The aim of this work is to evaluate the response of a native microbial community present in the soil, during the biodegradation process of a waste generated in service stations.

Liquid waste samples were taken from a service station in the city of Río Gallegos. The extracted hydrocarbon was analyzed by GC / MS. Bioremediation tests were carried out in microcosm based on uncontaminated soil for 100 days with a C: N: P: ratio of 100: 2.5: 0.25, 10% humidity and 3% of the residue. It was monitored by quantification of carbon dioxide generated by hydrocarbon mineralization. Soil samples were taken at different times to quantify hydrocarbons by GC / FID, total aerobic bacteria (BAT) count and hydrocarbon degrading bacteria (BDH). The bacterial community was also monitored by the analysis of the microbial grades extracted directly from the samples. The residue had a hydrocarbon composition rich in n-alkanes between C12 and C25. The mineralization reached a maximum value of 14000 mg CO₂.kgsoil⁻¹ and about 80% biodegradation. The biodegradation was carried out mainly by bacteria and actinomyces, observing that the bacterial community was modified as the concentration of hydrocarbons decreased.

Keywords: biodegradation, hydrocarbons, bacterias, lixiviated

Evolução da comunidade microbiana nativa durante o processo de biodegradação de um resíduo das estações de serviço

RESUMO

A biodegradação é um processo natural pelo qual microorganismos transformam poluentes em compostos menos tóxicos.

O objetivo deste trabalho é avaliar a resposta de uma comunidade microbiana nativa presente no solo, durante o processo de biodegradação de um resíduo gerado nas estações de serviço.

As amostras de resíduos líquidos foram coletadas de uma estação de serviço na cidade de Río Gallegos. O hidrocarboneto extraído foi analisado por GC / MS. Testes de biorremediação foram realizados em microcosmo com base em solo não contaminado por 100 dias com uma relação C: N: P: de 100: 2,5: 0,25, 10% de umidade e 3% do resíduo. Foi monitorado quantificando o dióxido de carbono gerado pela mineralização de hidrocarbonetos. Amostras de solo foram coletadas em diferentes momentos para quantificar hidrocarbonetos por GC / FID, contagem total de bactérias aeróbicas (BAT) e bactérias degradantes de hidrocarbonetos (BDH). A comunidade bacteriana também foi monitorada através da análise dos graus de ácido microbiano extraídos diretamente das amostras. O resíduo apresentou uma composição de hidrocarboneto rica em n-alcenos entre C12 e C25. A mineralização atingiu um valor máximo de 14000 mg CO₂.kg_{suelo}⁻¹ e cerca de 80% de biodegradação. A biodegradação foi realizada principalmente por bactérias e actinomyces, observando que a comunidade bacteriana foi modificada com a diminuição da concentração de hidrocarbonetos.

Palavras chave: biodegradação, hidrocarbonetos, bactérias, lixiviado.

1. INTRODUCCIÓN

La industria automotriz se caracteriza por comercializar vehículos que funcionan a base de combustibles líquidos derivados del petróleo. La mayoría de ellos lo hacen a expensas de nafta o gasoil, utilizando diferentes tipos de aceites para lubricación. El despacho de este tipo de combustibles se realiza en las denominadas "estaciones de servicios". Toda estación de servicio, en su playa de abastecimiento de combustibles, posee un sistema de alcantarillas que tiene la finalidad de recoger los derrames de combustibles que puedan ocurrir durante las maniobras de carga de los mismos. Estos sistemas de alcantarilla confluyen en una pileta de tipo api donde el hidrocarburo lixiviado, por procesos físicos, es retenido evitando que sea arrastrado con los efluentes del lugar por el agua que entra en el sistema. Dicha agua entra en el sistema de alcantarillas debido a las lluvias ocasionales, o la limpieza de la playa de abastecimiento. Finalmente el hidrocarburo retenido en la pileta es retirado para su posterior eliminación. El mismo recibe un tratamiento térmico de elevado costo económico.

Dado a que los contaminantes que conforman el efluente líquido retenido en la pileta tipo api son nafta, gasoil y los aceites lubricantes, es probable su tratamiento por métodos biológicos.

Existen diversos tipos de tratamientos para remediar sitios contaminados, estos pueden ser físicos, químicos y biológicos, siendo este último método, altamente eficiente, amigable con el medio ambiente y de bajo costo económico [1].

