

BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CRÓNICAMENTE CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS POR LA CEPA AUTÓCTONA *Pseudomonas sp. MT1A3*

Recibido: 4 de Mayo, 2021 • Aceptado: 4 de Julio, 2021

Autores:


Debora Conde Molina¹

 <https://orcid.org/0000-0002-2817-3726>

Franco Liporace¹

 <https://orcid.org/0000-0002-9962-255X>

Carla V. Quevedo *¹

 <https://orcid.org/0000-0001-6902-9686>

¹ Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Química, Facultad Regional Delta, Universidad Tecnológica Nacional. San Martín 1171, 2804, Campana, Buenos Aires, Argentina.

Contacto:

*Autor a quien la correspondencia debe ser dirigida: quevedo.carla@gmail.com

Roles autorales:

Conceptualización: Carla V. Quevedo; Debora Conde Molina

Análisis de Formal: Debora Conde Molina; Franco Liporace

Adquisición de Fondos: Carla V. Quevedo

Investigación: Debora Conde Molina

Metodología: Debora Conde Molina; Franco Liporace

Supervisión: Carla V. Quevedo

Redacción: Debora Conde Molina

Escritura, Revisión y Redacción: Carla V. Quevedo; Debora Conde Molina

Cómo citar este artículo:

Conde Molina, D., Liporace, F., Quevedo, C.A. Biorremediación de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos por la cepa autóctona *Pseudomonas sp. MT1A3*. Revista Rumbos Tecnológicos, Volumen 13, 2021, pp.37-50. Secretaria de Ciencia, Tecnología y Posgrado, Facultad Regional Avellaneda, Universidad Tecnológica Nacional. <http://rumbostecnologicos.utnfrainvestigacionyposgrado.com/tipo-de-articulo/articulos/biorremediacion-de-suelos-cronicamente-contaminados-con-hidrocarburos-por-la-cepa-autoctona-pseudomonas-sp-mt1a3/>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

RESUMEN

La contaminación generada por compuestos del petróleo es uno de los problemas ambientales más graves en la sociedad actual. Debido a esto, la biorremediación se presenta como una estrategia para el saneamiento de sitios contaminados, que cada vez adquiere mayor relevancia debido a su potencial como tecnología no invasiva y rentable. El objetivo de este trabajo es optimizar la producción de biomasa de la cepa *Pseudomonas sp. MT1A3*, y su posterior aplicación como inóculo de bioaumento en sistemas de microcosmos diseñados con suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos. Se realizaron diseños experimentales estadísticos para estudiar el efecto de diferentes factores del medio de cultivo y de las condiciones de incubación sobre la producción de biomasa. Los factores analizados que demostraron ser significativos fueron aceite de maní 18,69 g/L, NaNO_3 2,39 g/L y 26 °C de temperatura de incubación. El proceso optimizado en conjunto con el escalado en un biorreactor permitió aumentar 35 % la producción de biomasa, obteniéndose 9,67 g/L. Dado estos resultados se llevaron a cabo técnicas bioaumento como estrategia de biorremediación a través de diseños de microcosmos, en donde se observó una remoción de 93.52 % de hidrocarburos totales a los 60 días. Estos resultados proponen a *Pseudomonas sp. MT1A3* como una alternativa prometedora para remediar suelos contaminados con hidrocarburos.

Palabras Claves: Suelo contaminado con hidrocarburo, Biorremediación, Bioaumento, *Pseudomonas sp.*, Microcosmos

ABSTRACT

In present times, contamination with petroleum compounds becomes a more severe problem in the existing society. Because of this, bioremediation is presented as a strategy for cleaning up sites contaminated with organic pollutants and it has an increasing role in relation to the potential it poses as a non-invasive and cost-effective technology. The aim of this work is to optimize the biomass production of *Pseudomonas sp. MT1A3* strain and its subsequent application as inoculum in bioaugmentation strategy in microcosm systems designed with chronically hydrocarbon-contaminated soils. Statistical experimental designs were performed to study the effect of various factors of the compositional medium and incubation conditions on biomass production. The optimized statistically significant factors were peanut oil 18.69 g/L, NaNO_3 2.39 g/L and 26 °C incubation temperature. The optimized process with the scale-up in a bioreactor allowed a 35 % increase in biomass production, obtaining 9.67 g/L. This autochthonous strain was applied in bioaugmentation as a bioremediation strategy through microcosm designs, reaching until 93.52 % of total hydrocarbon removal at 60 days. These results propose *Pseudomonas sp. MT1A3* as a promising alternative for remediating hydrocarbon-contaminated soils.

Key-words: Hydrocarbon-contaminated soil, Bioremediation, Bioaugmentation, *Pseudomonas sp.*, Microcosms

INTRODUCCIÓN

El área industrial Zárate-Campana, ubicada al noroeste de la provincia de Buenos Aires, representa uno de los polos petroquímicos más importantes de la Argentina. Debido a que esta zona ha llevado a cabo actividades relacionadas con la industria petroquímica durante 100 años, la misma posee un historial importante de vertidos de petróleo y derivados, tales como derrames accidentales o intencionales, fugas de tanques de almacenamiento y barriles, vuelcos accidentales en el proceso de carga y descarga de camiones. Esto hace que los suelos y los cuerpos de agua de esta área se encuentren crónicamente contaminados con hidrocarburos (Conde Molina, 2019b).

