

TESIS DOCTORAL

DOCTORADO EN INGENIERÍA
MENCIÓN EN TECNOLOGÍAS QUÍMICAS

Bioprocesos orientados al empleo de
microorganismos autóctonos y su utilización en
tecnologías de biorremediación de suelos
contaminados con hidrocarburos.

Autora: Débora Conde Molina

Director de Tesis: Dra. Carla Quevedo

Buenos Aires – 2019

"Caminando en línea recta no puede uno llegar muy lejos".

El Principito, Antoine de Saint-Exupéry.

Agradecimientos

A mi directora la Dra. Carla Quevedo por su dedicación y aportes en este trabajo, por sus contribuciones en cuanto a mi formación y sus consejos. Asimismo, por haberme brindado la oportunidad en lo profesional de continuar mi camino en la ciencia.

A la Dra. Ana María Giuliatti por haber orientado y acompañado este trabajo de investigación en todo momento.

Al Mg. Franco Liporace por compartir las tareas del laboratorio durante estos 5 años.

A la Dra. Susana Vázquez por su valiosa colaboración en la identificación genética que se llevó a cabo en esta tesis.

A la UTN FRD por haberme confiado un espacio dentro la institución y por brindarme la oportunidad de realizar los trabajos de investigación en el Laboratorio de Biotecnología.

A la UTN, institución que me ha otorgado una beca doctoral para el desarrollo de esta tesis.

A la empresa RHASA, por permitir generar un vínculo con la UTN FRD, con el fin de generar conocimientos que sean provechosos para la región local.

A mi familia, que representan el significado de cada día de mi vida. Con y por ellos recorrí el camino de doctorado, y eso me hace completamente feliz.

ÍNDICE

<i>Resumen</i>	1
<i>Abstract</i>	2

INTRODUCCIÓN

1. Hidrocarburos	3
1.1. Defición del petróleo	3
1.2. Tipo de hidrocarburos	3
1.3. Refinado del petróleo.....	5
1.4. Usos del petróleo	6
2. Circuito del petróleo en Argentina	7
2.1. Cuencas petrolíferas.....	7
2.2. Transporte y procesamiento del petróleo.....	9
3. Impacto ambiental del petróleo	10
3.1. Antecedentes de impacto ambiental en Argentina.....	12
3.2. Problemática regional	13
4. Biorremediación	14
4.1. Técnicas de recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos.....	14
4.2. Definición y consideraciones generales de la biorremediación.....	15
4.3. Ventaja y limitaciones de biorremediación	16
4.4. Microorganismos degradadores de hidrocarburos.....	17
4.5. Biodegradación de hidrocarburos	19
4.5.1. Biodegradación aerobia de hidrocarburos	19
4.5.2. Biodegradación anaerobia de hidrocarburos	21
4.5.3. Biodegradación por consorcios microbianos	21
4.6. Estrategias de biorremediación.....	22
4.6.1. Atenuación natural	22
4.6.2. Bioaumentación.....	23
4.6.3. Bioestimulación.....	24

4.6.4. Biosurfactantes	25
5. Empleo de residuos agroindustriales	27
Descripción del problema	29
Hipótesis	31
Objetivos.....	33
 MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Cepas	35
2. Conservación de las cepas	35
3. Identificación bioquímica y genética de las cepas	35
3.1. Identificación bioquímica	35
3.2. Susceptibilidad a antibióticos	36
3.3. Identificación genética.....	36
4. Estudio de las cepas en cultivo líquido	37
4.1. Medios de cultivos.....	37
4.2. Condiciones de los medios de cultivos	37
4.2.1. Crecimiento de las cepas en hidrocarburos y glicerol.....	37
4.2.2. Crecimiento de MT1A3 utilizando diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno	38
4.2.3. Crecimiento de MT1A3 a distintas concentraciones de hidrocarburos y temperaturas de incubación	40
4.2.4. Biodegradación de hidrocarburos por MT1A3	40
4.3. Métodos analíticos empleados en los cultivos líquidos.....	41
4.3.1. Medición de biomasa y pH.....	41
4.3.2. Medición de la tensión superficial.....	41
4.3.3. Análisis del perfil de degradación de hidrocarburos en cultivo líquido.....	41
5. Optimización del medio de cultivo para la producción de biomasa.....	43
5.1. Diseños experimentales estadísticos.....	43
5.1.1. Diseños de selección	43

5.1.2. Diseños de optimización	44
6. Microcosmos	44
6.1. Muestreo, procesamiento y almacenamiento del suelo	44
6.2. Caracterización del suelo	45
6.2.1. Determinación de humedad y de la pérdida por ignición.....	45
6.2.2. Determinación de la capacidad de retención de agua.....	46
6.2.3. Determinación del pH	46
6.2.4. Área superficial y tamaño de la partícula del suelo.....	47
6.3. Diseño de los sistemas de microcosmos	47
6.4. Métodos analíticos empleados en los microcosmos	50
6.4.1. Análisis microbiológico	50
6.4.2. Análisis de la degradación de hidrocarburos en suelo	50
7. Análisis estadístico de los resultados	52

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Identificación de las cepas	53
1.1. Identificación bioquímica y susceptibilidad a antibióticos	53
1.2. Identificación genética	58
2. Estudio de las cepas en cultivo líquido	62
2.1. Evaluación del crecimiento de las cepas, previamente identificadas, con hidrocarburos y/o glicerol como fuente de carbono.	62
2.2. Evaluación de la influencia sobre el crecimiento de MT1A3 de fuentes de carbono y de nitrógeno.....	67
2.3. Evaluación del crecimiento a distintas concentraciones de hidrocarburos y temperaturas de incubación.....	70
2.4. Estudio de la biodegradación de las diferentes fracciones de los hidrocarburos por parte de MT1A3.	73
3. Optimización de producción de biomasa	84
3.1. Diseños de selección	84

3.2. Diseños de optimización	90
3.3. Validación del medio optimizado.....	93
4. Microcosmos	95
4.1. Características del suelo	95
4.2. Microcosmos I.....	96
4.3. Microcosmos II.....	102
4.4. Microcosmos III	108
CONCLUSIONES.....	115
BIBLIOGRAFÍA.....	117
Trabajos publicados.....	137

Tabla 1. Fracciones que se pueden obtener durante el proceso de destilación fraccionada del petróleo crudo.....	6
Tabla 2. Fuentes de carbono empleadas para la evaluación del crecimiento de MT1A3.	39
Tabla 3. Sistemas de microcosmos I	48
Tabla 4. Sistemas de microcosmos II	48
Tabla 5. Sistemas de microcosmos III.....	48
Tabla 6. Identificación bioquímica de las cepas con API 20 NE.	55
Tabla 7. Identificación bioquímica de las cepas con API 20 Strep.	56
Tabla 8. Identificación bioquímica de las cepas con API Coryne.....	57
Tabla 9. Susceptibilidad antimicrobiana (sensible (S) o resistente (R)) de las cepas por el método de difusión de discos en agar, empleando diversos antibióticos.	58
Tabla 10. Identificación genética de las cepas, a partir de secuencias del gen ARNr 16S.	59
Tabla 11. Biomasa, pH y TS de los cultivos, en medios con 2 % de HC, medidos a los 5 días de incubación.....	64
Tabla 12. Biomasa, pH y TS de los cultivos, en medios con 4,5 % de HC, medidos a los 5 días de incubación.....	64
Tabla 13. Biomasa, pH y TS de los cultivos, en medios con 2 de glicerol, medidos a los 5 días de incubación.....	66
Tabla 14. Biomasa y pH de los cultivos de MT1A3, en distintas fuentes de carbono.	68
Tabla 18. Biomasa, pH y TS de los cultivos de MT1A3, en medios con 2; 4,5; 20 y 50 % de HC, mantenidos a 25 °C.	72

Tabla 19. Concentración (ppm) de hidrocarburos totales (HT) en los controles y cultivos de MT1A3, evaluados en distintas fuentes de hidrocarburos, HC, diesel, kerosene y nafta; a los 0, 5 y 10 días de incubación.	74
Tabla 20. Concentración (ppm) de los analitos identificados al inicio y a los 10 días en el ensayo con HC, evaluados en el control y en el cultivo inoculado con MT1A3.	81
Tabla 21. Concentración (ppm) de los analitos identificados al inicio y a los 10 días en el ensayo con diesel, evaluados en el control y en el cultivo inoculado con MT1A3.....	82
Tabla 22. Concentración (ppm) de los analitos identificados al inicio y a los 10 días en el ensayo con kerosene, evaluados en el control y en el cultivo inoculado con MT1A3.....	82
Tabla 23. Concentración (ppm) de los analitos identificados al inicio y a los 10 días en el ensayo con nafta, evaluados en el control y en el cultivo inoculado con MT1A3.....	83
Tabla 24. Factorial completo I. Matriz experimental con los valores codificados (C) y reales (R), en las unidades correspondientes para cada una de las variables estudiadas. La respuesta medida fue biomasa (g/L).....	85
Tabla 25. Análisis de regresión del diseño factorial completo I para biomasa. El modelo se ajustó según la función polinómica de primer grado $Y = b_0 + b_i x_i$, donde Y es la respuesta observada, b_0 es el intercepto y b_i es el i -ésimo coeficiente de regresión. Los factores fueron AMC, NaNO_3 y KH_2PO_4 . * significancia con un valor de $P < 0,05$	86
Tabla 26. Análisis estadístico del diseño factorial completo I para biomasa. Análisis del modelo aplicado mediante ANOVA. FC: falta de correlación, EP: error puro.....	86
Tabla 27. Factorial completo II. Matriz experimental con los valores codificados (C) y reales (R), en las unidades correspondientes para cada una de las variables estudiadas. La respuesta medida fue biomasa (g/L).....	88
Tabla 28. Análisis de regresión del diseño factorial completo II para biomasa. El modelo se ajustó según la función polinómica de primer grado $Y = b_0 + b_i x_i$, donde Y es la respuesta observada, b_0 es el intercepto y b_i es el i -ésimo coeficiente de regresión. Los factores fueron: AMC, NaNO_3 , temperatura, tiempo. * significancia con un valor de $P < 0,05$	89

Tabla 29. Análisis estadístico del diseño factorial completo II para biomasa. Análisis del modelo aplicado mediante ANOVA. FC: falta de correlación, EP: error puro.....	89
Tabla 30. Matriz experimental del diseño Box Behnken utilizado para la optimización de la producción de biomasa de MT1A3.	91
Tabla 31. Análisis de regresión del diseño <i>Box Behnken</i> para la biomasa de MT1A3. El modelo se ajustó según la función polinómica de segundo grado $Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2$, donde Y es la respuesta observada, β_0 es el intercepto, β_i es el <i>i</i> -ésimo coeficiente de regresión lineal, β_{ij} es el <i>i,j</i> -ésimo coeficiente interactivo y β_{ii} es el <i>i</i> -ésimo coeficiente cuadrático. Los factores fueron: AMC, NaNO ₃ , temperatura. * significancia con un valor de $P < 0,05$	92
Tabla 32. Análisis estadístico del diseño Box Behnken para la biomasa de MT1A3. Análisis del modelo interactivo-cuadrático por ANOVA. FC: falta de correlación, EP: error puro	92
Tabla 33. Contenido porcentual de agua, pérdida por ignición, capacidad de campo, pH, área superficial y distribución del volumen del suelo (en %) según los distintos tamaños de partículas del suelo en estudio.	95
Tabla 34. Microcosmos I. Concentración (ppm) de los analitos identificados al inicio, y a	101
Tabla 35. Microcosmos II. Concentración (ppm) de los analitos identificados al inicio, y a los 120 días en atenuación natural (C), bioestimulación N,P (B), bioaumentación MT1A3 (MT1A3), bioaumentación Mix (Mix), bioaumentación MT1A3 + bioestimulación N,P (MT1A3 + B), bioaumentación con Mix + bioestimulación N,P (Mix + B).....	107
Tabla 36. Microcosmos III. Concentración (ppm) de los analitos identificados al inicio, y a los 120 días en atenuación natural (C), bioestimulación N,P (B), bioaumentación MT1A3 (MT1A3), bioaumentación Mix (Mix), bioaumentación MT1A3 + bioestimulación N,P (MT1A3 + B), bioaumentación con Mix + bioestimulación N,P (Mix + B).....	113

Figura 1. Cuencas sedimentarias en Argentina. Fuente Kaindl 2009.	8
Figura 2. Red de oleoductos, poliductos y rutas marítimas para transporte primario de crudo y derivados en Argentina. Fuente Kaindl 2009.	9
Figura 3. Piletas de recolección de suelos contaminados con hidrocarburos, para disposición final.	45
Figura 4. (A) Crecimiento celular de las cepas en MSM + HC (2%), y (B) tensión superficial de los sobrenadantes de los cultivos, en el transcurso de 5 días de incubación.	65
Figura 5. (A) Crecimiento celular de las cepas en MSM + HC (4,5%), y (B) tensión superficial de los sobrenadantes de los cultivos, en el transcurso de 5 días de incubación.	65
Figura 6. (A) Crecimiento celular de las cepas en MSM + glicerol (2%), y (B) tensión superficial de los sobrenadantes de los cultivos, en el transcurso de 5 días de incubación.	67
Figura 7. Crecimiento celular de MT1A3 en medio MSM suplementado con 2; 4,5; 20 y 50 % de HC; a 20 °C (A) y 25 °C (B).	71
Figura 8. Crecimiento celular (g/L) de MT1A3 en medio MSM suplementado con HC (4,5 %), diesel (1,5 %), kerosene (1,5 %) o nafta (1,5 %); medido a los 5 y 10 días de incubación.	73
Figura 9. Cromatogramas de cultivos con HC, A) control día 0, B) control 10 días, C) MT1A3 10 días.	77
Figura 10. Cromatogramas de cultivos con diesel, A) control 0 día, B) control 10 días, C) MT1A3 10 días.	78
Figura 11. Cromatogramas de cultivos con kerosene, A) control 0 día, B) control 10 días, C) MT1A3 10 días.	79
Figura 12. Cromatogramas de cultivos con nafta, A) control 0 día, B) control 10 días, C) MT1A3 10 días.	80
Figura 13. Factorial completo I. Efecto de la concentración de AMC y de NaNO ₃ para la respuesta de biomasa (g/L), según los niveles -1 y 1 (azul), y el nivel central (rojo).	87