La biorremediación, es un método biológico, mediante el cual los microorganismos presentes en un sitio, producen la transformación o eliminación de un contaminante. Dicho proceso suele aumentar su eficiencia al ser complementada mediante los procesos de bioaumentación y/o bioestimulación. La bioaumentación consiste en la incorporación de microorganismos especializados al sitio contaminado, a fines de acelerar el proceso de biorremediación; mientras que la bioestimulación consiste en estimular los microorganismos del ambiente natural mediante el agregado de nutrientes (principalmente nitrógeno y fósforo) [2, 3, 4].

Para que los procesos de biodegradación por parte de los microorganismos presentes en el suelo, puedan realizarse de forma totalmente efectiva, deben tenerse en cuenta una serie de factores en el área a tratar: como el tipo de microorganismos presentes, las condiciones del sitio contaminado (temperatura, oxígeno, energía, etc.) y la cantidad y toxicidad del contaminante [5].

Los suelos de la Patagonia en general presentan una escasez en el contenido de nutrientes [1] por lo que las comunidades microbianas autóctonas, se encuentran en su mayoría muy bien adaptadas a este marcado déficit y a las condiciones ambientales en las que habitan [3]. Por ello es fundamental, tener en cuenta que la incorporación de altas concentraciones de nutrientes durante el proceso de bioestimulación, pueden ser sumamente tóxicas para los microorganismos, ya que puede reducir considerablemente el número de bacterias degradadoras o alterar sus actividades metabólicas, y por lo tanto no podrían degradar los contaminantes de forma correcta [6].

En general los eventos de contaminación con hidrocarburos, generan disturbios en el suelo lo que conlleva a una serie de modificaciones en la estructura de las comunidades bacterianas. En ocasiones, los contaminantes suelen provocar la aparición de nuevas poblaciones bacterianas dominantes en la comunidad establecida. Las mismas logran sobrevivir, alterando y modificando su fisiología, con el objeto de aprovechar el contaminante como fuente de carbono y energía [7, 8] por lo que aumenta el número del recuento bacteriano, pero disminuye la biodiversidad de la comunidad [9].

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de las comunidades microbianas del suelo durante el proceso de biodegradación de un residuo líquido generado en una estación despacho de combustible.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Toma de muestras de lixiviado de estación de servicio

La toma de muestras de lixiviados, tuvo lugar en una estación de despacho de combustibles de la ciudad de Río Gallegos. La misma se efectuó de manera estacional durante un año. Se emplearon botellas de vidrio de 1 litro de capacidad para la recolección del líquido situado en las cámaras de almacenaje de los mismos. Las muestras líquidas se conservaron refrigeradas hasta su posterior separación física y análisis del contenido de hidrocarburos por cromatografía gaseosa.

2.2. Separación y análisis del lixiviado

La separación física de las muestras de lixiviado se hizo mediante la utilización de ampollas de decantación, con el objeto de separar la fase acuosa de la líquida no acuosa. Una vez obtenida esta última fase, se procedió a analizar su composición. Para ello, el residuo fue diluido en pentano y la fracción de hidrocarburos n-alcenos de C8 a C40 se estudió por cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masas (GC/MS). La identificación y cuantificación se realizó en un cromatógrafo de gases Agilen 7890A equipado con una columna capilar (HP5ms) de sílica gel fundida de 30 m por 0,25 mm por 0,25 μm y un programa de temperatura de 45°C iniciales por tres minutos, seguido de una rampa de 45°C a 275°C a 12°C/min, finalizando con 12 min a 275°C, con una temperatura del inyector de 200°C. El volumen de muestra inyectado fue de 1 μL en modo split con una relación 1:10. Como gas carrier se utilizó helio con un flujo de 1,2 mL/min. El detector de masas se utilizó con una temperatura de la fuente de iones y la línea de transferencia de 230 °C y 180 °C respectivamente y una energía de impacto de 70 eV. El escaneo de masas entre 29 y 400 uma se realizó en modo Scan. Para la identificación y cuantificación de los hidrocarburos se utilizaron los testigos propuestos por la Environmental Protection Agency en sus normas 8015D y 610.

2.3. Muestra de suelo utilizado como soporte para la biorremediación

Se tomó una muestra de suelo patagónico de aproximadamente 8 kg a una profundidad comprendida entre los 10 y 30 cm, en las inmediaciones de la ciudad de Río Gallegos. La misma fue tamizada con una malla de 2 mm de poro para eliminar todas las piedras existentes, y se almacenó hasta su posterior caracterización física, química y microbiológica.