La contaminación con hidrocarburos ocasiona el deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente. Debido a que los hidrocarburos son tóxicos resultan ser una amenaza para la salud humana, las especies vegetales y animales (Whitfield, 2003; El-Alam et al., 2018). La contaminación de estos compuestos se caracteriza en la mayoría de los casos por ser muy persistentes en los ecosistemas. Por ejemplo, los hidrocarburos de alto peso molecular, alifáticos y aromáticos, son contaminantes muy resistentes debido a su baja solubilidad y sus altas relaciones de distribución suelo-agua. Esto hace que sean de difícil disponibilidad para los organismos degradadores nativos y se acumulen en el medio ambiente (Johnsen et al., 2005). Además del impacto ambiental negativo, los derrames de hidrocarburos generan impactos de tipo económico, social y de salud pública en las zonas aledañas al lugar afectado. Por ello, para evitar la destrucción del ecosistema resulta prioritario que estas zonas sean tratadas.

La biorremediación se considera una tecnología amigable con el ambiente, simple y económica. El propósito de la biorremediación es potenciar los procesos naturales de biodegradación mediante la optimización de los parámetros limitantes del sistema (Azubuike et al., 2016). Estos procesos de degradación incluyen la mineralización o transformación de los contaminantes en formas menos tóxicas por la acción de los microorganismos. Por lo tanto, la presencia de microorganismos con las capacidades metabólicas adecuadas se considera un requisito primordial para la biorremediación (Varjani, 2017; Rabodonirina, 2019). Asimismo, las comunidades de microorganismos expuestas a los hidrocarburos pueden adaptarse a este entorno, mostrando cambios genéticos y metabólicos (Semple et al., 2001; Van Hamme et al., 2003). Dichos microorganismos autóctonos resultan ser un recurso potencial para el saneamiento de sitios contaminados.

Por lo tanto, la eficacia de la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo en el suelo puede verse limitada por la cantidad y la especie de los microorganismos (Stroud et al., 2007; Katayama et al., 2010). Frente a esta situación, una estrategia frecuentemente utilizada es el bioaumentación (Ruberto et al., 2009; Jiang et al., 2016; Guarino et al., 2017), que consiste en introducir microorganismos para aumentar o acelerar la degradación del contaminante. Esta técnica es considerada cuando la población de microorganismos autóctonos es insuficiente, no tiene capacidad para degradar los contaminantes o la velocidad de descontaminación es más lenta de lo esperado.

En el presente trabajo se evalúa el empleo de la cepa autóctona *Pseudomonas sp. MT1A3* para ser aplicada como estrategia de bioaumentación, para la biorremediación de áreas crónicamente contaminadas por hidrocarburos pertenecientes a la refinería RHASA (Argentina). Dicha cepa, fue previamente aislada (Liporace et al., 2012) e identificada como microorganismo degradador de hidrocarburos (Conde Molina et al., 2019a). Este trabajo incluye la optimización de la producción de biomasa por *Pseudomonas sp. MT1A3* a través de la aplicación de diseños experimentales estadísticos, y su aplicación como inóculo en diseños de microcosmos para degradar hidrocarburos presentes en un suelo crónicamente contaminado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Optimización de la producción de biomasa de *Pseudomonas sp. MT1A3*

En primera instancia se realizó la optimización de las condiciones de cultivo para la producción de biomasa de *Pseudomonas sp. MT1A3*. Para ello se partió de medio de cultivo original conformado por medio salino mínimo (MSM (g/L): KH_2PO_4 (1,5); Na_2HPO_4 (0,5); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,0011); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,0132) aceite de maní (40 g/L) como fuente de carbono y NaNO_3 (4 g/L) como fuente de nitrógeno, inoculado con 3% (v/v) (DO 0,5) de *Pseudomonas sp. MT1A3* e incubado a 135 rpm (Conde Molina et al., 2019a).

Posteriormente, se analizaron las condiciones de crecimiento para la producción de biomasa por parte de *Pseudomonas sp. MT1A3* mediante diseños experimentales de selección (diseño factorial completo, DFC) (Montgomery, 2001). Los DFC consistieron en tres niveles codificados (-1, 0, 1) y dos puntos centrales para evaluar los efectos sobre la biomasa. Los parámetros examinados fueron las concentraciones de carbono (aceite de maní), de nitrógeno (NaNO_3), de fósforo (KH_2PO_4), la temperatura y tiempo de incubación. Los resultados se ajustaron con una función polinómica de primer orden según la ecuación 1, donde Y es la respuesta observada, X_i es la variable de entrada que afecta a Y , β_0 es la intercepción y β_i es el i -ésimo coeficiente lineal.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad (\text{Ecuación 1})$$

La optimización de los factores significativos se llevó a cabo con un diseño de superficie de respuesta (diseño Box-Behnken, DBB) (Box y Behnken, 1960). El experimento DBB presentó tres niveles codificados (-1, 0, 1), cuatro puntos centrales y tres factores variables: concentración de aceite de maní, concentración de NaNO_3 y temperatura. Se utilizó un modelo de segundo grado para optimizar la respuesta, como se muestra en la ecuación 2, donde Y es la respuesta predicha, X_i y X_j son las variables de entrada que influyen en la variable de respuesta, β_0 es el intercepto, β_i es el i -ésimo coeficiente lineal, β_{ii} es el i -ésimo coeficiente cuadrático, y β_{ij} es el i -ésimo coeficiente de interacción.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Tanto los modelos DFC como DBB fueron analizados utilizando Minitab Statistical Software (USA).