Figura 14. Factorial completo II. Efecto de la concentración de AMC y de NaNO ₃ , de la temperatura, y de las interacciones AMC - NaNO ₃ y AMC – Temperatura, para la respuesta de biomasa (g/L), según los niveles -1 y 1 (azul), y el nivel central (rojo).....	90
Figura 15. Producción volumétrica de biomasa como función de (A) AMC y NaNO ₃ , (B) AMC y temperatura, (C) NaNO ₃ y temperatura.	93
Figura 16. Microcosmos I, compuesto por atenuación natural (microcosmo A) y bioaumentación con MT1A3 (microcosmo B).....	97
Figura 17. Microcosmos I. Humedad (%), recuento de bacterias (ln CFU/g) BHAT y BDH, concentración de HT (ppm), para control abiótico (microcosmo A) y bioaumentación con MT1A3 (microcosmo B), durante 100 días.....	99
Figura 18. Cromatogramas de microcosmos I: a) control 0 día, b) atenuación natural (microcosmo A) a los 100 días, b) bioaumentación con MT1A3 (microcosmo B) a los 100 días.	100
Figura 19. Diseño experimental de Microcosmos II.	102
Figura 20. Microcosmos II. Determinación de humedad (%), pH, bacterias (ln CFU/g) BAHT y BDH, concentración de HT (ppm), en microcosmos II, durante 120 días	105
Figura 21. Cromatogramas de microcosmos II: al inicio del ensayo, control atenuación natural (C), bioestimulación (B), bioaumentación con MT1A3 (MT1A3), bioaumentación con mix (Mix), bioaumentación con MT1A3 + bioestimulación (MT1A3 + B), bioaumentación con Mix + bioestimulación (Mix + B), a los 120 días.	106
Figura 22. Determinación de humedad (%), pH, bacterias (ln UFC/g) BAHT y BDH, concentración de HT (ppm), en microcosmos III, durante 120 días.	111
Figura 23. Cromatogramas de microcosmos III: al inicio del ensayo, control atenuación natural (C), bioestimulación (B), bioaumentación con MT1A3 (MT1A3), bioaumentación con mix (Mix), bioaumentación con MT1A3 + bioestimulación (MT1A3 + B), bioaumentación con Mix + bioestimulación (Mix + B), a los 120 días.	112

ANOVA	Análisis de la varianza
AMC	Aceite de maní crudo
BDH	Bacterias degradadoras de hidrocarburos
BHAT	Bacterias heterotróficas aerobias totales
BTEX	Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno
C1-C10	Compuestos de 1 a 10 carbono
DO	Densidad óptica
CG	Cromatografía gaseosa
g/L	Gramos por litro
HC	Mezcla de nafta, kerosene, diesel
HT	Hidrocarburos totales
LB	Medio de Luria-Bertani
mL	Mililitros
Min	Minutos
MSM	Medio salino mínimo
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
TS	Tensión superficial
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
µg	Microgramos
% v/v	Porcentaje volumen - volumen
°C	Grados centígrados

Es frecuente la contaminación ambiental generada por el petróleo o sus derivados, debido al uso generalizado de los mismos a nivel mundial. La descarga y derrame accidental de dichos compuestos en el medio ambiente resultan ser peligrosos para el entorno y los seres vivos. La biorremediación es una estrategia eficiente para limpiar sitios contaminados, siendo no invasiva y rentable. La misma se basa en la biodegradación natural utilizando microorganismos nativos aislados de áreas contaminadas. El centro industrial Zárate-Campana, ubicado en Buenos Aires, representa una de las áreas petroquímicas más importantes de Argentina, con varias empresas que realizan actividades petroquímicas. En este estudio, se seleccionaron 4 cepas previamente aisladas de sitios contaminados e identificadas dentro de los géneros *Pseudomonas sp.*, *Cellulosimicrobium sp.* y *Ochrobactrum sp.* La cepa MT1A3 perteneciente al género *Pseudomonas* fue seleccionada para los ensayos de optimización de la producción de biomasa a partir del uso de diferentes fuentes de carbono que van desde una mezcla de hidrocarburos hasta co-productos agroindustriales de bajo costo. MT1A3 fue capaz de crecer en una mezcla de hidrocarburos obteniéndose 1,79 g/L de biomasa a 25 °C a los 7 días de cultivo. Al comparar el uso de diferentes co-productos agroindustriales como fuente alternativa de carbono, la producción de biomasa fue significativamente mayor en el aceite de maní crudo en comparación con todos los demás sustratos ($p < 0,05$), dando como resultado una biomasa de 7,29 g/L luego de 7 días de cultivo. La fuente de nitrógeno más eficiente para obtener biomasa de MT1A3 fue NaNO_3 . A partir de estos resultados, en sistemas de microcosmos se evaluó la efectividad de remediación mediante el monitoreo de la degradación de hidrocarburos en los diferentes tratamientos de atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación, durante 120 días. El mejor tratamiento, que involucró bioaumentación (MT1A3) y bioestimulación, mostró una degradación del 40,05% del total de hidrocarburos con respecto al tratamiento de atenuación natural utilizado como control.

Palabras claves: biorremediación, suelos contaminados, hidrocarburos.

Contaminated sites with petroleum compounds are frequently observed, requiring the development of innovative technologies for its remediation. The problem is caused due to the widespread usage of petroleum-based products. Their discharge and accidental spillage in the environment prove to be hazardous both to the surroundings and life forms. Bioremediation is an efficient strategy for cleaning up sites contaminated with organic pollutants. It is a non-invasive and cost-effective technique that relies on natural decontamination using microbes of isolated strains from contaminated areas for the clean-up of these petroleum hydrocarbons. The Zárate-Campana industrial center, located in Buenos Aires, represents one of the most important petrochemical areas in Argentina, with several companies carrying out petrochemical activities. In this study, 4 strains previously isolated from contaminated sites were screened and identified as *Pseudomonas sp*, *Cellulosimicrobium sp* and *Ochrobactrum sp*. A new approach using MT1A3, belonging to *Pseudomonas* genus in petroleum biodegradation from the use of different carbon and nitrogen sources was proposed to provide maximum biomass production and was evaluated for its degradation characteristics. MT1A3 grew in all carbon sources tested and was able to grow in a hydrocarbon mixture obtaining 1,79 g/L of biomass production at 25 °C after 7 days. When comparing the use of different low-cost agro-industrial co-products as an alternative carbon source, the biomass production was significantly higher in crude peanut oil in comparison to all other substrates ($p < 0,05$), thus resulting in a biomass of 7,29 g/L. The most efficient nitrogen source for obtaining biomass from MT1A3 was NaNO_3 . From these results, the effectiveness was evaluated by monitoring total hydrocarbons degradation of natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation treatments in microcosm design over a 120-day period. The best treatment, which involved bioaugmentation (MT1A3) and biostimulation strategies, showed a degradation of 40,05 % of total hydrocarbons with respect to the natural attenuation treatment used as control.

Keywords: bioremediation, contaminated soils, hydrocarbons.

INTRODUCCIÓN

1. Hidrocarburos

1.1. Definición del petróleo

El petróleo es un aceite mineral que se caracteriza por ser un líquido negro y viscoso. Su composición elemental está representada por 84-87 % de C, 11-14 % de H, 0-8 % de S, 0-4 % de O y N, y metales como el níquel, pudiendo contener miles de compuestos, básicamente de la familia de los hidrocarburos, los cuales constituyen 50-98 % de la composición. Los hidrocarburos contenidos en el petróleo comprenden desde el más sencillo como el metano (CH_4), hasta especies más complejas con 40 átomos de carbono (Kirk et al. 1998).

El petróleo, tal como se obtiene de los pozos de perforación, tiene muy pocas aplicaciones. Para obtener los diversos derivados es necesario someterlo a un proceso de refinamiento, cuya operación principal es la destilación fraccionada. En ella se obtienen, a distintas temperaturas, toda una gama de productos comerciales, sustancias gaseosas tales como metano, etano, propano y butano; líquidas como las gasolinas, el querosene y el fuelóleo; sólidas como las parafinas y los alquitranes (Speight 2014).

1.2. Tipo de hidrocarburos

La complejidad y la variedad de los hidrocarburos se deben a la capacidad que tiene el átomo de carbono de formar enlaces, lo que da lugar a moléculas lineales y cíclicas simples y complejas (Gray 1992). En función de su estructura química los hidrocarburos se pueden clasificar en los siguientes grupos:

- *Saturados*: Incluyen a los alcanos, los cuales son cadenas de carbono unidas por simple enlaces. Los alcanos son la familia más numerosa del crudo y se conocen como parafinas. Estos pueden ser lineales o ramificados, y su longitud varía de 1 a 40 átomos de carbono. Cuando estas cadenas forman estructuras cíclicas dan lugar a los cicloalcanos o cicloparafinas, de los cuales son componentes minoritarios del petróleo. Asimismo los compuestos saturados pueden agruparse en:
 - *Parafina volátiles*: Los alcanos lineales y ramificados constituyen la fracción del crudo que más se volatiliza, comprenden de 1 a 10 carbonos (C1-C10). En este grupo se incluye el gas licuado (C1 a C4) (Gray 1992).

- *Parafinas no volátiles*: Incluye los alcanos lineales y ramificados entre 10 y 40 carbonos (C10-C40). Los compuestos entre 11 y 15 carbonos (C11-C15) manifiestan una volatilidad media (Gray 1992).
- *Naftenos*: Corresponde a los cicloalcanos o cicloparafinas. Los ciclopentanos alquilados, principalmente los metilados, son los compuestos más predominantes de esta familia, pudiendo representar hasta el 30 % del crudo. En esta fracción hay desde monocíclicos hasta tetracíclicos (Gray 1992).
- *Insaturados*: Incluye los alquenos y alquinos que son cadenas lineales de carbono unidas por enlaces dobles y triples, respectivamente. Dentro de los hidrocarburos insaturados se encuentran:
 - *Oleofinas*: Representa los alquenos y apenas se los encuentra en el petróleo crudo, son más bien subproductos del proceso de craqueo, en ese caso su presencia representa desde 1 % en los combustibles hasta 20% en las gasolinas (Gray 1992).
- *Aromáticos*: Los compuestos aromáticos son derivados del benceno, ciclos donde los átomos de carbonos se unen por medio de enlaces simples y dobles enlaces alternados. Los anillos pueden encontrarse fusionados entre sí, dando lugar a los compuestos policíclicos aromáticos. Este grupo comprende los compuestos monoaromáticos y poliaromáticos, contribuyen entre el 10 y 25 % del petróleo crudo y representan ser la fracción más pesada. En el caso de los monoaromáticos representan un serio problema ambiental, debido a su toxicidad, solubilidad y volatilidad. Es la familia conocida como BTEX, constituida por benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (Tsao et al. 1998). En el caso de los poliaromáticos se encuentran naftaleno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzopireno, coroneno. En la mayoría de los suelos, los compuestos policíclicos aromáticos son fuertemente absorbidos a la materia orgánica del mismo, disminuyendo fuertemente la disponibilidad para ser biodegradados. Además, estos compuestos son de naturaleza no polares o muy débilmente polares, representando una baja solubilidad en el agua (Gray 1992).
- *Resinas*: Son sólidos polares formados por una multitud de grupos del tipo sulfóxidos, amida, tiofenos, piridinas, quinolinas y carbazones. Esta fracción presenta alto contenido de nitrógeno, azufre y oxígeno (Gray 1992).

- *Asfaltenos*: Están formados por compuestos más polares, como poliaromáticos, ácidos naftalénicos, sulfuros, compuestos polifenólicos, ácidos grasos, meloporfirinas y otros agregados de altos pesos moleculares. Representa la fracción menos abundante del crudo (Gray 1992).

1.3. Refinado del petróleo

El refinado del petróleo consiste en la separación del crudo en diferentes fracciones las cuales serán transformadas selectivamente en sus productos finales. La separación involucra el transporte por tuberías del crudo a través de hornos, dando como resultado líquidos y vapores los cuales pasan a las torres de destilación. Estas columnas están calientes en el fondo y a medida que se eleva la torre, la temperatura disminuye. Entonces el petróleo se separa en fracciones de acuerdo al peso molecular y punto de ebullición. Las fracciones más livianas, como la gasolina y el gas licuado, se vaporizan y se elevan a la parte más alta de la columna. El kerosene y el diésel se mantienen en la mitad de la torre, los líquidos pesados como gasoil y aceites lubricantes se separan en la parte baja, y por último, el residuo que son las fracciones más pesadas y que tienen un punto de ebullición más alto, se asientan en el fondo de la columna. Este residuo se destila nuevamente al vacío para obtener otro tipo de aceites lubricantes, ceras, parafinas y betunes asfálticos (alquitranes) (Kaindl 2011).

Las fracciones obtenidas pasan a otras áreas de la refinería donde algunas requieren tratamientos adicionales, siendo que la mayoría son procesadas para generar productos de mayor valor agregado. De esta manera los productos obtenidos varían en función del punto de ebullición (Tabla 1).