2.3.1. Análisis físico y químico

Se realizaron determinaciones de humedad, densidad real, densidad aparente, porosidad, capacidad de retención de agua y porcentaje de materia orgánica e inorgánica, según lo propuesto por García Trejo en 1981 [10]. La determinación de pH, cationes y aniones se hizo sobre un extracto de muestra 1:2,5 en agua destilada. La medición de pH se realizó potenciométricamente con electrodo de vidrio. Se midieron el contenido de carbonato y bicarbonato por titulación con ácido clorhídrico 0,1 N utilizando fenolftaleína y heliantina como indicadores. El contenido de sulfatos, se efectuó a través del método turbidimétrico, basado en su precipitación en medio ácido. Las mediciones de calcio y magnesio se hicieron a través de complejometría con EDTA, a pH 12, para el primero de ellos utilizando murexida como indicador y a pH 10 con negro de ericromo T como indicador, para el segundo. Los cloruros fueron determinados por el método de Mohr, el ión amonio como azul de indofenol y el fosfato con azul de molibdeno. El contenido de nitrito se midió por colorimetría con ácido sulfanílico y 1-naftilamina y el nitrato con brucina en presencia de ácido sulfúrico [11, 12, 13].

2.3.2. Análisis de hidrocarburos totales del petróleo

Para la evaluación de los hidrocarburos se siguieron los lineamientos propuestos para este tipo de análisis según la norma TNRCC 1005. A tal efecto, 10 gramos de suelo fueron colocados en un vial de 20 mL y 10 mL de pentano fueron agregados. Los viales fueron agitados en un agitador horizontal a 120 oscilaciones/min por una hora. Los extractos se dejaron decantar toda la noche para finalmente separar la fase orgánica. Para la identificación y cuantificación se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilen, modelo 7890B, con un detector tipo FID alimentado por hidrógeno y aire cromatográfico. El puerto de inyección fue Split/splitless y la inyección de las muestras se realizó con jeringa de 10 µL con una torre de inyección automática. La columna utilizada fue HP-5 de marca Agilen de 30m x 0,32mm x 0,25µm con gas nitrógeno como carrier a un flujo de 3mL/min. Las condiciones de corrida que se utilizaron fueron: volumen de muestra inyectado fue de 1 µL en modo splitless con un flujo de inyección de 20 mL/min con una temperatura del inyector de 285°C. El programa del horno comenzó a 30°C por 3 minutos, seguido de un rampa de 15°C/min hasta alcanzar los 300°C de temperatura que luego se mantuvo 5 minutos. Luego se utilizó una rampa de 15°C/min hasta alcanzar los 325°C, temperatura que se mantuvo hasta alcanzar los 30 minutos de corrida total. El detector FID se mantuvo a una temperatura de 325°C, con un flujo de hidrógeno de 30mL/min y de aire cromatográfico de 400mL/min. La cuantificación se llevó a cabo utilizando los estándares propuestos por las normas EPA 8015 y TNRCC 1005.

2.3.3. Análisis microbiológico

El recuento de bacterias heterótrofas y degradadoras de hidrocarburos se realizó por el método de diseminación en superficie. Para ello se realizó una suspensión de 1 g de muestra en 9 ml de solución fisiológica estéril y se homogeneizó en un agitador orbital por 30 minutos a 80 r.p.m. El medio de cultivo utilizado para bacterias heterótrofas fue R2A (extracto de levadura 0,5g, peptona proteasa 0,5g, casamino ácido 0,5g, glucosa 0,5g, almidón 0,5g, piruvato de sodio 0,3g, K₂HPO₄ 0,3g, MgSO₄.7H₂O 0,05g, agar 15g, agua destilada 1000mL) y BDH para las degradadoras de hidrocarburos (NaCl 5g, K₂HPO₄ 0,5g, NH₄H₂PO₄ 0,5g, (NH₄)₂SO₄ 1g, MgSO₄ 0,2g, KNO₃ 3g, FeSO₄ 0,05g, SL 10 B (HCl (25 %) 7,7mL, FeSO₄.7H₂O 1,5g, ZnCl₂ 0,07g, MnCl₂.4H₂O 0,1g, H₃BO₃ 0,3g, CoCl₂.6H₂O 0,19g, CuCl₂.2H₂O 0,002g, NiCl₂.6H₂O 0,024g, Na₂MoO₄.2H₂O 0,036g, agua destilada 1000mL) 10mL, agar 15g, agua destilada 1000mL, adicionado con 30 µL de una mezcla de petróleo y gasoil 1:1. La incubación de las placas de recuento se realizó a 28°C por 20 días.