El modelo matemático resultante de la optimización de la biomasa de *Pseudomonas sp. MT1A3* se validó en ensayos de erlenmeyers de acuerdo a las condiciones optimizadas.

Escalado en biorreactor

Las condiciones de cultivo optimizadas para la producción de biomasa se ensayaron en un biorreactor de tanque agitado y aireado de 3 L (BioFlo 115 New Brunswick Scientific Co., USA), equipado con deflectores laterales y agitador con paletas tipo Rushton. La concentración de oxí-

geno disuelto se determinó mediante una sonda. Las muestras se extrajeron periódicamente en condiciones estériles para determinar la concentración de biomasa. El medio de cultivo (2 l) se inoculó con un 3% (v/v) (DO 0,5) de MT1A3 y se mantuvo a 200 rpm durante 6 días, sin control del pH.

Medición de la biomasa

El crecimiento bacteriano se estimó por peso seco (g/L). Para ello, se tomó una alícuota de 18 mL de cultivo. La muestra se centrifugó a 4°C y 13.500 rpm durante 15 minutos. El pellet se secó a 100 °C en una estufa hasta peso constante.

Ensayos de bioaumentación en microcosmos

Caracterización del suelo

El suelo contaminado con hidrocarburos fue tomado dentro del predio de la refinería RHASA. La muestra fue tomada de la capa superficial (hasta 20 cm de profundidad) y se tamizó con una malla de 10 mm. El contenido de agua se determinó por gravimetría secando las muestras a 105°C hasta peso constante. El pH del suelo se midió sobre una mezcla suelo-agua (1:2) después de 30 min. de reposo, empleando un pH-metro. El análisis del tamaño de las partículas se realizó mediante una combinación de tamizado en húmedo (arena) y sedimentación (limo y arcilla) (Gee y Baude, 1986).

Diseño de microcosmos

El suelo contaminado con hidrocarburos se dispuso en frascos cilíndricos de vidrio (60 mm de diámetro y 360 ml de volumen), cada uno de los cuales contenía 200 g de suelo. Se llevaron a cabo dos tratamientos: atenuación natural como control (C) y bioaumentación (MT1A3), por triplicado. El cultivo de *Pseudomonas MT1A3* cosechado del biorreactor se empleó para inocular el suelo, con el fin de lograr una concentración de 1×10^8 UFC/g de suelo seco en el sistema de bioaumentación. Los frascos se mantuvieron a temperatura ambiente (20-25°C) durante dos meses y se tomaron muestras cada 20 días. El contenido de cada frasco se mezcló asépticamente una vez a la semana y se controló la humedad mediante la adición de agua cuando fue necesario (Conde Molina et al., 2019a).

Actividad biológica

Se colocó 1 g de muestra en 100 ml de NaCl al 0,9 %. Se realizaron diluciones seriadas de suelo, las cuales se sembraron en placas de Petri conteniendo agar-LB, evaluando el crecimiento de las bacterias aeróbicas heterótrofas totales (BAHT). Para realizar el recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) las diluciones se sembraron en placas con agar-SMS + 100µl de una mezcla de hidrocarburos, y se incubaron a 25° C durante 3 días. Los resultados del recuento fueron expresados como unidades formadoras de colonias por gramo de peso seco (UFC/ g) (Brock & Madigan 2015).

Determinación de hidrocarburos

Para la cuantificación de hidrocarburos, se trataron muestras de suelo extraídas con diclorometano y se analizaron mediante un cromatógrafo gaseoso GC-2010 Plus (Shimadzu, Corp., Japón) según Conde Molina et al. (2019a). Tanto la concentración de hidrocarburos totales (HT) como la

concentración de los analitos se determinaron mediante el uso de los estándares 50.16.512 Gravimetric Standard DHA Classis (PAC) y Alcanes Mix C8-C40 (Accustandard).

RESULTADOS

Diseño experimental estadístico

Con el fin de optimizar la producción de biomasa de *Pseudomonas sp. MT1A3* se realizaron dos DFC de manera consecutiva, en donde se analizaron los efectos del aceite de maní como fuente carbono, NaNO_3 como fuente nitrógeno, KH_2PO_4 como fuente fósforo, la temperatura y el tiempo de incubación. Los factores que influyeron significativamente ($p < 0,05$) en la producción de biomasa fueron la concentración de aceite de maní, la concentración de NaNO_3 y la temperatura. También, las interacciones aceite de maní- NaNO_3 y aceite de maní-temperatura mostraron efecto sobre la respuesta ($p < 0,05$). El resto de variables ensayadas, en los rangos seleccionados, no fueron significativas para la producción de biomasa de *Pseudomonas sp. MT1A3*.