En el presente trabajo se trabajó principalmente con tres fracciones del refinado del crudo tales como nafta, kerosene y diésel; siendo éstas fuentes de hidrocarburos comerciales de común disponibilidad en el mercado.

- *Nafta*: La composición química de la nafta es difícil de definir con precisión, debido a que puede contener cantidades variables de sus constituyentes, como parafinas, naftenos, aromáticos y oleofinas; presentando puntos de ebullición desde 100 °C hasta aproximadamente 200 °C. Además, existen distintos grados de nafta, y se la conoce por tener un rango de ebullición y número de carbonos similares al de la gasolina, siendo un precursor de la misma. En el caso de la nafta el número de carbono de los compuestos van desde C8 al C12 (Speight 2002).

- *Kerosene*: Su composición es una mezcla compleja de parafinas, naftenos, aromáticos (principalmente alquilbencenos y alquilnaftalenos) y oleofinas (de 0,5 a 5 %). Presenta volatilidad intermedia entre la nafta y el diésel, que va desde 200 a 300 °C, los átomos de carbonos de sus compuestos incluyen desde C12 a C16 (Wang y Stout 2010).
- *Diesel*: Está constituido principalmente por parafinas, representando hasta un 75 %; y el otro 25 % los representan los hidrocarburos aromáticos, incluyendo naftalenos y alcalobencenos. El rango de ebullición es de aproximadamente de 200 a 350 °C, con números de carbonos desde C13 a C20 (Liang et al. 2005).

Tabla 1. Fracciones que se pueden obtener durante el proceso de destilación fraccionada del petróleo crudo.

Fracciones	Número de carbonos	Punto de ebullición (°C)	Usos
Gas licuado	C ₁ -C ₄	-160	Gas de uso doméstico
Gasolina	C ₅ -C ₁₁	30-200	Carburante
Nafta	C ₈ -C ₁₀	100-200	Carburante
Kerosene	C ₁₀ -C ₁₅	200-300	Carburante, iluminación
Gasoil, diesel	C ₁₄ -C ₂₀	200-350	Carburante
Aceite lubricantes	C ₁₆ -C ₂₀	200-350	Lubricante
Grasas, vaselinas	C ₁₈ -C ₂₂	250-400	Farmacéutica
Cera de parafinas	C ₂₀ -C ₄₅	245-540	Velas
Betún asfáltico	C ₃₀ -C ₄₅	>540	Alquitrán

1.4. Usos del petróleo

La venta del petróleo y sus derivados es un pilar fundamental del mercado mundial y la política exterior de varios países, ya que el petróleo es considerado una materia prima muy importante en el campo de los suministros energéticos. De hecho en el mundo, el petróleo, el gas natural y sus derivados, en estado gaseoso o líquido (naftas, gasoil, fuel oil, etc.), contribuyen con el 55 % de la energía utilizada en transporte, industrias, comercios y establecimientos residenciales; y en la Argentina ese porcentaje es aún mayor (Kaindl 2009).

Por otro lado, más del 90% de los productos y objetos que rodean al hombre son artificiales y, además, tienen un solo y único origen: provienen de las materias primas proporcionadas por el petróleo o el gas natural, o, lo que es lo mismo, de los subproductos que se obtienen de las plantas separadoras de gas y las refinerías de petróleo. Es así que el petróleo representa un papel muy significativo en la industria química (Kaindl 2009).

Los principales usos del petróleo pueden clasificarse a) como combustible doméstico e industrial; b) como carburante y lubricante; c) como materia prima básica en la industria petroquímica, siendo que el 60% de los productos químicos que se encuentran en el mercado y el 80% del sector orgánico proceden de la petroquímica. Por ejemplo, plásticos como el polietileno y el polipropileno, utilizados en embalajes de diversos productos, en autopartes, en la industria de la construcción como aislantes y cañerías, en juguetes, etc; fibras sintéticas (nylon, poliéster) que se emplean en la industria textil para reemplazar la lana y fibras de algodón; anticongelantes; detergentes, uno de ellos es el sulfonato de alquilbenceno lineal es un derivado del kerosene ampliamente utilizado en detergentes domésticos; cauchos sintéticos, fabricados a partir de la polimerización de diversos monómeros y reemplazando el caucho natural; colorantes, desarrollados para reemplazar colorantes naturales; explosivos; fibras plastificantes; fármacos; cosméticos (Kaindl M 2011). Por otro lado, la agricultura se beneficia con productos derivados del petróleo y del gas, principalmente fertilizantes nitrogenados (como la urea) y componentes de herbicidas e insecticidas. Asimismo, el asfalto, es un sólido o semisólido obtenido de la fracción más pesada de la destilación del petróleo y representa un componente básico para la pavimentación de caminos, y para impermeabilizar techos y estructuras, entre otros usos. Esta gran variedad de derivados contribuye a que hoy en día el petróleo sea un producto indispensable para la vida a nivel mundial (Kaindl M 2011).

2. Circuito del petróleo en Argentina

2.1. Cuencas petrolíferas

La Argentina tiene un total de reservas comprobadas de 457,7 millones de m³ de petróleo. Se han identificado 19 cuencas sedimentarias, de las cuales cinco se encuentran en explotación (Figura 1) (Kaindl 2009):

- Cuenca Noroeste: comprende las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Santiago del Estero y Formosa.
- Cuenca Cuyana: comprende las provincias de Mendoza (zona norte) y San Juan.
- Cuenca Neuquina: comprende las provincias de Neuquén, La Pampa, Río Negro y Mendoza (zona sur).
- Cuenca Golfo San Jorge: comprende las provincias de Chubut y Santa Cruz (zona norte), y la plataforma continental. Representa la cuenca más importante dado que concentra el 43% de las reservas de petróleo de la Argentina.
- Cuenca Austral: comprende las provincias de Santa Cruz (zona sur) y Tierra del Fuego, y la plataforma continental. Es la segunda cuenca en importancia ya que concentra el 36 % de las reservas de petróleo del país.

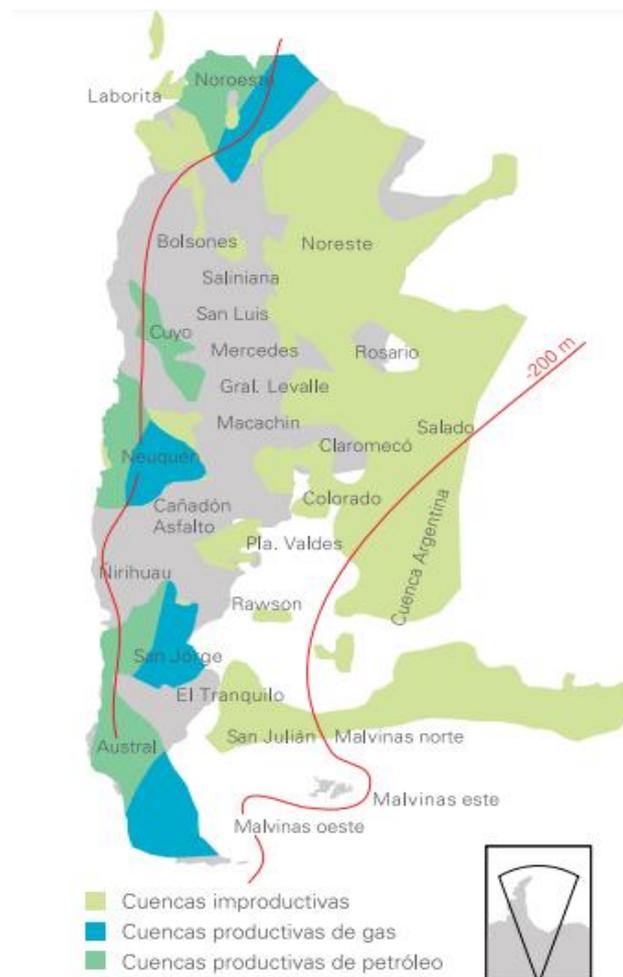


Figura 1. Cuencas sedimentarias en Argentina. Fuente Kaindl 2009.

2.2. Transporte y procesamiento del petróleo

El traslado de petróleo y sus derivados dentro de la Argentina se hace a través de oleoductos. Estas grandes tuberías son la manera más económica de transportar grandes cantidades de petróleo en tierra, pueden construirse sobre el terreno o en el subsuelo (a menos de 5 metros de profundidad).

La red de oleoductos en la Argentina es de gran extensión debido a la ubicación distante de las refinерías y de los puertos con respecto a los principales yacimientos de petróleo (Kaindl 2009). Los poliductos pueden transportar distintos tipos de petróleo crudo, kerosene, nafta, gasoil y gases licuados (Figura 2). Eventualmente, el transporte puede realizarse mediante camiones cisterna, buques o barcasas hasta las plantas de procesamiento.



Figura 2. Red de oleoductos, poliductos y rutas marítimas para transporte primario de crudo y derivados en Argentina. Fuente Kaindl 2009.

Los combustibles fósiles, en particular el petróleo y el gas, son la principal fuente de energía que utiliza la Argentina para la generación de combustible y electricidad, es así que el 95 % del crudo es transportado hasta las refinerías de petróleo donde se obtienen una amplia gama de productos como naftas, gasoil, fuel oil, kerosene, etc. También el transporte es dirigido a centrales termoeléctricas, instalaciones orientadas a producir calor mediante la combustión de hidrocarburos.

Otro destino del petróleo es la industria petroquímica, cuyas plantas industriales utilizan el petróleo como materias primas para la obtención de productos químicos. En Argentina, los productos petroquímicos básicos tienen como principal destino la elaboración de resinas plásticas, cosméticos, lubricantes, caucho, fibras sintéticas, detergentes, insecticidas y fertilizantes, entre otros productos.

Es así que se generan los polos petroquímicos, donde hay una integración entre refinerías y plantas petroquímicas. En Argentina los polos más importantes se ubican en La Plata, Bahía Blanca, Campana-Zárate, San Lorenzo, Río III, Luján de Cuyo y Plaza Huincul (Kaindl M 2011).

De esta manera la localización de las plantas petroquímicas en áreas adyacentes a las refinerías de petróleo, obedece a la necesidad de asegurar el suministro de materias primas y reducir al mínimo los costos de transporte conectándose directamente a través de cañerías o poliductos. Y a su vez el refinador logra la integración vertical con una planta petroquímica lo que le permite aumentar el valor agregado de una parte de su producción. Siendo que la demanda de productos petroquímicos está creciendo a tasas muy superiores al crecimiento de los combustibles y a precios atractivos, la tendencia a la integración entre ambos segmentos industriales debería crecer en el mediano y largo plazo.

3. Impacto ambiental del petróleo

Los campos petrolíferos donde se extrae el petróleo, normalmente se encuentran muy lejos de los lugares de consumo. El transporte terrestre de los crudos se realiza, generalmente, a través de oleoductos que van del pozo a la refinería o al puerto de expedición más próximo. El transporte marítimo a larga distancia lo cubren los buques cisternas o petroleros.

Todo el esquema de distribución del petróleo, junto con las actividades relacionadas con la extracción, almacenamiento y procesamiento suponen eventos de contaminación desde el

punto de vista medioambiental (Kingston 2002), provocando que los hidrocarburos entren en contacto con suelos y cuerpos de agua. Ya sea las zonas marítimas, como las áreas con grandes aglomeraciones industriales, densamente pobladas o vías de transporte de mercancías, tanto por tierra como por agua, son las que poseen mayor probabilidad de sufrir contaminación de este tipo. La gravedad y extensión de dicha contaminación depende de diversos factores, entre los que se puede mencionar: cantidad de producto derramado; características del suelo (composición y textura); caudal del cuerpo de agua y dirección e intensidad del viento.

Los efectos perjudiciales generados sobre los suelos principalmente se dan en las zonas ocupadas por pozos, baterías, playas de maniobra, ductos y red caminera, comprometiendo una gran superficie del terreno. Las principales consecuencias ambientales que se presentan después de un evento de contaminación por hidrocarburos son: la reducción o inhibición de la cobertura vegetal del lugar del derrame, los cambios en la dinámica poblacional de la fauna y la biota microbiana (Griffin & Calder 1977, El-Alam et al. 2018). Cuando la contaminación alcanza la infiltración de las masas de aguas subterráneas, el mayor deterioro se manifiesta en un aumento de la salinidad por contaminación de las napas.

Por otro lado, los derrames de petróleo que se producen en zonas marítimas pueden llegar a generar enormes extensiones del líquido oscuro derramado impidiendo el paso de la luz solar. Esto hace que se interrumpa el proceso de fotosíntesis del plancton alterando la cadena alimenticia en el mar. Por ejemplo, los alcanos de cadena corta actúan como disolventes de las membranas celulares (Sikkema et al. 1995), mientras que los alcanos más largos pueden contribuir a la formación de películas de aceite y manchas que pueden limitar la disponibilidad de los nutrientes (Leahy & Colwell 1990). La capa de petróleo también impide el intercambio con el oxígeno del aire, haciendo que la flora y fauna marina sufra enormes pérdidas; como el caso de las aves marinas empetroladas que no pueden mover sus alas o picos, por lo que terminan muriendo por frío o hambre (Wells 2001; Whitfield 2003).

Uno de los casos de derrame más grave fue el caso del buque tanque Exxon Valdez, en Alaska en 1989, el cual derramó 35.000 toneladas de hidrocarburo que contaminaron 1.160 km. de costa y 2.000 km² de mar y murieron millones de animales (Rodríguez-Gallego 2003; Albaigés et al. 2006). De hecho el transporte de hidrocarburos es el que ha producido los mayores accidentes en el mundo, con graves consecuencias ecológicas.