2.4. Experiencia de biodegradación

2.4.1 Ensayo de biorremediación asistida

Se confeccionaron microcosmos por triplicado en botellas de vidrio de 1 litro, empleando 200 g de suelo. Se les adicionó un 10% de agua, un 3 % residuo, y nutrientes. Como fuente de nitrógeno y fósforo se aplicó nitrato de potasio (KNO₃) y fosfato monopotásico (KH₂PO₄), para establecer una relación de C:N:P: 100:2,5:0,25. Cabe agregar, que también se diseñó un sistema control de la misma manera anteriormente mencionada, pero sin el agregado del contaminante. Todos los sistemas se incubaron a 28 °C durante 100 días. Se monitorearon semanalmente, el dióxido de carbono producido a partir de la mineralización del hidrocarburo presente. En cada sistema se colocó en su interior un recipiente colector con 3mL de hidróxido de sodio 3N con el objeto de fijar el dióxido de carbono liberado, y luego, titularlo con una solución valorada de ácido clorhídrico.

Muestras de suelo fueron tomadas, a tiempo cero 0 (T0), 21 (T1), 41 (T2), 63 (T3), 80 (T4) y 100 (T5) días, con el objetivo de determinar el contenido de hidrocarburos presentes por cromatografía gaseosa, conteo de bacterias aerobias totales (BAT) y bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) de acuerdo a la metodología descrita para la caracterización de la muestra de suelo, y la evolución de la comunidad bacteriana por FAMES.

2.4.2 Estudio de ácidos grasos microbianos totales del suelo (FAMES)

La extracción de ácidos grasos totales se efectuó por duplicado utilizando el método modificado propuesto por Ritchie *et al.* en el año 2000 [14]. Se tomaron 3 g de suelo a los que se les adicionó 15 mL de una solución 0,2 M de KOH en metanol y se incubó una hora a 37 °C. Luego se añadieron 3 mL de ácido acético 1 M para neutralizar el pH y finalmente se agregó 10 mL de hexano. Seguidamente se agitó durante 20 min en agitador horizontal a 100 oscilaciones por minuto para finalmente separar la fase orgánica. Esta fase se evaporó bajo corriente de nitrógeno hasta sequedad para luego resuspender los FAMES en 200 µL de hexano que finalmente se transfirieron a un vial de GC. Los ácidos grasos fueron determinados como metil ésteres por GC/MS mediante la utilización de una columna capilar (HP5ms) de sílica gel fundida de 30 m por 0,25 mm por 0,25 µm. Los análisis se llevaron a cabo con un cromatógrafo de gases Agilen 7890A (inyección splitless; presión inicial 10 psi; programa de temperatura: 170-288 °C a 28 °C.min⁻¹, 288-310 °C a 60 °C.min⁻¹, 1,5 min de permanencia a 310 °C) con detector por espectrometría de masas Agilent 5975C con una temperatura de la fuente de iones y la línea de transferencia de 230 °C y 180 °C respectivamente y una energía de impacto de 70 eV. La identificación de los ácidos grasos como metil ésteres se realizó con los estándares propuestos por el sistema MIDI y la biblioteca NIST 08. La composición de los ácidos grasos fue calculada como porcentaje del área de pico.

Con los datos obtenidos del estudio de ácidos grasos microbianos del suelo, se procedió a estimar la evolución en el tiempo de los índices microbianos correspondientes a biomasa monitoreando el ácido graso 14:0 [15], bacterias según Σ (15:0 + 16:0 + cy17:0 + 17:0 + 18:0 + cy19:0 + 16:1 ω 7 + 15:1 ω 5) [16], actinomices según Σ (18:0 10Me + 19:0 10Me) [16] y hongos por el monitoreo del ácido graso 18:2 ω 6c [15]. Por otro lado, también se realizó un estudio de estadística multivariada de componentes principales (PCA) utilizando el programa PATS 3.16.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización del suelo

Para que el proceso de biorremediación funcione de manera eficiente, es fundamental conocer cuáles son las características del hábitat microbiano. Estas se definen a partir de las características físicas y químicas del suelo [17]. En base a los resultados obtenidos de la muestra estudiada, la misma se correspondería a un suelo típico de la región patagónica, dado al bajo contenido de nutrientes y de materia orgánica [1, 18]. Sin embargo, presenta valores de pH, porosidad y capacidad de retención de agua, que lo hacen apto para un favorable crecimiento bacteriano [19] (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis físicos, químicos y microbiológicos del suelo estudiado.