A continuación las variables significativas fueron estudiadas mediante DBB para maximizar la respuesta. Los resultados mostraron que (Figura 1) los valores 18,69 g/L de aceite de maní, 2,39 g/L de NaNO_3 y 26,0 °C de temperatura fueron los óptimos para la producción de biomasa de *Pseudomonas sp. MT1A3*. El modelo presentó un coeficiente de determinación (R^2) 0,950, y el valor de F significativo indicó que los resultados obtenidos a partir del modelo fueron significativos ($P < 0,01$) para la respuesta. De esta manera, el medio de producción optimizado consistió en (g/L): AMC (18,7); NaNO_3 (2,4); KH_2PO_4 (1,5); Na_2HPO_4 (0,5); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,0011); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,0132), incubado a 26 °C.

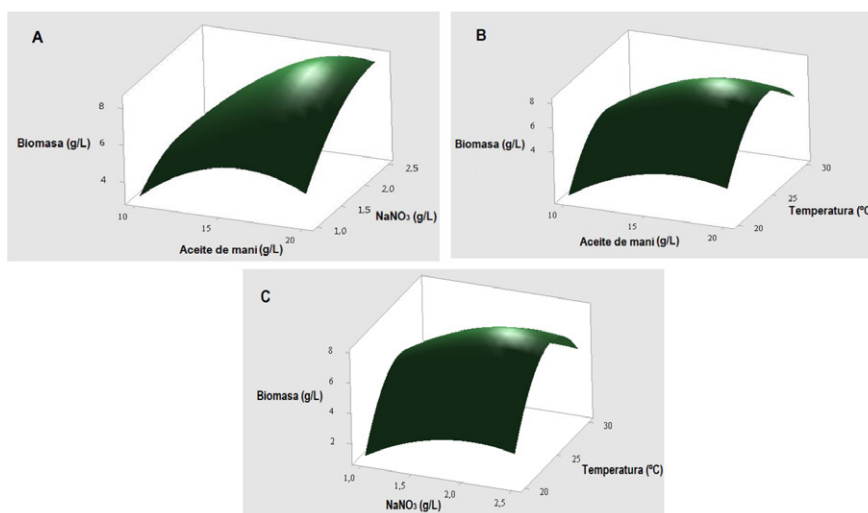


Figura 1. Producción de biomasa de *Pseudomonas sp. MT1A3* (g/L) como función de A) aceite de maní crudo (AMC) y NaNO_3 , B) aceite de maní crudo (AMC) y temperatura, C) NaNO_3 y temperatura.

El modelo optimizado fue validado en ensayos de erlenmeyers, obteniéndose $8,95 \pm 0,20$ g/L de biomasa a los 5 días de incubación (Figura 2). De esta manera, se demuestra que el modelo

matemático se ajusta adecuadamente al ensayo experimental. Asimismo, se observó que el proceso optimizado mostró un aumento de la producción de biomasa de *Pseudomonas sp. MT1A3* de 22,77%, en comparación con las condiciones del proceso original del cual se parte en este trabajo (7,29 g/l \pm 0,16 g/L).

Escalado en biorreactor

Un bioproceso llevado a cabo en un biorreactor ofrece varias ventajas en comparación con el frasco agitado. Esto se debe a un mejor control de los parámetros del proceso en donde se destacan: el control de la aireación, una mejor mezcla de los nutrientes, la transferencia de calor y oxígeno. En nuestro estudio se obtuvo un aumento de 10% de biomasa en el biorreactor en comparación con el erlenmeyer en condiciones similares a los 5 días de cultivo, siendo 9,67 \pm 0,10 g/L (Figura 2). Además, la curva de crecimiento microbiano mostró que la fase lag fue menor a 1 día, alcanzando la fase estacionaria a los 4 días en el biorreactor. Mientras que en condiciones de erlenmeyer el cultivo presentó una fase lag de 1 día y requirió 5 días para llegar a la fase estacionaria. Los parámetros cinéticos para la producción de biomasa fueron $\mu_{\max} = 0,13\text{h}^{-1}$ y $td = 5,33\text{h}^{-1}$ para el biorreactor, siendo que para el frasco agitado fueron $\mu_{\max} = 0,10\text{h}^{-1}$ y $td = 6,93\text{h}^{-1}$. Con lo cual en el biorreactor se logró un incremento del ~26 % de la velocidad de crecimiento de *Pseudomonas sp. MT1A3*.