Es decir que, como consecuencia del uso masivo del petróleo ha surgido el fenómeno de la contaminación ambiental por hidrocarburos, lo cual ha ocasionado el deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente generando una amenaza para la salud humana (Cooper et al. 1997; Peplóńska 1995; Propst et al. 1999; Singh et al. 2004; Abha & Swaranjit 2012), así como

también a especies vegetales y animales (Racine 1994; Wiese & Robertson 2004; Korade & Fulekar 2009; Adenipekun et al. 2009). Esto se debe a que los hidrocarburos son tóxicos para las plantas, animales y el hombre, ya que son mutagénicos y carcinogénicos (Maliszewska-Kordybach & Smreczak 2003). 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.

3.1. Antecedentes de impacto ambiental en Argentina

A partir de la década de 1990 comienza la preocupación ambiental en el sector petrolero argentino. Es en este contexto que la Secretaría de Energía sanciona diversas resoluciones y disposiciones para garantizar la preservación ambiental en el desarrollo de las operaciones. Entre ellas se encuentran: la de saneamiento de piletas utilizadas para la perforación de pozos de exploración y explotación de hidrocarburos; normas de protección ambiental durante la construcción de ductos; normas y procedimientos para el aventamiento de gas; normas sobre abandono de pozos y normas relativas al transporte en la vía pública de combustibles líquidos (Bernal 2005).

De esta manera el sector industrial se vió en la situación de tomar medidas para disminuir o erradicar los pasivos ambientales, por ejemplo, del reacondicionamiento de aproximadamente 10.000 piletas de perforación existentes, entre otros pasivos. La presión ejercida por la opinión pública indujo a las empresas privadas a iniciar una gestión ambientalmente responsable. Asimismo, la certificación de la norma ISO 14000 (procedimientos administrativos y operativos estandarizados de reconocimiento internacional, que garantizan una gestión amigable con el medio ambiente), se convirtió en un codiciado diploma social para las empresas del rubro, donde la internalización de los costos ambientales comenzó a constituir una variable más en la toma de decisiones (Bernal 2005).

Como consecuencia de los cambios en la legislación ambiental, los residuos generados a partir de la perforación de pozos y de la actividad productiva comenzaron a tratarse, destruirse o confinarse en sitios aptos para tal fin, y no esparcidos sobre el terreno.

El derrame de petróleo más grande de la historia de Argentina en agua dulce fue causado por un buque Shell, cuando chocó con otro barco en el Río de la Plata, derramando 5.400 m³ de petróleo frente al partido de Magdalena (Buenos Aires), el 15 de enero de 1999. Dos días después del impacto, el petróleo llegó a las costas de Magdalena, cubriendo una extensión de 30 km, desde la localidad de Berisso hasta Punta Indio. El petróleo entró en la desembocadura de arroyos hasta 2 km adentro (www.petroleomagdalena.com).

Entre varios de los derrames ocurridos en el sur Argentino, podemos mencionar el ocurrido el 26 de diciembre de 2007 en Caleta Córdova, a 20 km al norte del centro de Comodoro Rivadavia (Chubut), donde 300 m³ de petróleo tiñeron de negro 7 Km de playas, acantilados, pesquerías, flora y fauna. El crudo provenía de un buque propiedad de la empresa Antares Naviera, que tuvo un derrame durante la maniobra de carga en la monoboia de la empresa Termap S.A (www.opsur.org.ar).

3.2. Problemática regional

El polo industrial Zárate-Campana, ubicado al noroeste de la provincia de Buenos Aires, representa uno de los polos industriales más importante de la Argentina. Esto se debe a diversos motivos, pero principalmente a su ubicación estratégica, siendo que se encuentra a 75 km al nordeste de la Ciudad de Buenos Aires sobre la ruta Nacional N° 9, cuya ruta le permite la comunicación a nivel nacional. Además, limita al norte con el Río Paraná de las Palmas con la disponibilidad de un puerto propio para buques de gran calado, que conecta al polo con la Ciudad de Buenos Aires y el mundo, con Rosario y el litoral argentino. Asimismo, atraviesan el polo otras vías de comunicación de vital importancia en la economía y desarrollo de la zona y del país, como son la ruta Provincial N° 6, la Ruta Nacional N° 12 y el ex ferrocarril Mitre.

En una zona del margen del Río Paraná de Las Palmas de la ciudad de Campana, se encuentra un conglomerado de empresas dedicadas exclusivamente a la actividad petroquímica. Como el caso de dos destilerías emplazadas y diversas empresas cuyas materias primas son derivados del petróleo crudo. Siendo que la zona lleva 100 años en dicha actividad, la misma posee un historial importante de 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.

Una de las refinerías que se encuentra en la zona mencionada es la empresa RHASA (previamente Fábrica Militar de Tolueno Sintético). Resulta que a principios de los años '90, en tiempos del surgimiento de la ley nacional N° 24051 (Ley Nacional de Residuos Peligrosos), la empresa decidió realizar la limpieza barros de hidrocarburos que se van acumulando en el fondo de los tanques de almacenaje, y dispuso volcarlos en la laguna que se encuentra dentro del predio de la misma empresa. Esta inadecuada práctica ambiental ha empeorado la situación medioambiental debido a la contaminación por hidrocarburos.

4. Biorremediación

4.1. Técnicas de recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos

Existen diversas técnicas para recuperar suelos pero no todas pueden ser utilizadas para eliminar los hidrocarburos del suelo debido a la naturaleza de este contaminante. Entre las técnicas físico-químicas más empleadas en la extracción de hidrocarburos podemos mencionar:

- Desorción térmica, consiste en el uso de una secadora, en donde el suelo contaminado es calentado hasta temperaturas que causan la volatilización y consecuente separación física de los contaminantes de las partículas del suelo.
- Lavado, consiste en la remoción de contaminantes del suelo tratándolo con surfactantes químicos biodegradables y agua.
- Extracción con co-solventes, se realiza mediante la inyección de agua y un co-solvente, comúnmente un alcohol (etanol, metanol o isopropanol) en el área contaminada.
- Incineración, consiste en la quema del material contaminado a altas temperaturas.

Con algunas de estas técnicas se han conseguido efectos positivos, pero presentan las desventajas que conllevan a un elevado costo económico y no son consideradas amigables con el medio ambiente, debido a la perturbación adicional que generan sobre la zona de tratamiento (Clark 1995). También algunos de estos métodos destruyen el suelo y otros alteran sus características de manera irreversible. Por ello, surgen estrategias alternativas para la eliminación de los hidrocarburos en los suelos contaminados, las cuales son ambientalmente

correctas, simples y económicas. Aparecen así las técnicas biológicas de recuperación, que se incluyen dentro de la biorremediación, las cuales se tratan en este trabajo.

4.2. Definición y consideraciones generales de la biorremediación

La biodegradación es el resultado de los procesos de digestión, asimilación y metabolización de un compuesto orgánico llevado a cabo por bacterias, hongos, protozoos, plantas. La biodegradación un proceso natural, ventajoso no sólo por permitir la eliminación de compuestos nocivos, sino que además es indispensable para el reciclaje de los elementos en la biosfera, permitiendo la restitución de elementos esenciales para los organismos (carbohidratos, lípidos, proteínas).

La biorremediación potencia el proceso natural de la biodegradación. Es decir que se trata de una tecnología en la que intervienen organismos vivos para reducir o eliminar riesgos medioambientales resultantes de la acumulación de compuestos tóxicos o residuos peligrosos (Dua et al. 2002). En el sentido más amplio, la biorremediación incluye el uso de enzimas, estimulantes del crecimiento, bacterias, hongos o plantas, para degradar, transformar, secuestrar o movilizar contaminantes orgánicos, inorgánicos, o metales, en el suelo, agua o aire (Röling et al. 2002). La degradación puede ser total, proceso denominado mineralización, en el que se libera H₂O, CO₂ y otros compuestos inorgánicos simples; o puede implicar la transformación del compuesto original en productos intermedios o una reducción de su concentración por debajo de los límites establecidos por las autoridades regulatorias (Singh et al. 2008).

En el diseño e implementación de un sistema de biorremediación efectivo y predecible, son numerosos los factores que deben ser optimizados y controlados. Los factores que determinan la eficiencia de la biorremediación incluyen:

1. Propiedades del contaminante: básicamente se refiere a su biodegradabilidad. Por ejemplo, si es petróleo, los hidrocarburos lineales se degradan más rápidamente que los ramificados. La presencia de dobles enlaces, anillos aromáticos y diversas sustituciones químicas hacen una molécula más resistente a su biodegradación. La susceptibilidad de los hidrocarburos al ataque de los microorganismos disminuye en el siguiente orden: n-alcanos > alcanos ramificados > aromáticos de bajo peso molecular > alcanos cíclicos (Huesemann 1995).

2. Presencia de comunidades microbianas degradadoras: los microorganismos pueden ser autóctonos (biorremediación intrínseca, atenuación natural) o añadidos al sistema para mejorar la degradación (bioaumentación).
3. Disponibilidad del contaminante: es un factor crítico, tan importante como la presencia de las comunidades microbianas degradadoras. Depende de su solubilidad, estado de oxidación, adsorción a componentes del suelo (Semple et al. 2001; Johnsen et al. 2005; Stroud 2007; Katayama et al. 2010)
4. Naturaleza del medio contaminado: puede afectar al crecimiento microbiano y al metabolismo del compuesto en cuestión. Por ejemplo, permeabilidad, temperatura, presencia de nutrientes orgánicos, oxígeno u otros aceptores de electrones, pH, etc. (Atlas & Bartha 2002).
5. Toxicidad: la toxicidad de un compuesto afecta a la capacidad de un organismo para asimilarlo.

4.3. Ventaja y limitaciones de biorremediación

Las ventajas de la biorremediación (Vidali 2001; Azubuiké et al. 2016) son:

- Es menos costosa que otras tecnologías (convencionales) para el tratamiento de aguas y suelos contaminados.
- Una vez diseñado y optimizado un sistema eficiente, su implementación no requiere de métodos técnicamente complejos por lo que su aplicación es relativamente simple.
- Su aceptación pública es muy buena.
- Puede ser aplicada *in situ*, sin la necesidad de remover y transportar el suelo contaminado, evitando así el riesgo potencial a la salud humana y al medio ambiente.
- Su aplicación *in situ* mantiene las propiedades de la matriz del suelo.
- La degradación microbiana generalmente resulta en la destrucción completa del contaminante.
- Es aplicable a una gran variedad de contaminantes orgánicos, debido al amplio potencial de actividades metabólicas presente en las poblaciones microbianas de ambientes naturales.

Algunas de las limitaciones de la biorremediación incluyen:

- Su aplicación se limita a compuestos biodegradables. Existen compuestos muy recalcitrantes que son resistentes al ataque microbiano, cuya degradación es extremadamente lenta.
- Por tratarse de procesos biológicos específicos, dependiente de una gran variedad de factores, es difícil predecir la eficiencia y el éxito de un sistema de biorremediación. Resulta necesario

por ello la evaluación caso por caso, lo que implica que el diseño y la implementación sean cuidadosamente optimizados mediante estudios previos que dilucidan el comportamiento de las poblaciones microbianas del suelo y su actividad degradadora. Además, es imprescindible el monitoreo del sistema para evaluar el éxito del proceso.

Dado que el conocimiento disponible acerca del comportamiento de las comunidades microbianas de los sitios contaminados resulta un factor limitante, es que se están incorporando avances técnicos en genómica, proteómica y metabolómica (Lovley 2003, Madueño et al. 2009; Dias et al. 2012), que están fortaleciendo la microbiología ambiental aplicada a procesos de biorremediación.

4.4. Microorganismos degradadores de hidrocarburos

La aplicación de la microbiología en el campo de los hidrocarburos tuvo sus comienzos en 1895 con las observaciones de Miyoshi, el cual observó que un hongo industrial *Botrytis cinerea* podía actuar sobre parafinas (Miyoshi 1895). Sin embargo, hasta 1940 las publicaciones en relación a la degradación de hidrocarburos por acción de microorganismos fueron infrecuentes. La mayoría de los investigadores creían que la oxidación microbiana era una propiedad especializada de unos pocos tipos de microorganismos del suelo. En 1940, un investigador ruso, Mogilevskii, sugirió el empleo de muestras de suelo como fuente de microorganismos degradadores de hidrocarburos, para su aplicación en la prospección de combustibles (Mogilevskii 1940). Rápidamente se realizaron ensayos al respecto, y en 1945 Estados Unidos emitió la primera patente para la prospección de combustibles empleando esta técnica. Al mismo tiempo, fueron surgiendo trabajos de investigación en relación al ataque de microorganismos sobre los hidrocarburos (Johnson et al. 1942; Zobell CE. 1946; Strawinski 1954). Luego se publicó suficiente evidencia para demostrar que la oxidación de los hidrocarburos era una propiedad ampliamente encontrada en los microorganismos y se comenzó a estudiar el mecanismo de acción, como la acción de oxigenasas (Hayaishi et al. 1955), el metabolismo de los compuestos aromáticos (Stanier 1950; Evans et al. 1951), y el mecanismo microbiano de ataque a n-alcanos (Ooyama & Foster 1965; McKenna & Kallio 1965).

Primariamente los intereses industriales en relación a la microbiología de los hidrocarburos estuvieron conectados a la prospección de combustibles, problemas corrosivos y formación de lodo microbiano en tanques de combustibles. Ya a partir de los años 1970, como consecuencia directa del uso masivo del petróleo como fuente de energía y materia prima, y

surgiendo el fenómeno de la contaminación ambiental, retó a la sociedad de manera global para encontrar medidas efectivas que remedien los efectos negativos del avance tecnológico. Si bien los microorganismos del medio ambiente siempre han destruido los desechos, y los seres humanos siempre los han utilizado (a sabiendas o sin saberlo) en las actividades agrícolas, domésticas e industriales; a medida que el mundo urbanizado pasó a un sistema más industrial, la sociedad comenzó a adoptar un enfoque activo en la biorremediación. Ya a finales del siglo XIX, se habían instalado plantas de tratamiento de aguas residuales, aún así, esto no se denominó oficialmente biorremediación. El primer proyecto que consideró el concepto de biorremediación fue publicado por Raymond, al probar la relación entre la presencia de petróleo y la estimulación bacteriana (Raymond et al. 1975).