Análisis físico, químico y microbiológico			
pH	7,66	Cloruro (mg.kg ⁻¹)	37,4
Conductividad (µS.cm ⁻¹)	84,5	Sulfato (mg.kg ⁻¹)	48,7
Humedad (%)	1,07	Carbonato (mg.kg ⁻¹)	< 1
Materia orgánica (%)	0,98	Bicarbonato (mg.kg ⁻¹)	45,74
Materia inorgánica (%)	99,02	Calcio (mg.kg ⁻¹)	40,88
Densidad aparente (g.cm ³⁻¹)	1,31	Magnesio (mg.kg ⁻¹)	12,16
Densidad real (g.cm ³⁻¹)	2,46	Nitrito (mg.kg ⁻¹)	0,52
Porosidad (%)	46	Nitrato (mg.kg ⁻¹)	18,1

		Amonio (mg.kg ⁻¹)	0,05
Hidrocarburos totales (mg.kg ⁻¹)	< 1	Fosfato (mg.kg ⁻¹)	< 1
BAT (UFC.g ⁻¹)	5,30E+05	BDH (UFC.g ⁻¹)	8,90E+03

BAT: bacterias aerobias totales, BDH: bacterias degradadoras de hidrocarburos.

3.2. Caracterización del residuo líquido

A partir de los estudios realizados por GC/MS, se logró identificar la composición de los hidrocarburos presentes en la fase líquida no acuosa de la muestra, el cual se correspondió mayormente a la fracción de carbono equivalente comprendida entre C12/13 a C24/25. En función de la composición química del residuo se observó que comparte una similitud con el gasoil, como se observa en la Figura 1. El gasoil, es una mezcla de hidrocarburos obtenidos por destilación en un rango de temperatura de 175 a 345 °C, entre los que se encuentran en mayor proporción los n-alcenos y una baja proporción de compuestos aromáticos [20]. Cabe resaltar que la fracción de n-alcenos, presenta una elevada biodegradabilidad [21].

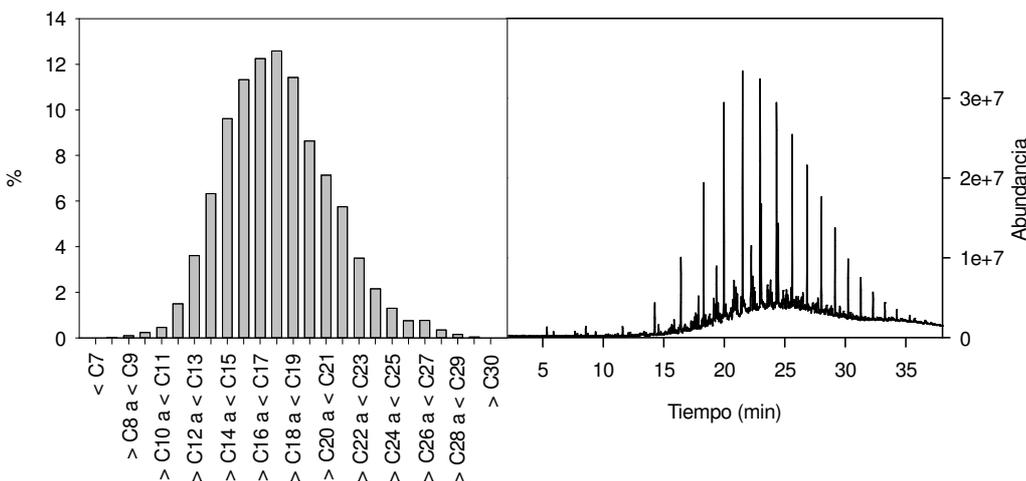


Figura 1 Perfil cromatográfico del residuo estudiado

3.3. Mineralización y cuantificación de hidrocarburos

Los sistemas exhibieron tasas de mineralización elevadas en los primeros 20 días del ensayo. Los valores de éste parámetro estuvieron entre 300 y 600 mgCO₂.kg⁻¹_{suelo}.día⁻¹, evidenciándose una producción de CO₂ total de aproximadamente 14.000 mgCO₂.kg⁻¹_{suelo} (Figura 2). En relación a las tasas de degradación de los hidrocarburos totales presentes (HTP) en el residuo, se observa en la Figura 3 que los valores más elevados se registraron en los primeros 20 días de la experiencia, obteniéndose un porcentaje de degradación cercana al 80 %.