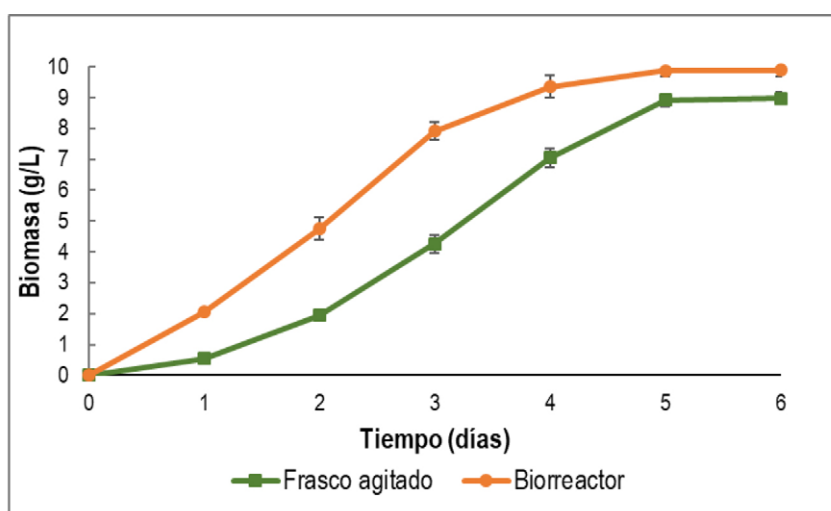


Figura 2. Crecimiento de *Pseudomonas sp. MT1A3* (g/L) en condiciones de cultivo optimizadas en erlenmeyer y en biorreactor.

Ensayos de bioaumentación en microcosmos

Se evaluó la estrategia de bioaumentación empleando *Pseudomonas MT1A3* en sistemas de microcosmos para el estudio de remoción de hidrocarburos en muestras de suelo crónicamente contaminado por hidrocarburos. El suelo utilizado en este estudio presentó una textura franco-arenosa (8,6% de arcilla, 16,1% de limo y 75,9% de arena). El pH fue de 8,1 y el contenido de agua de 40%. Este suelo mostró una concentración inicial de 7.432 \pm 253 ppm de HT.

Se ensayaron dos condiciones de microcosmos, la atenuación (C) y el bioaumentación (MT1A3). La temperatura del suelo fue 23,2 \pm 4,1 °C durante el experimento. La humedad controlada fue

de $39,27 \pm 2,25$ %, sin diferencias significativas ($p > 0,05$) durante el ensayo para los dos tratamientos. En el caso del pH, se observó que disminuyó de $8,07 \pm 0,04$ a $7,16 \pm 0,03$ para ambas condiciones.

El efecto de los dos tratamientos mostró que los recuentos de BAHT aumentaron entre uno (microcosmos MT1A3) y dos (microcosmos C) órdenes de magnitud a lo largo del ensayo (Figura 3). Los valores finales de recuento de BAHT (a los 60 días) fueron $2,36 \times 10^8$ UFC g^{-1} para los microcosmos C y $5,97 \times 10^8$ UFC g^{-1} para los microcosmos MT1A3, sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$). Los recuentos de BDH en los microcosmos C aumentaron de $7,57 \times 10^5$ UFC g^{-1} a $1,48 \times 10^7$ UFC g^{-1} , mientras que los microcosmos MT1A3 tendieron a estabilizar los niveles de BDH a lo largo del estudio, registrándose entre $2,13 \times 10^7$ UFC g^{-1} y $4,77 \times 10^7$ UFC g^{-1} . Al final del ensayo las BDH fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) en microcosmos MT1A3.

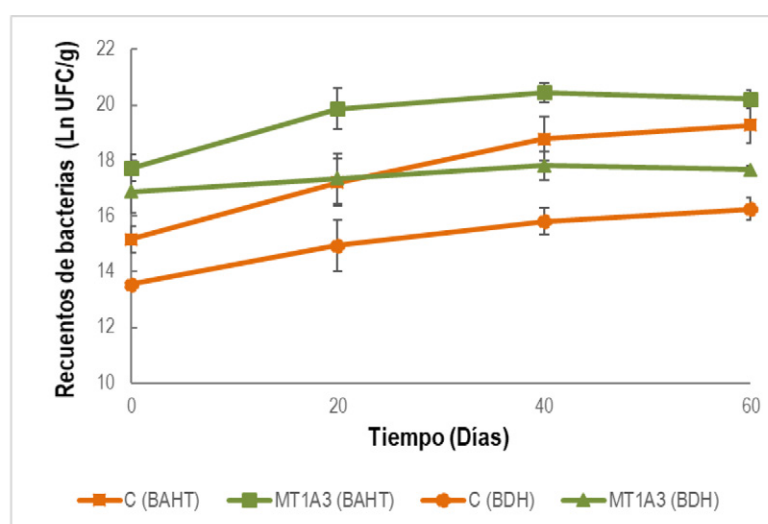


Figura 3. Recuentos de bacterias aeróbicas heterótrofas (BAHT) y de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) durante el ensayo de microcosmos con dos condiciones: atenuación natural (C) y bioaumentación (MT1A3).

Los cambios en la concentración de HT se muestran en la Figura 4 y se observa una importante disminución en la concentración de hidrocarburos en los microcosmos C y MT1A3 al final de los 60 días, siendo 902 ppm y 449 ppm de HT respectivamente. Estos resultados representaron una diferencia significativa ($P < 0,001$) entre los tratamientos. Considerando las concentraciones de HT obtenidas a lo largo del ensayo, la mayor diferencia de porcentaje de degradación de hidrocarburos entre los tratamientos se observó a los 40 días, tiempo en el que el bioaumentación consiguió una reducción del 80,86% frente al 62,26% de la atenuación natural. Aunque el microcosmos C mostró una alta reducción de HT, el análisis estadístico indicó una diferencia significativa ($P < 0,001$) de eliminación de HT entre los microcosmos MT1A3 y los microcosmos C a lo largo de todo el ensayo.