En base al enfoque que adquiere la biotecnología ambiental basada en procesos de biorremediación, comenzaron a aislarse microorganismos capaces degradar y/o utilizar sustratos de hidrocarburos como fuente de carbono y energía para el crecimiento microbiano, entre ellos una amplia variedad de bacterias y hongos de distintos géneros aislados del medio marino y el suelo (Austin et al. 1977; Atlas 1981; Floodgate G. 1984; Bossert & Bartha 1984; Leahy & Colwell 1990). Entre los organismos degradadores de hidrocarburos los mayormente conocidos se encuentran *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Candida* y *Sporobolomyces*.

Igualmente, las investigaciones en la biología molecular permitieron demostrar que para las vías metabólicas del naftaleno, octano, xileno y tolueno, se codifican enzimas en los plásmidos de *Pseudomonas spp.* (Chakrabarty 1976). Con lo cual, la exposición de las poblaciones microbianas naturales al petróleo u otros hidrocarburos, puede imponer una ventaja selectiva a las cepas que poseen plásmidos que codifican enzimas para el catabolismo de los hidrocarburos, lo que resulta en un aumento global de la frecuencia del plásmido dentro de la comunidad (Assinder & Williams 1990).

En este contexto, los estudios de degradación de los hidrocarburos por parte de las poblaciones microbianas se han enfatizado en los factores físicos, químicos y biológicos que contribuyen a la biodegradación de los mismos (Varjani 2017). Se priorizan los enfoques en las tasas de biodegradación dependientes de la composición, estado y concentración de los hidrocarburos, la temperatura y las concentraciones de oxígeno y nutrientes, la salinidad y la presión en ambientes acuáticos, la humedad y el pH en los suelos (Margesin & Schinner 2001; Obuekwe et al. 2005).

4.5. Biodegradación de hidrocarburos

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que en la cadena respiratoria o transportadora de electrones las células, producen una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia un sustrato orgánico que es externo a la célula, como lo pueden ser los hidrocarburos y que actúan como donadores de electrones, lo que tiene como resultado final una actividad metabólica que es capaz de degradar y consumir dichos compuestos (Dvořák et al. 2017).

Dentro de la mayoría de los microorganismos, los aceptores más comúnmente utilizados por estos con el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. La respiración microbiana se produce en condiciones aerobias cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, los procesos serán de tipo anaeróbico (Holliger & Zehnder 1996).

4.5.1. Biodegradación aerobia de hidrocarburos

. Degradación aerobia de alcanos

Los microorganismos que metabolizan alcanos, generalmente lo hacen transformándolos en ácidos grasos mediante la oxidación progresiva de uno de los grupos metilo terminal. La enzima clave es la alcano hidroxilasa, que adiciona un grupo alcohol en dicho carbono. Esta enzima es una monooxigenasa, a partir de O₂ adiciona un átomo de oxígeno en dicho átomo de carbono, y el otro átomo es reducido a agua (van Beilen et al. 2003).

En las bacterias, la hidroxilación inicial de n-alcanos se puede llevar a cabo por monooxigenasas que pertenecen a diferentes familias (Kloos et al. 2006). Los microorganismos que degradan alcanos de cadena corta (C₂-C₄) presentan enzimas relacionadas con las metano monooxigenasas. Las cepas que degradan alcanos de cadena media (C₅-C₁₁), o alcanos de cadena larga (> C₁₂), con frecuencia contienen monooxigenasas de hierro no hemínico, proteínas integrales de membrana, relacionados con la alcano hidroxilasa de *Pseudomonas putida* GPo1. Sin embargo, otras cepas contienen enzimas alcano hidroxilasas (proteínas hemo-tiolato) que

pertenecen a la familia citocromo P450 subfamilia CYP153, las cuales son solubles y degradan alcanos de cadena media (Maier et al. 2001).

La ruta de degradación de alcanos más ampliamente caracterizada es la codificada en el plásmido OCT de *P. putida* GPo1. La primera enzima de la vía es la monooxigenasa integral de membrana, AlkB, que hidroxila en la posición terminal. AlkB requiere de dos proteínas de transferencia de electrones, las cuales son solubles, y son llamadas rubredoxina (AlkG) y rubredoxina reductasa (AlkT). Rubredoxina reductasa a través de su cofactor FAD, transfiere electrones NAD(P)H a la rubredoxina, que a su vez transfiere los electrones a AlkB.

En las bacterias se han identificado vías alternativas de biodegradación que implican diferentes mecanismos de activación de n-alcano (Stroud et al. 2007), pero los datos bioquímicos y moleculares son muy limitados.

En la actualidad la búsqueda del gen *alkB* en muestras ambientales, proporciona información del potencial biodegradador intrínseco presente en el sitio (Kloos et al. 2006, Pérez de Mora et al. 2010).

. Degradación aerobia de compuestos aromáticos

Los compuestos aromáticos son químicamente muy estables debido a su peculiar conformación electrónica. Sin embargo, algunos microorganismos han desarrollado estrategias para desestabilizar dicha estructura electrónica y romper el anillo. En condiciones aeróbicas, básicamente el proceso consiste en la introducción de uno o dos grupos – OH mediante monooxigenasas o dioxigenasas. Realmente hacen falta dos grupos OH, así que sólo se introduce uno cuando ya está uno presente, como es el caso del fenol. La estructura resultante es menos estable y puede ser atacada por una segunda dioxigenasa que abre el anillo, generando un compuesto que puede ser metabolizado mediante el ciclo de Krebs. De hecho hay oxigenasas que abren el anillo en la posición orto (entre los C 1 y 2) y otras que lo hacen en la posición meta (entre los c 2 y 3) (Kanaly & Harayama 2000; Díaz et al. 2012).

Si bien existen diversas vías para la degradación de compuestos aromáticos, todas coinciden en el ataque oxidativo inicial, por acción de mono y dioxigenasas, y luego la escisión de la estructura del anillo por acción de 2,3 catecol oxigenasa. Varias enzimas involucradas en las vías de degradación han sido caracterizadas (Burlage et al. 1989; Kim et al. 2002; Martínez-Lavanchy et al. 2010; Vila et al. 2015), y debido al interés de detectar rápidamente bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos, se realizan técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) o RT-PCR para detectar genotipos catabólicos o ARNm implicados en la degradación de compuestos aromáticos, como es el caso de BTEX (Hendrickx et al. 2006).

4.5.2. Biodegradación anaerobia de hidrocarburos

Hay microorganismos que bajo condiciones de anoxia son capaces de metabolizar los hidrocarburos. Estos microorganismos utilizan el hierro, nitrato o sulfato como aceptor de electrones para la respiración anaeróbica. Si bien las rutas de degradación de hidrocarburos en anaerobiosis no están totalmente caracterizadas, tienen mucha importancia en el ciclo del carbono. La degradación anaeróbica es un proceso más lento que la aeróbica. Además de otras estrategias para las oxidaciones iniciales, requieren aceptores finales de electrones distintos del oxígeno; con lo cual el proceso confiere menos energía, lo que implica una velocidad de crecimiento y de asimilación más lenta (van Hamme et al. 2003).

. Degradación anaerobia de alcanos

Se ha encontrado que para la degradación anaerobia de alcanos hay dos tipos de bacterias, sulfato reductoras y desnitrificantes (nitrato-reductoras). El mecanismo de activación del alcano implica la adición de una molécula de fumarato, de modo se forma un diácido que es metabolizado por la vía de oxidación de los ácidos grasos (van Hamme et al. 2003).

. Degradación anaerobia de compuestos aromáticos

La ruta de degradación de compuestos aromáticos en anaerobiosis que mejor ha sido caracterizada es la del tolueno, la cual fue estudiada en diversas bacterias sulfato reductoras y desnitrificantes. La reacción inicial implica la adición de un fumarato al grupo metilo del tolueno, catalizada por la bencilsuccinata sintasa. Luego mediante una serie de reacciones se obtiene benzoil-CoA. Esta molécula ya es susceptible a perder la aromaticidad mediante procesos de reducción que eliminan dos de los tres dobles enlaces de la molécula. Así el benzoil-CoA es degradado hasta acetyl-CoA y CO₂. (Widdel & Rabus 2001).

4.5.3. Biodegradación por consorcios microbianos

Con frecuencia el complemento de varios microorganismos garantiza que las capacidades de cada uno contribuyan a la degradación de materiales complejos, como es el caso de los

consorcios, que son sistemas de varios organismos en los que cada organismo aporta algo necesario para los demás. Es así que procesos fundamentales en la naturaleza que se dan en la biosfera, son el resultado de las interacciones entre la microflora ambiental. Por ejemplo, consorcios de bacterias y hongos juegan un rol indispensable en el ciclo de la materia orgánica.

Siendo que los hidrocarburos suelen presentarse en mezclas muy complejas, podría implicar que la biorremediación de los mismos involucre ciertas comunidades de microorganismos con capacidades enzimáticas amplias. Efectivamente los estudios publicados hasta el momento indican que en la degradación de mezclas ambientales de hidrocarburos participan diversas poblaciones de la comunidad, las cuales interaccionan formando redes metabólicas complejas (Greene et al. 2000; Wolicka et al. 2009; Mao et al. 2012; Cerqueira et al. 2011; Mao et al. 2012; Wu et al. 2013; Tauler et al. 2016).

La experiencia sugiere que el aumento del crecimiento de las poblaciones microbianas naturales mixtas en el sitio de la contaminación, puede contribuir con más éxito a la degradación de los compuestos orgánicos indeseables en diversos entornos ecológicos en comparación la introducción de un único microorganismo (Mao et al. 2012).

En los suelos contaminados, las comunidades microbianas tienden a estar dominadas por las cepas que son capaces de sobrevivir a la toxicidad y a su vez, son capaces de utilizar el compuesto contaminante para su propio crecimiento. Como respuesta al tratamiento de biorremediación, estas poblaciones pueden comenzar a degradar activamente los contaminantes y desintoxicar el suelo, permitiendo que otras poblaciones en reposo puedan aumentar su número, lo que conduce a un aumento de la comunidad microbiana en el suelo (Zucchi et al. 2003).

4.6. Estrategias de biorremediación

4.6.1. Atenuación natural

La atenuación natural o remediación intrínseca es la forma más simple de biorremediación, ya que implica el proceso natural, sin manipulación o ingeniería externa, mediante el cual la microflora autóctona del suelo es capaz de degradar al contaminante. La población microbiana de un suelo es capaz de adaptar su composición frente a la presencia de un xenobiótico, con predominio de aquellas especies capaces de utilizar al contaminante como fuente nutricional o de metabolizarlo (Liu & Suflita 1993; El Fantroussi & Agathos 2005). La

USEPA (United States Environmental Protection Agency) ha definido a la atenuación natural como la combinación de una serie de procesos naturales que ocurren *in situ*, tendientes a remediar un sitio contaminado, incluyendo no solamente a la capacidad degradadora intrínseca de la microflora sino también a otros procesos físico-químicos como la dispersión, dilución, adsorción, volatilización o estabilización del contaminante. La atenuación natural ha sido reconocida como una tecnología aplicable a la descontaminación en determinadas situaciones, particularmente cuando el nivel de contaminación es bajo, el tiempo no es un factor limitante y donde no es posible la aplicación de otras técnicas. El método ha demostrado su utilidad para diversos contaminantes orgánicos (Esquinas et al. 2017; Lv et al. 2018), e incluso la USEPA ha implementado un sistema de atenuación natural monitoreado (MNA; Monitored Natural Attenuation) en lugares públicos de Estados Unidos con suelos y pozos de agua subterránea contaminados (USEPA 1999, 2001).

4.6.2. Bioaumentación

La bioaumentación se define como la inoculación de un sitio contaminado con microorganismos poseedores de las actividades metabólicas deseadas, con el objeto de mejorar un proceso de biorremediación (El Fantroussi & Agathos 2005, Guarino et al. 2017).

El objetivo de la bioaumentación apunta a que los microorganismos inoculantes aporten funciones metabólicas que aumenten la velocidad y el grado de biodegradación de los contaminantes (Straube et al. 2003; Sabaté et al. 2004; Li et al. 2009). Esta técnica es la más adecuada para emplazamientos con pobre carga microbiana o donde la población nativa no posea las rutas metabólicas necesarias para metabolizar los contaminantes (Smith et al. 2004). Los estudios de viabilidad son un pre-requisito para cualquier intervención planificada (Tyagi et al. 2011).

Se han desarrollado dos enfoques para la bioaumentación. Uno se basa en la inoculación con microorganismos con el potencial catabólico necesario para complementar o sustituir a una población de microorganismos nativos. En este caso, las bacterias seleccionadas son capaces de sobrevivir y competir con los microorganismos nativos, y ocupan un nicho metabólico específico dentro del ambiente contaminado. Los microorganismos inoculados suelen ser preferentemente cepas o consorcios microbianos complejos, aislados del sitio a tratar (autóctonos) (Sarkar et al. 2017).

El segundo enfoque consiste en la adición de una alta concentración de células que actúan momentáneamente como biocatalizadores y que degradan significativamente un contaminante

objetivo antes de convertirse en inactivas o morir. En este caso, los microorganismos inoculados no son capaces de establecerse debido al estrés abiótico o biológico encontrado en el nuevo entorno. Generalmente se trabaja con cepas aisladas o consorcios microbianos de otro lugar (no-nativos), sin ninguna modificación genética (*wild-type*) (Duba et al. 1996).