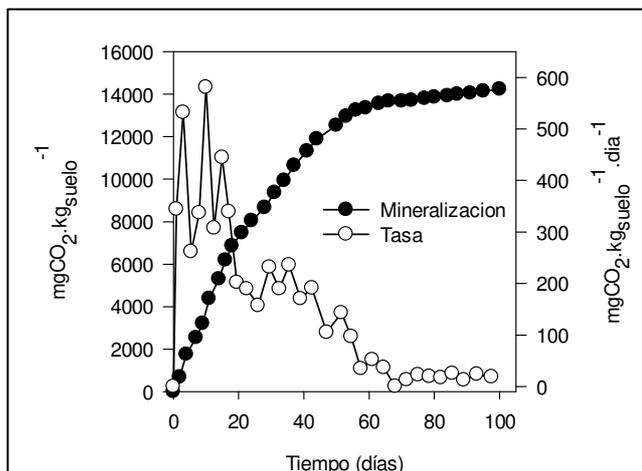


Figura 2 Curvas de mineralización de hidrocarburos y tasas de mineralización de hidrocarburos

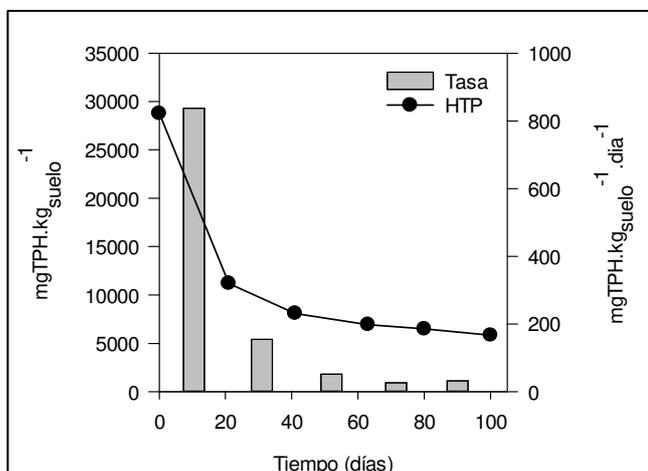


Figura 3 Curvas de degradación de hidrocarburos y tasas de degradación de hidrocarburos

La óptima biodegradación del residuo, se relacionaría con la composición mayoritaria de n-alcenos, los cuales presentan una elevada biodegradabilidad [22, 23].

Anyasi y Atagana en 2011 [24] señalaron que la biodegradación en suelos es mayor en las primeras semanas independientemente de la cantidad de microorganismos presentes, ya que los contaminantes presentan una alta biodegradabilidad. Como se observa en las figuras 2 y 3, luego del día 50, los sistemas no evidenciaron cambios significativos en las curvas de mineralización como en la degradación de los hidrocarburos. Dicha situación, podría deberse a un agotamiento de los nutrientes en los sistemas de estudio [1, 3].

3.4. Conteo de bacterias degradadoras de hidrocarburos y bacterias aerobias totales

Con respecto al conteo de bacterias aerobias totales (BAT) y degradadoras de hidrocarburos (BDH), se han obtenido resultados favorables durante los ensayos de biodegradación. En el día 40 de la experiencia, se evidenciaron picos de crecimiento máximos, en el orden de $2,48 \text{ E}+10 \text{ UFC.g}^{-1}_{\text{suelo}}$ para las BAT y $6,20 \text{ E}+09 \text{ UFC.g}^{-1}_{\text{suelo}}$ para las BDH. Cabe destacar, que el último grupo de microorganismos

son los responsables de llevar a cabo el proceso de biodegradación, observándose un número acorde al tipo de hidrocarburo presente en cada microcosmo [25].

3.5. Evolución en el tiempo de biomasa, bacterias, actinomices y hongos

En la Figura 4 se observa que la incorporación del residuo registró un aumento en el índice de la comunidad bacteriana, y en la producción de la biomasa. No obstante, los hongos y actinomices, no presentaron cambios evidentes durante el transcurso de la experiencia.

Esto es coincidente con las curvas y tasas de mineralización observada durante la experiencia. Se estima que una vez que los microorganismos logran recuperarse del estrés generado por la presencia de los contaminantes hidrocarbonados, aumentan en número y pueden eliminar los compuestos biodegradables [26].

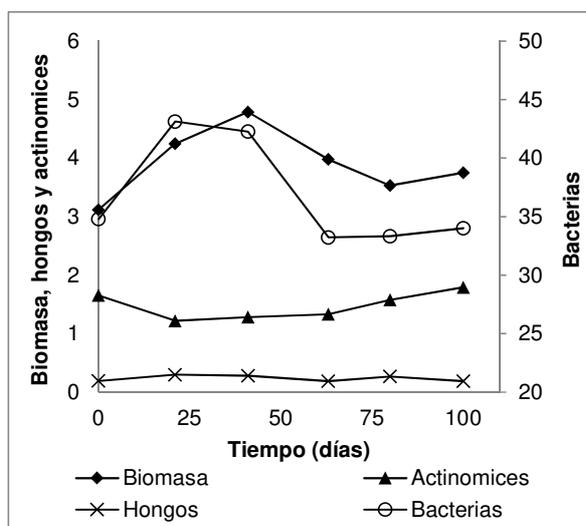


Figura 4 Evolución de los diferentes índices calculados a partir de los estudios de ácidos grasos de membrana del suelo de los microcosmos.