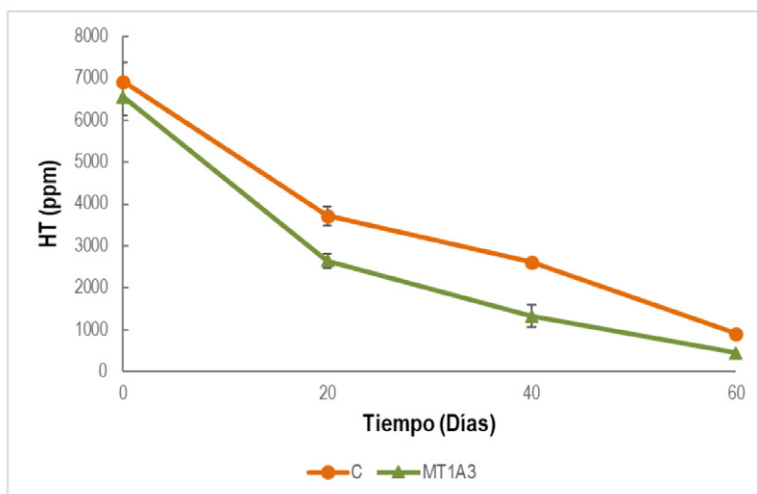
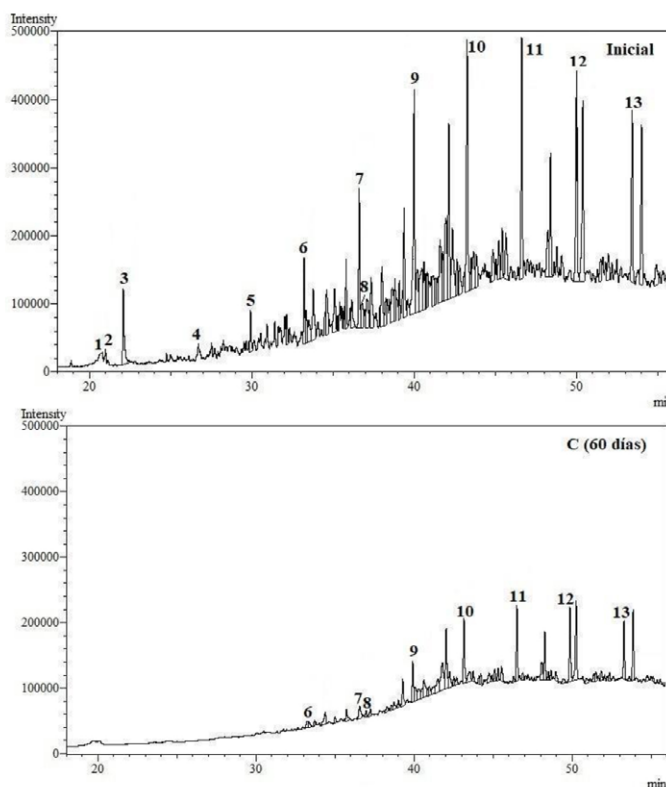


Figura 4. Concentración de hidrocarburos totales (HT) durante el ensayo de microcosmos con dos condiciones: atenuación natural (C) y bioaumentación (MT1A3).

Asimismo, durante la detección de la presencia de hidrocarburos en los ensayos de microcosmos, se pudieron identificar varios picos (Figura 5). Al comienzo del ensayo (día 0) se reportaron 13 compuestos de hidrocarburos, desde C8 a C18, n-octano, 1,2-dimetilciclohexano, 1,2-dimetilciclohexano, n-nonano, n-undecano, n-dodecano, n-tridecano, pentametilbenceno, n-tetradecano, n-pentadecano, n-hexadecano, n-heptadecano, n-octadecano. Al final de ambos tratamientos (60 días) no se detectaron los compuestos de C8 a C11, tales como n-octano, 1,2-dimetilciclohexano, 1,2-dimetilciclohexano, n-nonano, n-undecano.



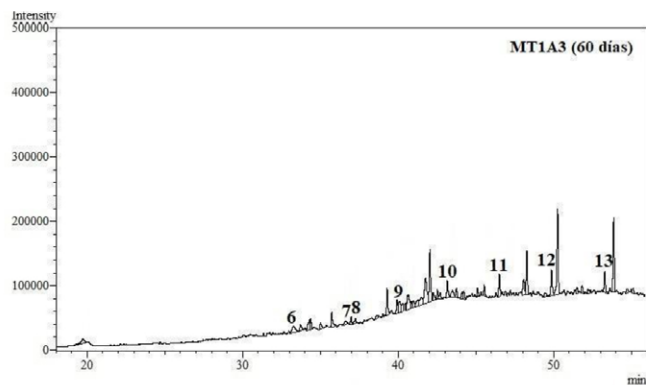


Figura 5. Cromatogramas de microcosmos al día 0 (Inicial), y a los 60 días para la atenuación natural (C) y el bioaumentación (MT1A3). Analitos: (1) n-octano, (2) 1t,2-dimetilciclohexano, (3) 1c,2-Dimetilciclohexano, (4) n-nonano, (5) n-undecano (6) n-dodecano, (7) n-tridecano, (8) pentametilbenceno, (9) n-tetradecano, (10) n-pentadecano, (11) n-hexadecano, (12) n-heptadecano, (13) n-octadecano.