Los inóculos que se aplican para el bioaumentación pueden ser de diferentes tipos de microorganismos, incluyendo tanto bacterias como hongos. Los inóculos más utilizados incluyen:

1. Cultivos mixtos: cultivos de bacterias que han sido altamente enriquecidos utilizando el contaminante de interés (Ulrich & Edwards 2003). El inóculo inicial se obtiene normalmente del propio suelo o aguas contaminadas.
2. Cultivos puros: inoculación con una única cepa capaz de degradar el contaminante.
3. Organismos genéticamente modificados (OGM): Aunque exista una vasta literatura sobre el desarrollo y potencial de bacterias degradadoras obtenidas por modificación genética (Sayler & Ripp 2000; van Veen et al. 1997), muchos países han puesto barreras para la liberación de OGM en emplazamientos contaminados debido a los riesgos potenciales para el ecosistema y la salud pública.

Es importante mencionar que hay factores que podrían afectar la actividad del inóculo, como la baja biodisponibilidad del contaminante y la competencia con la flora nativa (Allard et al. 2000; Cavalca et al. 2002; Gomes et al. 2005, Mrozik & Piotrowska-Seget 2010). En este último caso la dinámica del suelo evoluciona hacia el re-establecimiento de la comunidad original. De hecho, actualmente se están aplicando métodos de detección basados en técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), para seguir el establecimiento de las cepas degradadoras inoculadas en suelos contaminados (Madueño et al. 2009).

4.6.3. Bioestimulación

La bioestimulación consiste en incrementar la actividad de los microorganismos nativos de un ambiente natural por medio de la adición de nutrientes, humedad, aire u otros agentes destinados a aumentar la velocidad de degradación de los contaminantes en un sitio (Tyagi et al. 2011).

Identificar las condiciones limitantes para que los microorganismos nativos puedan llevar a cabo la remediación es un paso crítico. Los parámetros que limitan la actividad microbiana general son nutrientes inorgánicos y orgánicos, como agua, oxígeno, nitrógeno y fósforo. El contaminante puede ser utilizado como una fuente de carbono y energía por los

microorganismos. En el caso que la concentración del contaminante exceda en gran medida la disponibilidad de oxígeno necesaria por los microorganismos, entonces el oxígeno puede resultar ser un factor limitante del metabolismo celular. Es por ello que la introducción de aire a través de tuberías de infiltración, arado o volteo ha demostrado ser muy eficaz en la biorremediación de contaminantes derivados del petróleo y una variedad de otros compuestos orgánicos (Thomas y Ward 1992).

La presencia de nutrientes puede favorecer la degradación de hidrocarburos por parte de la población microbiana nativa. En un ambiente que ha sido anaerobio por largos periodos de tiempo, el contaminante tiene un alto contenido de carbono. En paralelo es probable que ocurra el proceso de desnitrificación, con lo cual se reduce el contenido total de nitrógeno del medio ambiente, haciendo que el nitrógeno se convierta en un nutriente limitante. Ciertamente el nitrógeno se ha introducido con éxito en el subsuelo terrestre para bioestimulación usando amonio, nitrato, urea, y óxido nitroso (Delille et al. 2004).

En la naturaleza el contenido de fósforo, como en el subsuelo terrestre, es muy bajo, de hecho se puede presentar en altas concentraciones pero en forma de mineral no disponible biológicamente. En ambientes contaminados se han utilizado con éxito varios compuestos de fosfato como bioestimulantes (Margesin & Schinner 2001; van Hamme et al. 2003; Agarry & Ogunleye 2012).

De esta manera la bioestimulación consiste en el ajuste de las variables fisicoquímicas claves del sitio a tratar, de manera de estimular el crecimiento de la microflora autóctona degradadora. En general la disponibilidad de macronutrientes (N y P) es la condición a corregir (Braddock et al. 1997; Chaîneau et al. 2003; Nikolopoulou et al. 2007; Martínez Álvarez et al. 2017; Júlio et al. 2018). Una relación C/N/P de 100:10:1 se considera óptima, en términos generales, para el metabolismo microbiano.

4.6.4. Biosurfactantes

En algunos sitios contaminados, a pesar de existir un número adecuado de microorganismos degradadores y una disponibilidad de nutrientes adecuada, los contaminantes no se encuentran disponibles para ser degradados. Este problema se torna más relevante al aumentar la hidrofobicidad de los mismos. Es por ello que los tratamientos de biorremediación suelen incluir el uso de tensioactivos, sustancias sintéticas o biológicas que son usadas para incrementar la solubilidad acuosa de hidrocarburos sólidos y emulsionar hidrocarburos líquidos,

para mejorar la disponibilidad de los contaminantes hacia los microorganismos (Korda et al. 1997).

Los biosurfactantes son moléculas anfipáticas producidos por una variedad de microorganismos, tales como bacterias, hongos y levaduras (Lin 1996, Kosaric 2001). Los microorganismos producen una amplia variedad de biosurfactantes de alto y bajo peso molecular, y naturaleza química. La mayoría de estos compuestos poseen cabezas polares de naturaleza aniónica o neutra. Sólo unos pocos son de naturaleza catiónica tales como los que contienen grupos amino. La parte hidrofóbica de la molécula se basa en ácidos grasos de cadena larga, en hidroxiácidos o α -alquil- β -hidroxilácidos. La parte hidrofílica pueden ser hidratos de carbono, aminoácidos, péptidos cíclicos, grupos fosfatos, ácidos carboxílicos o alcoholes (Mulligan 2005).

Los surfactantes de bajo peso molecular pueden disminuir la tensión superficial e interfacial. En los sistemas heterogéneos, los biosurfactantes tienden a agregarse en los límites entre las fases e interfaces. Forman una capa molecular interfacial que afecta las propiedades de la superficie original. El motivo hidrofóbico de la molécula tensioactiva se localiza en la superficie hacia la fase hidrofóbica (generalmente la fase oleosa) mientras que el motivo hidrofílico se orienta hacia la solución o la fase hidrofílica (soluciones acuosas) (Fracchia et al. 2012).

En el caso de la tensión superficial (tensión presente en la interfase líquido-aire), los biosurfactantes la disminuyen debido a que interfieren en la formación de puentes de hidrógeno y otras fuerzas involucradas en la adhesión entre moléculas, mientras que la tensión interfacial (entre fase de líquidos inmiscibles) los biosurfactantes actúan formando una tercera fase de “microemulsión” que favorece la interacción entre la fase acuosa y la oleosa. Los lipopéptidos, glicolípidos, flavolípidos, fosfolípidos y ácidos grasos son representantes comunes de este grupo.

Por otro lado, se hace referencia como bioemulsionantes a los surfactantes de alto peso molecular, dado que pueden estabilizar aceite en agua o agua en emulsiones de aceite. Son emulsionantes altamente eficientes a bajas concentraciones y presentan considerable especificidad de sustrato, pero no son necesariamente eficientes en reducir la tensión superficial. Estas biomoléculas comprenden a polisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas, etc. (Fracchia et al. 2012).

Una característica que pueden poseer las bacterias degradadoras de hidrocarburos, es la capacidad de emulsionar hidrocarburos en disolución produciendo biosurfactantes (Hommel 1990; Neu 1996; Desai & Banat 1997; Bredholt et al. 1998; Congiu & Ortega-Calvo 2014). Las

investigaciones indican que hay una serie de razones por las que los microorganismos producen biosurfactantes, principalmente se refieren a la necesidad de cambiar la superficie interfacial de la célula o el medio ambiente local (Zhang & Miller 1994).

En el caso de los hidrocarburos, que son compuestos de baja solubilidad en agua, y sumando el hecho de que el primer paso en la degradación de los hidrocarburos implica una oxigenasa ligada a la membrana celular, hace esencial que las bacterias entren en contacto directo con los sustratos de hidrocarburo. Una estrategia biológica que puede mejorar el contacto entre bacterias e hidrocarburos insolubles en agua, es la emulsión del hidrocarburo. Por lo tanto, es común que las bacterias que crecen en petróleo produzcan potentes emulsionantes (Rosenberg 1993; Deleu et al. 1999; Banat et al. 2000; Rizzo et al. 2018). Es así que los biosurfactantes generarían una bioconcentración del sustrato de hidrocarburo y esto podría resultar en una ventaja para el proceso de biorremediación (Posada-Baquero et al. 2019).

Estas moléculas han sido de gran interés en los últimos años a causa de su menor toxicidad, mayor biodegradabilidad y compatibilidad ambiental, en comparación con tensioactivos sintéticos (Poremba et al. 1991; Lepo et al. 1997; Frank et al. 2010; Mnif et al. 2015; Wolf & Gan 2018).

5. Empleo de residuos agroindustriales

El empleo de residuos agroindustriales como alternativa al uso de sustratos no renovables aplicado en procesos biotecnológicos es cada vez es más amplio. Los sustratos disponibles en la actualidad son una variedad de residuos orgánicos procedentes de la agricultura y las industrias relacionadas. Entre ellos se destaca el glicerol como fuente de carbono alternativa importante, porque la cantidad de este co-producto ha ido en aumento año tras año ligado a la producción de biodiesel principalmente (Aburto 2008). Además de la importancia económica que ello supone para la producción de productos de mayor valor agregado (enzimas, proteína unicelular, pigmentos, antibióticos, etc.), la utilización de co-productos agroindustriales tiene incidencia en la preservación del medio ambiente, al considerar el desarrollo de tecnologías orientadas hacia una transformación sustentable de los recursos naturales (Pandey et al. 2000; Makkar & Cameotra 2002). La búsqueda de materias primas de bajo costo y fácil adquisición que puedan ser utilizados como sustratos fermentables, como fuentes de carbono o nitrógeno, constituye uno de los retos más interesantes de la biotecnología actual. A pesar de las ventajas y la potencial aplicabilidad de muchos compuestos biológicos, el éxito de la producción de los mismos

depende de la economía del proceso usado y el uso de materias primas de bajo costo (10-30% de los costes globales). También se plantea la necesidad de atender de una manera ambientalmente responsable, la disposición final de los residuos que ya no pueden ser reutilizados, tomando como base el marco regulatorio vigente, para evitar que se conviertan en contaminantes de suelos y aguas incluidas las subterráneas (Chundawat et al. 2011). En este contexto, este trabajo aborda el estudio del desarrollo y optimización de un bioproceso para la obtención de biomasa, como inóculo para la estrategia de bioaumentación, destinado al tratamiento biológico de suelos contaminados con hidrocarburos con el fin diseñar procesos viables en costos, rendimientos y eficiencia.

El interés social por la conservación del medio ambiente ha resultado en el endurecimiento de legislaciones ambientales y cambios de política fiscal que buscan reducir el impacto ambiental de las actividades desarrolladas por el hombre. En este contexto, la Argentina enfrenta las consecuencias de la explotación de recursos no renovables (petróleo, minerales), de la actividad agropecuaria (uso de agroquímicos), de la actividad industrial (industrias químicas, petroquímica, curtiembres, celulosa, entre otras) que muchas veces no contemplan las nuevas prácticas de conservación del medio ambiente e impactan en diversos ecosistemas, incluyendo suelos, aguas superficiales y subterráneas.

Los hidrocarburos representan uno de los grupos contaminantes más importantes tanto por su volumen como por las consecuencias que producen a corto y largo plazo sobre el medio ambiente (IARC 1983). En nuestro país amplias zonas se ven afectadas por este tipo de contaminación, como la Patagonia que es una de las regiones del país más rica en yacimientos petrolíferos. Por otro lado, la industria petroquímica, en lo relacionado a refinería, distribución y comercialización presenta polos importantes en La Plata, Bahía Blanca, Campana-Zarate, San Lorenzo, Río III, Luján de Cuyo y Plaza Huincul. Tradicionalmente, la eliminación de los contaminantes orgánicos se ha encarado mediante tecnologías probadamente efectivas que involucran tratamientos físicos y/o químicos (Juwarkar et al. 2010). En la actualidad, a causa de su elevado costo y la perturbación que generan sobre las zonas afectadas, solo se aplican en ciertos casos y como primera acción de emergencia a fin de remover grandes masas de contaminantes. Las tecnologías tradicionales de remediación de ambientes contaminados se destacan por las dificultades de aplicación en grandes áreas o volúmenes y la generación de lodos tóxicos altamente reactivos que a menudo son difíciles de tratar. En este sentido un objetivo ecológico prioritario es el desarrollo de nuevas metodologías compatibles con el medio ambiente para la remediación de ambientes contaminados (Araruna *et. al* 2004). Las capacidades de los microorganismos son particularmente relevantes para la biodegradación de dichos compuestos. Muchos estudios han probado la eficacia y la factibilidad del aprovechamiento de las capacidades metabólicas de los microorganismos (bacterias y hongos) en procesos de biodegradación de diferentes grupos de compuestos (Ruberto et al. 2006; Navacharoen and Vangnai 2011; Ponce et al. 2011).

Por otro lado, el interés de emplear residuos y co-productos agroindustriales como materia prima en procesos para generar diversos productos de interés, representa ser muy importante en el enfoque de la preservación del medio ambiente y la generación de tecnologías sustentables (Makkar & Cameotra 2002). La búsqueda de materias primas de bajo costo y fácil

adquisición que puedan ser utilizados como sustratos fermentables constituye uno de los retos más interesantes de la biotecnología actual.