3.6. Evolución de la comunidad bacteriana

En lo referente al análisis de componentes principales realizado a partir de los ácidos grasos de membrana para cada sistema en función del tiempo, se registraron cambios en la estructura de la comunidad bacteriana. En la Figura 5, se observa que la adición de nutrientes y humedad en el suelo (Control) generó una distorsión mínima de la comunidad bacteriana. La aplicación del contaminante hidrocarbonado en el suelo, provocó modificaciones notorias en la estructura de esta comunidad bacteriana que tendieron a distanciarla de la original. Sin embargo, a medida que el tiempo fue transcurriendo y que el contaminante fue disminuyendo su concentración en el suelo, la comunidad bacteriana tendió a recuperarse y a evolucionar a la comunidad que la originó.

En el año 2012, Pucci *et al.* [26], evidenciaron a partir de ensayos realizados con hexadecano como contaminante, que a medida que este fue eliminado del suelo, la comunidad bacteriana del mismo tiende a ser la misma que existía antes de la incorporación del contaminante. Este tipo de evolución de los microorganismos puede ser tomado como un parámetro más para estimar que el proceso biológico está siendo exitoso.

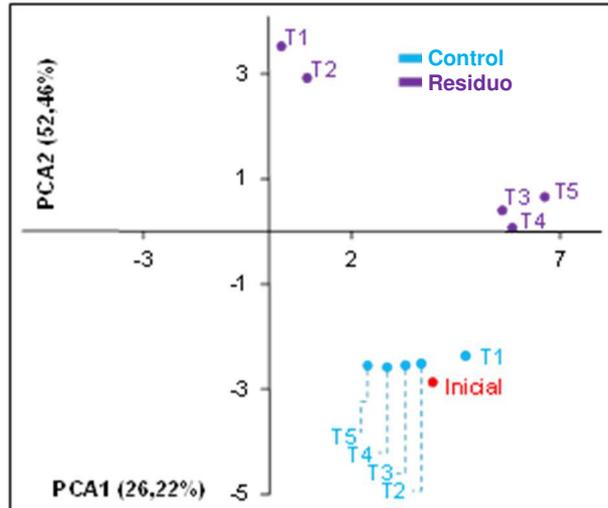


Figura 5 Análisis de componentes principales.

4. CONCLUSIONES

En relación a los datos obtenidos se pudo corroborar que las comunidades microbianas nativas del suelo, tienen la capacidad de biodegradar los hidrocarburos presentes en la fase líquida no acuosa del residuo. Para que dicho proceso de eliminación logre llevarse a cabo deben tenerse en cuenta la cantidad de los nutrientes a incorporar, el porcentaje de humedad, y la concentración del hidrocarburo presente.

A pesar que las comunidades microbianas sufren modificaciones en su estructura debido al agregado del contaminante, las bacterias degradadoras de hidrocarburos se adaptan a la presencia de estos contaminantes hidrocarbonados. Las mismas tienen la capacidad de recuperarse, aumentando su número y continuar con la eliminación de los componentes biodegradables.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los parámetros anteriormente mencionados, sería factible aplicar la técnica de biorremediación asistida al residuo estudiado.

Agradecimientos

Los autores de este trabajo desean agradecer a la Facultad Regional Santa Cruz y a la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, por permitir llevar a cabo esta investigación.

REFERENCIAS.