En la Tabla 1 se observan las concentraciones (ppm) de los picos identificados. Estos analitos corresponden al 30 % de los HT del sistema inicial y aproximadamente el 50% de los HT de los sistemas a los 60 días. El perfil de degradación de estos compuestos de hidrocarburos por la acción de *Pseudomonas MT1A3* se correlaciona con resultados previamente publicados, donde la capacidad de degradación de esta bacteria se relaciona predominantemente a compuestos alcanos de C8 a C20 (Conde Molina 2019b).

Tabla 1. Concentración (ppm) de los analitos identificados al inicio (Inicial), y a los 60 días en atenuación natural (C) y en bioaumentación (MT1A3).

Analitos	Concentración (ppm)		
	Inicial	C	MT1A3
n-Octano	63,33	ND	ND
1t,2-Dimetilciclohexano	59,65	ND	ND
1c,2-Dimetilciclohexano	92,37	ND	ND
n-Nonano	40,97	ND	ND
n-Undecano	44,26	ND	ND
n-Dodecano	96,36	17,60	15,15
n-Tridecano	170,83	25,21	10,96
Pentametilbenceno	64,05	14,58	13,22
n-Tetradecano	359,53	51,65	25,79
n-Pentadecano	387,74	87,87	39,93
n-Hexadecano	343,20	102,63	42,32
n-Heptadecano	318,43	95,51	45,31
n-Octadecano	252,54	74,60	40,32
Total	2293,27	469,65	233,00

ND: no detectado

DISCUSIÓN

Este estudio ofrece conocimientos sobre la aplicación de *Pseudomonas sp. MT1A3* como inóculo en estrategias de biorremediación para el saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos. En primera instancia la optimización de la composición del medio de cultivo y las condiciones de incubación permitieron maximizar la producción de biomasa. Los factores que presentaron influencia significativa en la respuesta fueron la concentración del aceite de maní como fuente de carbono, la concentración del NaNO_3 como fuente de nitrógeno y la temperatura de incubación, los cuales pudieron ser optimizados. El diseño Box Behnken validado en un experimento en erlenmeyer permitió obtener una biomasa de *Pseudomonas sp. MT1A3* de acuerdo con los valores predichos. El uso de los diseños estadísticos mediante un número acotado de ensayos, y con el consecuente escalado en un biorreactor, permitió aumentar 35 % la producción demostrando que el diseño estudiado presenta la ventaja de que el medio incluye un co-producto agroindustrial de bajo costo (aceite de maní). El uso de este tipo de sustratos como fuente de carbono contribuye al desarrollo de un proceso sustentable y atractivo en términos de costo-beneficio (Liguori et al., 2013).

Este estudio presenta un enfoque estratégico para la biorremediación sitio específica, ya que *Pseudomonas MT1A3* es un microorganismo autóctono aislado de suelos crónicamente contaminados por hidrocarburos, la cual presentó una alta capacidad remoción de hidrocarburos. Al ser ensayada como inóculo en la estrategia de bioaumentación en un sistema de microcosmos logró degradar el 93,52% de HT a los 60 días. Incluso, se demostró la capacidad de degradación de compuestos alcanos de C8 a C20. Si bien los estudios de bioaumentación son sitio-específicos, el grado de degradación de HT obtenido es comparable a publicaciones previas que reportan la biorremediación de hidrocarburos mediante bioaumentación (Nwankwegu y Onwosi, 2017; Varjani 2015). Por otra parte, la atenuación natural mostró una buena tasa de degradación de HT (86,98% a los 60 días), probablemente como resultado de los procesos abióticos y de la actividad biológica de la microbiota del suelo ya adaptada, lo que comúnmente se considera como el principal mecanismo de eliminación natural de contaminantes (Declercq, 2012). Esto resulta razonable ya que el estudio de microcosmos se ensayó con un suelo crónicamente contaminado, el cual presentaría comunidades microbianas autóctonas adaptadas.

En base a la información presentada, será necesario seguir estudiando el proceso de biorremediación para lograr la óptima biodegradación de hidrocarburos en los suelos contaminados, en función del costo, beneficio y tiempo de recuperación del suelo.

CONCLUSIONES

La aplicación de *Pseudomonas sp. MT1A3*, aislada de un suelo crónicamente contaminado por hidrocarburos en la zona petroquímica de Zárate-Campana en la provincia de Buenos Aires, Argentina, presenta potencial para ser aplicada en la técnica de bioaumentación, lo cual resulta ser una alternativa prometedora combinada con una estrategia de bioestimulación para remediar los suelos del sitio de estudio.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó en el marco de un convenio entre la empresa RHASA y la Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Delta, Campana, Buenos Aires, Argentina, y fue financiada por los subsidios IPUTNDE0003640 e IPUTNDE0004532 de la Universidad Tecnológica Nacional.

REFERENCIAS

AZUBUIKE C.C., CHIKERE C.B., OKPOKWASILI G.C. (2016). Bioremediation techniques-classification based on site of application.Principles, advantages, limitations and prospects. World J Microbiol Biotechnol32: 180.