En los últimos 6 años, motivados principalmente por exigencias legales de Organismos provincial para el Desarrollo Sustentable (OPDS), las empresas han tenido que comenzar a realizar tareas de disminución del impacto ambiental y del pasivo ambiental. Es en este marco que la Facultad Regional Delta de la Universidad Tecnológica Nacional firmó un convenio de trabajo conjunto con la empresa RHASA para el desarrollo de una estrategia de biorremediación de suelos y cuerpos de agua crónicamente contaminados con hidrocarburos. Es dentro de este convenio que se enmarca el presente trabajo de investigación

La biorremediación es un proceso biológico el cual ha probado su efectividad en la descontaminación y recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos. Dicha remoción puede ser llevada a cabo por microorganismos y este proceso puede ser favorecido por la aplicación de procesos de bioestimulación y/o bioaumentación.

Existe una tendencia internacional basada en la valorización de residuos y co-productos agroindustriales para la obtención de bienes y servicios biotecnológicos.

En base a esto, nuestras hipótesis de trabajo son:

- Las cepas aisladas de sitios crónicamente contaminados con hidrocarburos, pueden ser utilizadas como agentes biológicos para procesos biorremediación.
- Co-productos agroindustriales, tales como el glicerol y aceites proveniente de la industria del maní son potenciales sustratos para la producción de biomasa, la cual representaría la base necesaria para llevar a cabo estrategias de bioaumentación.
- El estudio en sistemas de microcosmos permitirá abordar el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos. Así, se evaluará el efecto de la contribución abiótica a la disipación de los hidrocarburos y contribución de su biodegradación de la flora microbiana ya sea por atenuación natural o por técnicas de bioaumentación y bioestimulación.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue el desarrollo de procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, empleando cepas nativas aisladas de los mismos y del uso de co-productos provenientes de las industrias como sustrato de bajo costo.

Para lograr este objetivo, se partirá de cepas aisladas de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos en la zona del polo petroquímico Zárate-Campana, Provincia de Buenos Aires, específicamente de la Refinería RHASA. Asimismo, a través de este proyecto, se generarán conocimientos y criterios para abordar procesos biotecnológicos de valorización de los sustratos agroindustriales que se emplearán en la formulación de medio de cultivos de las cepas seleccionadas.

Los objetivos específicos que se plantean son los siguientes:

1. Identificación bioquímica y genética de los microorganismos aislados previamente de suelos crónicamente contaminados.
2. Estudio de cultivos en medio líquido de las cepas, para evaluar el crecimiento microbiano en medios formulados con diferentes fuentes de carbono (hidrocarburos o co-productos industriales) y fuentes de nitrógeno.
3. Estudio de la capacidad de las cepas para producir biosurfactantes.
4. Diseño y optimización de medios de cultivo que satisfagan los requerimientos nutricionales de los microorganismos seleccionados, para la obtención de biomasa, cuyo producto se empleará para ensayos de bioaumentación y bioestimulación.
5. Estudio de la aplicación de estrategias de bioaumentación y bioestimulación en suelos de las inmediaciones de la refinería (RHASA) contaminados con hidrocarburos, mediante el desarrollo experimental de sistemas de microcosmos y cuantificación de la degradación obtenida.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas

Las cepas empleadas en este trabajo fueron previamente aisladas de muestras de suelos pertenecientes a la zona crónicamente contaminada con hidrocarburos del predio que la refinería RHASA, ubicada en el partido de Campana (34°10' 5.1" S, 58°56' 23" W) (Liporace et al. 2012).

2. Conservación de las cepas

Los microorganismos fueron criopreservados en glicerol 15% *v/v*. Para ello, cada una de las cepas fue cultivada en frascos erlenmeyers de 250 mL conteniendo medio LB (Luria-Bertani) (tripteína 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L) y el correspondiente inóculo de cada cepa (1,5% *v/v*). Los cultivos fueron inoculados en un shaker a 25 °C, 135 rpm, durante 48 hs. Luego se tomaron alícuotas de 1,275 mL de cultivo más 0,225 mL de glicerol estéril, y se colocaron dentro de tubos eppendorf de 1,5 mL. 10 tubos correspondientes a cada cepa se almacenaron a -18 °C, hasta el momento de su uso. Este procedimiento se repitió cada 6 meses para el mantenimiento de las cepas.

3. Identificación bioquímica y genética de las cepas

3.1. Identificación bioquímica

La caracterización bioquímica se realizó utilizando los sistemas de identificación API: API 20 NE (sistema de identificación para bacilos gram-negativos, aerobios, no fermentadores), API 20 Strep (sistema de identificación para estreptococos), API Coryne (sistema de identificación para corinebacterias), según las indicaciones del fabricante BioMérieux, Mercy l'Etoile, Francia.

3.2. Susceptibilidad a antibióticos

Con el fin de ampliar la caracterización de los microorganismos aislados se determinó la susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión de discos en agar. Los antibióticos empleados fueron: eritromicina 15 µg, imipenem 10 µg, ampicilina 10 µg, cefalotina 30 µg, meropenem 10 µg, vancomicina 30 µg, ampicilina 10 µg / sulbactama 10 µg, minociclina 30 µg, penicilina 10 U, piperaciclina 100 µg / tazobactam 10 µg, ciprofloxacina 5 µg.

Las bacterias sembradas en placas de Petri conteniendo medio sólido LB + agar (1,5%) fueron incubadas 48 hs. Se tomaron colonias aisladas y se resuspendieron en solución fisiológica en tubos falcon de 15 mL, para la obtención de una suspensión bacteriana con un patrón de turbidez de 0,5 en la escala McFarland. Las mismas se inocularon en placas de Petri conteniendo medio sólido LB + agar (1,5%), sin dejar ninguna zona libre, utilizando un hisopo estéril. Las placas se secaron durante 3-5 min y posteriormente se depositaron los discos de antibióticos. Luego de 48 hs de incubación a 25 °C, se midió el halo de inhibición del crecimiento de cada bacteria ante cada antibiótico, para establecer si las bacterias son susceptibles o resistentes a cada antibiótico (Radice et al. 2011; <http://www.eucast.org/>).

3.3. Identificación genética

La identificación genética se realizó a partir de la extracción del material genético del microorganismo con el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega®). Este se utilizó como templado para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 16s. Se utilizaron los primers 27F y 1492R (2 µl de solución 10 µM, cada uno), 5µl de una solución buffer 15 mM de MgCl₂, 5µl de solución 1mM de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), 0,5 µl de solución 30mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), 0,3 µl de polimerasa Taq (5 U/µl) y agua desionizada. El ciclo de PCR que se realizó fue: 94 °C por 2 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos, 72 °C por 10 minutos y 10 °C en el paso final. Luego, se purificó el material obtenido a partir del kit comercial AxyPrep PCR Clean-up Kit (Axygen Bioscience). Finalmente, se envió el material genético amplificado a la Unidad de Genómica del Servicio de Secuenciación del INTA Castelar, Argentina.

Las secuencias genéticas obtenidas fueron procesadas con el software BioEdit® y comparadas con las existentes en las bases de datos: EZ Taxon, RDP y SILVA.

4. Estudio de las cepas en cultivo líquido

4.1. Medios de cultivos

En todos los ensayos de cultivos líquidos se empleó un medio de cultivo formulado con medio salino mínimo (MSM (g/L): NaNO_3 (4,0); 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) suplementado con una fuente de carbono. Todas las sales fueron marca Biopack. El MSM fue ajustado a pH 7 y esterilizado en autoclave, a 121 °C y 1 atm durante 15 min. Mientras que la fuente de carbono fue esterilizada según se indica en cada caso, y luego adicionada al MSM estéril. Todos los ensayos en cultivo líquido fueron realizados por duplicado incluso los respectivos controles.

4.2. Condiciones de los medios de cultivos

Todos los ensayos que se detallan a continuación se realizaron por duplicado.

4.2.1. Crecimiento de las cepas en hidrocarburos y glicerol

Sabiendo que las cepas en estudio han sido previamente aisladas de muestras tomadas de áreas contaminadas con hidrocarburos (Liporace et al. 2012), se evaluó la capacidad de crecimiento de las cepas CO1A1, CO1A2, MT1A3, TK1A2 en cultivos líquidos con hidrocarburos como única fuente de carbono.

Para ello se realizaron ensayos en MSM suplementado con una mezcla en partes iguales de tres hidrocarburos comerciales (HC): nafta súper (RON95), kerosene y diesel (<2000ppm de azufre), YPF, la cual fue esterilizada mediante el uso de filtros de nylon 0,2 μm . Se evaluaron dos concentraciones de HC, 2 y 4.5 % (v/v). Se emplearon dos controles utilizando medios formulados con 2 y 4.5 % (v/v) de HC, los cuales no fueron inoculados. El volumen inicial del cultivo fue 100 mL, contenidos en Erlenmeyers de 250 mL. Se inoculó con 3 % (v/v) (ajustado a DO 0,5) de la correspondiente cepa, a partir de cultivos provenientes de 48 hs de incubación en medio LB (25 °C, 135 rpm).

Tanto los cultivos como los controles fueron incubados en un shaker rotatorio a 135 rpm, 25 °C durante 5 días. Cada 24 hs se tomaron 18 mL de muestra para determinar biomasa (g/L), pH y tensión superficial (TS).

Paralelo a esto, como ya fue mencionado anteriormente, a partir de la necesidad de utilizar una tecnología de producción mas limpia mediante la búsqueda de materias primas de bajo costo y fácil adquisición que puedan ser utilizados como sustratos fermentables, se evaluó la capacidad de crecimiento, producción de biomasa y biosurfactantes de los microorganismos aislados en un medio de cultivo cuya única fuente de carbono fue glicerol, principal coproducto de la industria del biodiesel.

Para el presente estudio, se utilizó en primera instancia glicerol de grado analítico (2% (v/v)) (Biopack) en MSM. El glicerol se esterilizó por autoclave. Como control se utilizó el mismo medio formulado sin inocular. El volumen inicial del cultivo fue 100 mL, contenidos en Erlenmeyers de 250 mL. Se inoculó con 3 % (v/v) (ajustado a DO 0,5) de la correspondiente cepa, a partir de cultivos provenientes de 48 hs de incubación en medio LB (25 °C, 135 rpm). Los ensayos fueron incubados a 135 rpm, 25 °C durante 5 días. Cada 24 hs se tomaron 18 mL de muestra para determinar biomasa (g/L), pH y TS.

4.2.2. Crecimiento de MT1A3 utilizando diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno

En línea con el desarrollo de tecnologías sustentables, se estudió el crecimiento de MT1A3 a través del uso de diferentes fuentes de carbono alternativas, entre ellos co-productos agroindustriales de bajo costo (Tabla 2).

Por lo tanto, se formularon medios con MSM suplementado con 2 % de cada una de las fuentes de carbono expuestas en la tabla 2, excepto para HC que fue 4,5% (v/v). Los medios de cultivos presentaron un pH inicial de 7.

La glucosa utilizada es de Laboratorios Britania. Los sueros de leche corresponden a co-productos locales suministrado por una fábrica artesanal de quesos, establecimiento Las Tres Marías ubicado en el partido de Campana. Por otro lado, los aceites y el maní prensado son provenientes de la industria aceitera, La Argentina, Villa General Cabrera, Provincia de Córdoba. La glucosa fue esterilizada por autoclave y los sueros de leche fueron filtrados. El maní prensado fue molido y luego esterilizado en junto con el MSM. En el caso de los aceites se colocaron en un horno a 180 °C durante 3 hs para su esterilización (Kupiec et al. 2000).

Tabla 2. Fuentes de carbono empleadas para la evaluación del crecimiento de MT1A3.

Fuentes de carbono
HC
Glucosa
Suero de leche bovino
Suero de leche ovino
Aceite de girasol refinado
Aceite de girasol alto oleico
Aceite de maní crudo
Aceite de maní frito
Aceite de camelina
Maní prensado molido

Asimismo, con el objetivo de establecer la fuente de nitrógeno más apropiada para el crecimiento de la cepa MT1A3, se ensayaron tres fuentes de nitrógeno, NaNO_3 , NH_4Cl y urea. Para estos casos, los medios contenían 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 crudo (2 % v/v) como fuente de carbono y la correspondiente fuente de nitrógeno NaNO_3 (4,00 g/L), NH_4Cl (2,50 g/L) o urea (1,39 g/L) (Santa Ana et al. 2002; Abouseoud et al. 2008; Liporace et al. 2012). La concentración de cada fuente de nitrógeno corresponde al mismo aporte de contenido de nitrógeno.

Todos los ensayos en los que se probaron distintas fuentes de carbono y nitrógeno, se realizaron en Erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de volumen de cultivo inicial. Fueron inoculados con 3 % (v/v) (ajustado a DO 0,5) de la cepa MT1A3, a partir de un cultivo proveniente de 48 hs de incubación en medio LB (25 °C, 135 rpm). Los frascos fueron incubados a 135 rpm, 25 °C durante 5 días. Al final del ensayo tomaron 18 mL muestras para determinar la biomasa (g/L), pH y TS.

4.2.3. Crecimiento de MT1A3 a distintas concentraciones de hidrocarburos y temperaturas de incubación

Todos los ensayos que se desarrollaron a continuación en esta tesis fueron realizados empleando una sóla de las cepas nativas, salvo que se aclare lo contrario. El criterio de selección de este microorganismo se basó el alto rendimiento de biomasa obtenido en HC y en glicerol, con respecto al resto de las cepas (ver sección resultados 2.1.).