- [1] Pucci, G; Acuña, A; Pucci, O. (2011). Biodegradación de hidrocarburos en la meseta Patagónica, un resumen de la optimización de los parámetros a tener en cuenta. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. 115, 36-41. Argentina.
- [2] Riis, V; Babel, W; Pucci, O. (2002). Influence of heavy metals on the microbial degradation of diesel fuel. *Chemosphere*. 49,6, 559-568. Reino Unido.
- [3] Acuña, A; Pérez Krenek, J; Pucci, O; Pucci, G. (2007). Biodegradación de hidrocarburos. Influencia de la fertilización en el proceso de biorremediación. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. 84, 82-86. Argentina.
- [4] Núñez Cuartas, D; Paredes Cuervo, D; Cubillos Vargas, J. (2014). Bioremediation for degradation of total hydrocarbons present in the sediments of a fuel service station. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*. 37, 20-28. Venezuela.
- [5] Van Hamme, J; Singh, A; Ward, O. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67, 503-549. USA.
- [6] Riser, R. (1998). *Remediation of petroleum contaminated soil: biological, physical, and chemical processes*. Florida. 1ª Edición. Ediciones CRC Press. Florida.
- [7] Kumar, M; Khanna, S. (2010). Diversity of 16S rRNA and dioxygenase genes detected in coal tar-contaminated site undergoing active bioremediation. *Journal Applied Microbiology*. 108, 1252-1262. Reino Unido.
- [8] Van Elsas, J; Jansson, J; Trevors, J. (2007). *Modern soil microbiology*. New York. 2ª Edición. CRC Press. New York.
- [9] Atlas, R; Philp, J. (2005). *Bioremediation: applied microbial solutions for real-world environmental cleanup*. Washington. 1ª Edición. American Society for Microbiology (ASM) Press. Washington.
- [10] García Trejo, A. (1981). *Propiedades fisicoquímicas del suelo*. México. 1ª Edición. Compañía Editorial Continental S.A. México.
- [11] Peressutti, S; Álvarez, H; Pucci, O. (2003). Dynamics of hydrocarbon-Degrading bacteriocenosis of an experimental oil pollution in Patagonian soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 52, 21-30. Reino Unido.
- [12] Pucci, G; Pucci, O. (2003). Biodegradabilidad de Componentes de Mezclas Naturales de Hidrocarburos Previamente Sometidas a Landfarming. *Revista Argentina de Microbiología*. 35, 62-68. Argentina.
- [13] Acuña, A; Pucci, O; Pucci, G. (2008). Caracterización de un Proceso de Biorremediación de Hidrocarburos en Deficiencia de Nitrógeno en un Suelo de la Patagonia Argentina. *Ecosistemas*. 17, 85-93. España.
- [14] Ritchie, N; Schutter, M; Dick, R; Myrold, D. (2000). Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Applied Environmental Microbiology*. 66, 1668-1675. USA.
- [15] Mummey, D; Stahl, P; Buyer, J. (2002). Soil microbiological properties 20 years after surface mine reclamation: spatial analysis of reclaimed and undisturbed sites. *Soil Biology Biochemistry*. 34, 1717-1725. Reino Unido.
- [16] Zheng, S; Hu, J; Jiang, X; Ji, F; Zhang, J; Yu, Z; Lin, X. (2013). Long-term fertilization regimes influence FAME profiles of microbial communities in an arable sandy loam soil in Northern China. *Pedobiología*. 56, 179-183. Holanda.
- [17] Alessandrello, M; Tomás, M; Raimondo, E; Vullo, D; Ferrero, M. (2017). Petroleum oil removal by immobilized bacterial cells on polyurethane foam under different temperature conditions. *Marine Pollution Bulletin*. 122, 156-160. Reino Unido.

- [18] Peri, P; Rosas, Y; Ladd, B; Toledo, S; Lasagno, R; Pastur, G. (2019). Modeling soil nitrogen content in south Patagonia across a climate gradient, vegetation type, and grazing. *Sustainability*. 11, 2707. Suiza.
- [19] Leahy, J; Colwell, R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*. 54, 305-15.
- [20] Acuña, A; Pucci, G; Morales, M; Pucci, O. (2010). Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 30,1, 29-36. Venezuela.
- [21] Margesin, R; Schinner, F. (1997). Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47, 462-468. Alemania.
- [22] Ameen, F; Moslem, M; Hadi, S; Al-Sabri, A. (2016). Biodegradation of diesel fuel hydrocarbons by mangrove fungi from Red Sea Coast of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 23, 211-218. Arabia Saudita.
- [23] Wang, Z; Fingas, M; Yang, C; Christensen, J. (2006). Environmental forensics. USA. 1° Edición. Elsevier Science (Ed). USA.
- [24] Anyasi, R; Atagana, H. (2011). Biological remediation of polychlorinated biphenyls (PCB in the environments by microorganisms and plants. *African Journal of Biotechnology*. 10, 18916-18938. Kenia.
- [25] Varjani, S. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource technology*. 223, 277-286. Holanda.
- [26] Pucci, G; Acuña, A; Nohra, N; Pucci, O. (2012). Cambios en las comunidades bacterianas de suelo luego de una contaminación con hexadecano. *Revista Peruana de Biología*. 19,1, 111 – 112. Perú.