BOX G.E.P., BEHNKEN D.W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. Technometrics 2: 455.

BROCK T.D., MADIGAN M.T. (2015).Biología de los microorganismos. Pearson Educación, Madrid, 2015.

CONDE MOLINA D., LIPORACE F., QUEVEDO C. (2019a). Development of bioremediation strategies based on the improvement of biomass production from isolated strains in hydrocarbon contaminated soils and their application in bioremediation technologies. Braz J Development 5, 7: 10708-10727.

CONDE MOLINA D. (2019b) Bioprocesos orientados al empleo de microorganismos autóctonos y su utilización en tecnologías de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Tesis de Doctorado. Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Buenos Aires.

DECLERCQ I., CAPPUYNS V., DUCLOS Y. (2012).Monitored natural attenuation (MNA) of contaminated soils: states of an art in Europe – a critical evaluation. Sci Tot Environ, 426: 393-405.

EL-ALAM I., VERDIN A., FONTAINE J., LARUELLE F., CHAHINE R., MAKLOUF H., SAHRAOUI A.L.H. (2018). Ecotoxicity evaluation and human risk assessment of an agricultural polluted soil. Environ Monit Assess 190, 738.

FARAG S., SOLIMAN N.A., ABDEL-FATTAH Y.R. (2018). Statistical optimization of crude oil bio-degradation by a local marine bacterium isolate *Pseudomonas sp.* 48. J Genet Eng Biotechnol 16: 409–420.

FOCHESATO A.S., GALVAGNO M.A., DOG C., CERRUTI P., GONZALEZ PEREYRA M.L., FLORES M., CAVAGLIERI L. (2018).Optimization and production of probiotic and antimycotoxin yeast biomass using bioethanol industry waste via response surface methodology. Adv Biotechnol Microbiol 8, 1: 1-7.

GEE G.W., BAUDER J.W. (1986). Particle-size analysis, in *Methods of Soil Analysis*, A. Klute, ed., *Physical and Mineralogical Methods* American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison: 383-411.

GUARINO C., SPADA V., SCIARRILLO R. (2017). Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioaugmentation - Assisted Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. *Chemosphere* 170: 10–16.

JIANG Y., BRASSINGTON K.J., PRPICH G., PATON G.I., SEMPLE K.T., POLLARD S.J.T. COULON F. (2016). Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation. *Chemosphere* 161: 300–307.

JOHNSEN A.R., WICK L.Y., HARMS H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ Pollut* 133, 1:71–84.

KATAYAMA A., BHULA R., BURNS G.R., CARAZO E., FELSOT A., HAMILTON D. (2010). Bioavailability of xenobiotics in the soil environment. *Rev Environ Contam Toxicol* 203: 1–86.

LIPORACE F., QUEVEDO C., GIULIETTI A.M. (2012). Isolation of biosurfactant-producing microorganisms at the petrochemical area of Campana. *Biocell* 36: 97.

LIGUORI R., AMORE A., FARACO V. (2013). Waste valorization by biotechnological conversion into added value products. *Appl Microbiol Biotechnol*. 97: 6129-6147.

MARTINEZ ALVAREZ L.M., LO BALBO A., MAC CORMACK W.P., RUBERTO L. (2017). Bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated Antarctic soil: Optimization of a biostimulation strategy using response-surface methodology (RSM). *Cold Reg Sci Technol* 119: 61-67.

MONTGOMERY D.C. (2008). *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley, New York.

NWANKWEGU A.S., Onwosi C.O. (2017). Bioremediation of gasoline contaminated agricultural soil by bioaugmentation. *Environ Technol Innov*, 7: 1-11.

RABODINIRINA S., RASOLOMAMPIANINA R., KIER F., DRIDER D., MERHABY D., NET S., OUDDANE B. (2019). Degradation of fluorene and phenanthrene in PAHs-contaminated soil using *Pseudomonas* and *Bacillus* strains isolated from oil spill sites. *J Environ Manage* 232: 1–7.

RUBERTO L.A.M., DIAS R., LO BALBO A., VAZQUEZ S.C., HERNANDEZ E.A., MAC CORMACK W.P. (2009). Influence of nutrients addition and bioaugmentation on the hydrocarbon biodegradation of a chronically contaminated Antarctic soil. *J Appl Microbiol* 106: 1101–1110.

SEMPLE K.T., REID B.J., FERMER T.R. (2001). Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environ Pollut* 112, 2: 269–283.

STROUD J.L., PATON G.I., SEMPLE K.T. (2007) Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil. Implications for biodegradation and bioremediation. *J Appl Microbiol* 102, 5: 1239–1253.

VAN HAMME J.D., SINGH A., WARD O.N.W. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbial Mol Biol Rev* 67,4: 503-549.

VARJANI S.J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresour Technol* 223: 277–286.

VARJANI S.J., RANA D.P., JAIN A.K., BATEJA S., UPASANI V.N. (2015). Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. *Int Biodeter Biodegr*, 103: 116–124.

WHITFIELD J. (2003). Oil spills. How to clean a beach. *Nature* 422, 6931: 464–466.