A continuación, se evaluó la capacidad de crecimiento de la cepa MT1A3 cuando la misma fue sometida a concentraciones mayores de HC. Con tal fin, se realizaron ensayos en MSM suplementado con distintas concentraciones de HC, 2; 4,5; 20; 50 y 60 % (v/v), como única fuente de carbono. En todas las concentraciones se empleó un control del medio formulado sin inocular. El volumen inicial del cultivo fue 100 mL, contenidos en Erlenmeyers de 250 mL. Se inoculó con 3 % (v/v) (ajustado a DO 0,5) de la cepa MT1A3, a partir de un cultivo proveniente de 48 hs de incubación en medio LB (25 °C, 135 rpm).

Los cultivos y controles se ensayaron a dos temperaturas 20 y 25 °C. El tiempo de incubación se prolongó hasta observar crecimiento bacteriano, desde 7 a 14 días, dependiendo de la concentración de HC y la temperatura de cada ensayo. En todos los casos la agitación se mantuvo a 135 rpm. Cada 24 hs se tomaron 18 mL de muestra para determinar la biomasa (g/L), pH y la TS.

4.2.4. Biodegradación de hidrocarburos por MT1A3

Se evaluó la capacidad de la cepa MT1A3 para degradar los hidrocarburos de diferentes pesos moleculares presentes en la mezcla de HC, estudiando cada fracción de la mezcla.

Para ello, los ensayos se llevaron a cabo con MSM y suplementado con los correspondientes hidrocarburos, nafta (1,5 % (v/v)), kerosene (1,5 % (v/v)), diesel (1,5 % (v/v)), o HC (4,5 % (v/v)). En Erlenmeyers de 250 mL, el volumen inicial del cultivo fue 100 mL, y se inoculó con 3 % (v/v) (ajustado a DO 0,5) de la cepa MT1A3, a partir de un cultivo proveniente de 48 hs de incubación en medio LB (25 °C, 135 rpm).

Los mismos se incubaron a 135 rpm, 25 °C durante 10 días. En los días 0, 5 y 10 se tomaron muestras para determinar biomasa (g/L) y degradación de hidrocarburos.

4.3. Métodos analíticos empleados en los cultivos líquidos

4.3.1. Medición de biomasa y pH

La estimación de concentración de biomasa se llevó a cabo a partir la medición del peso seco. Para ello se centrifugaron 18 mL de cada muestra a 13500 rpm, a 19 °C durante 15 min. Se separó el sobrenadante y el pellet fue colocado en una estufa a 100 °C durante 24 hs. Luego por diferencia de peso se calculó la biomasa en g/L.

Además, el pH se determinó sobre cada muestra de cultivo con un pHmetro (Adwa).

4.3.2. Medición de la tensión superficial

Se evaluó la capacidad de las cepas de producir tensioactivos por la medición indirecta de la tensión superficial (TS) del sobrenadante de cultivo. La importancia de buscar esta característica radica en que muchas bacterias degradadoras de hidrocarburos presentan la capacidad de emulsionar hidrocarburos en disolución mediante la producción de biosurfactantes.

La TS se midió empleando un equipo tensiómetro Attension Sigma Force Tensiometer 702 (Biolin Scientific Holding AB), mediante el método anillo de Du Nouy (Youssef et al. 2004; Walter et al. 2010). Para ello se utilizaron los 18 ml de sobrenadante de cultivo centrifugado a 13500 rpm, a 19°C durante 15 minutos, obtenidos del ensayo de estimación de biomasa. Se realizaron 10 medidas sobre cada muestra y se registró la media (en mN/m, miliNewton por metro) y el desvío estándar de los resultados. El control de cada medición fue el medio de cultivo sin inocular, cultivado en las mismas condiciones que cada muestra.

4.3.3. Análisis del perfil de degradación de hidrocarburos en cultivo líquido

4.3.3.1. Extracción

Para evaluar el perfil de degradación de HC totales por parte de MT1A3 en medio de cultivos líquidos, se realizaron ensayos de cromatografía gaseosa (CG). La extracción se realizó

acorde a lo descrito por Márquez-Rocha et al. 2001. Para ello se llevó a cabo una extracción líquido - líquido con el fin de extraer los hidrocarburos presentes en el medio cultivo (condiciones del cultivo detallado en la sección 4.2.3.). El proceso se realizó utilizando 5 mL de sobrenadante de cultivo al cual se le agregó 5 mL de diclorometano. Luego de 5 min de agitación en vórtex, se recuperó la fase orgánica para analizar por CG.

4.3.3.2. Cromatografía gaseosa

El análisis cromatográfico se llevó a cabo con el cromatógrafo GC-2010 Plus (Shimadzu, Corp., Japan), equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar (100 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno, 0.5 μ m de espesor del film, Petrocol DH Sepulco). La temperatura inicial del horno fue de 45 °C, luego tres rampas de 8 °C / min a 150 °C, 4 °C / min a 250 °C, 8 °C / min a 300 °C, y se mantuvo a 300 °C durante 15 min. La temperatura del inyector fue de 300 °C y la temperatura del detector fue de 320 °C. El gas portador (H₂) tuvo un flujo de 2 ml / min. Los datos fueron adquiridos y analizados empleando el software GC-Solution. La cuantificación de los hidrocarburos totales (HT) de cada cultivo fue determinada mediante la integración del cromatograma considerando el área bajo la curva de todos los picos, interpolando este valor en una curva de calibración. Dicha curva se construyó a partir del análisis cromatográfico de muestras de concentración conocida preparadas usando HC (mezcla en partes iguales de nafta, kerosene, diésel) diluído en diclorometano, en un rango de 1000 to 40000 ppm. El resultado de este procedimiento resultó una línea recta que relaciona el área de los picos con la concentración de HC:

$$HT = \frac{A - b}{m}$$

donde, HT es la concentración de hidrocarburos totales (ppm); A es el área de los picos obtenidos; m y b son la pendiente y el corte de la recta obtenida. Asimismo, numerosos picos fueron identificados y cuantificados empleando los estándares 50.16.512 gravimetric standard DHA classis (PAC) y alcanes mix C8-C40 (Accustandard). Este método fue una adaptación de la determinación de hidrocarburos realizada por Méndez et al. 2011.

5. Optimización del medio de cultivo para la producción de biomasa

A continuación, se realizó la optimización estadística del medio de cultivo para la producción de biomasa de MT1A3, con el objetivo de utilizar la biomasa de la cepa nativa como inóculo para los ensayos de microcosmos que se realizaron posteriormente.

5.1. Diseños experimentales estadísticos

Se procedió a la aplicación de los diseños experimentales estadísticos, los cuales permiten la evaluación del efecto de un conjunto de variables independientes sobre la variable dependiente en forma simultánea para determinado proceso. Esta metodología experimental presenta la ventaja de poder detectar interacciones entre las variables que difícilmente puedan apreciarse en el análisis secuencial usualmente empleado, siendo que el abordaje tradicional estudia un factor por vez mientras los otros factores se mantienen constantes. Además, los diseños experimentales pueden conformarse de un número acotado de experimentos frente a la metodología de análisis secuencial, permitiendo optimizar tiempo y recursos. (Hallenbeck et al. 2015; Farag et al. 2018; Rezende et al. 2018).

La optimización se llevó a cabo en dos etapas:

- Selección de los factores que son significativos para la producción de biomasa, mediante los diseños de selección (factorial completo).
- Determinación de los niveles óptimos de los factores significativos para la producción de biomasa, mediante los diseños de optimización (Box Behnken).

La respuesta analizada fue la producción de biomasa de MT1A3 (g/L). El software empleado fue Minitab Statistical Software.

5.1.1. Diseños de selección

Para seleccionar los factores significativos para la producción de biomasa se utilizaron diseños de selección de factorial completo (Montgomery 2001). De esta manera se logra el

estudio de cada variable y las interacciones entre las variables independientes. Este tipo de diseño combina cada factor con todos los otros factores en sus niveles más bajos (-1) y más altos (+1). El modelo está representado por términos lineales más todos los términos de las interacciones, según se muestra en la ecuación a continuación, para el caso de tres factores (a,b y c).

$$\text{Respuesta} = b_0 + b_1*a + b_2*b + b_3*c + b_4*a*b + b_5*a*c + b_6*b*c$$

Los factores analizados mediante este tipo de diseño fueron: concentración de aceite de maní crudo (como fuente de carbono alternativa), concentración de NaNO_3 (como fuente de nitrógeno), concentración de KH_2PO_4 (como fuente de fósforo), temperatura, tiempo de incubación.

5.1.2. Diseños de optimización

Se utilizó el diseño de optimización Box Behnken (Whittinghill 1998) para hallar los niveles óptimos de los factores significativos para la producción de biomasa. Esta clase de diseño es eficiente para ajustar polinomios de segundo orden en la superficie de respuesta porque implica relativamente un pequeño número de ensayos para estimar los parámetros. Se basa en el análisis de tres niveles (-1, 0, +1) para cada factor, estimando los efectos principales, cuadráticos e interacciones. Este modelo cuadrático no incluye corridas donde todos los factores estén en su valor extremo, como por ejemplo todos los valores de configuración bajos (www.support.minitab.com).

Los parámetros del diseño de optimización fueron la concentración de aceite de maní crudo, la concentración de NaNO_3 y el tiempo de incubación del cultivo.

6. Microcosmos

6.1. Muestreo, procesamiento y almacenamiento del suelo

Los suelos que involucran esta tesis pertenecen a la misma zona donde previamente se habían tomado muestras para el aislamiento de microorganismos nativos degradadores de hidrocarburos (Liporace et al. 2012), correspondiente a la región que se ubica en el Delta del

Río Paraná. El río produce el transporte de sedimentos cuyo destino final será el Río de la Plata, lo que hace que el principal material originario de los suelos en estudio sea el fango fluvial, constituyente de aluvión no consolidado. Estas zonas presentan suelos con bajo contenido de materia orgánica y valores de pH entre 5 y 6 (Alvarez et al. 2009).

La muestra de suelo para los microcosmos fue tomada de una pileta que contenía la recolección de suelos contaminados con hidrocarburos, producido por derrames durante las operaciones de rutina de la planta RHASA (Figura 3). La misma fue correctamente homogenizada, guardada en doble bolsa de polietileno, rotulada e inmediatamente transportada al laboratorio. Durante el muestreo también se determinó la temperatura del suelo.

Una vez en el laboratorio, se tomó una porción de la muestra para la caracterización del suelo. El resto del suelo fue preservado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el armado de los microcosmos.



Figura 3. Piletas de recolección de suelos contaminados con hidrocarburos, para disposición final.

6.2. Caracterización del suelo

La selección de un tratamiento para descontaminar un suelo puede estar condicionada por las características del mismo, por lo tanto, para mejorar la eficiencia de una tecnología de remediación es necesario conocer los factores que definen al suelo (Van Deuren et al. 1997). En las secciones posteriores se describen las técnicas que se aplicaron para caracterizar el suelo empleado en los microcosmos.

6.2.1. Determinación de humedad y de la pérdida por ignición

La determinación del contenido de agua del suelo se realizó mediante por método gravimétrico. Con tal fin se pesó un crisol vacío y se determinó el peso del recipiente vacío (P1). Se agregaron recipiente 10 g de suelo y se registró el peso inicial de la muestra (P2). Se llevó a estufa 1 día hasta peso constante. Luego se determinó el peso seco de la muestra contenida en el recipiente (P3). El cálculo de contenido de humedad porcentual se realizó mediante la fórmula:

$$\% \text{ humedad} = 100 - (100 \cdot (P3 - P1) / (P2 - P1))$$

Para determinar la pérdida por ignición (loss on ignition, LOI), la misma muestra secada en estufa para la determinación de humedad, fue colocada en un horno de mufla a 900 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se dejó enfriar en un desecador. Luego se registró el peso de la muestra tras la ignición (P4). La pérdida por ignición se expresa como porcentaje del suelo secado en estufa. La fórmula utilizada para el cálculo fue:

$$\% \text{ pérdida por ignición} = 100 \cdot (P3 - P4) / (P3 - P1)$$

6.2.2. Determinación de la capacidad de retención de agua

Para la determinación de la capacidad de retención de agua o capacidad de campo de la muestra de suelo se siguió el siguiente protocolo, se tomaron 60 g de suelo (peso fresco) y se llevó a estufa a 105 °C, durante 2-3 días. Se tomaron 50 g de suelo seco y se determinó su peso exacto, luego se colocaron en un embudo con papel filtro. Se agregaron 100 ml de agua destilada al suelo en el embudo, y se dejó incubando durante 24 hs a temperatura controlada (24 ± 2 °C). El volumen lixiviado fue recogido en un frasco durante la incubación, y finalmente medido en probeta. La capacidad de campo fue expresada como volumen de agua retenido cada 100 g de suelo seco en estufa (mL / 100 g de suelo).

6.2.3. Determinación del pH

El pH del suelo se determinó en agua, en forma directa, mediante un pH metro. Para el análisis se pesaron 10 g de suelo y se agregaron 20 mL de agua destilada. La suspensión suelo – agua se mezcló en vórtex 5 min. Se dejó sedimentar la mezcla durante 30 min, y luego se realizó

la medida directa del pH sobre el sobrenadante límpido, con el pH metro previamente calibrado con soluciones buffers estándar de pH=4 y pH=7.

6.2.4. Área superficial y tamaño de la partícula del suelo

Se determinó el área superficial de las partículas (m^2/g), así como el volumen del suelo (en %) ocupado por los distintos tamaños de partícula. Las partículas de tamaño menor a $2 \mu m$ se consideran arcillas; las partículas cuyos tamaños se encuentran entre 2 y $60 \mu m$ se clasifican como limo, las partículas de tamaños entre 60 y $2000 \mu m$ corresponden a arena, que puede ser desde muy fina ($60-100 \mu m$) hasta muy gruesa ($1000 - 2000 \mu m$); mientras que aquellas partículas cuyo tamaño sobrepasa los $2000 \mu m$ corresponden a piedra y grava (Atlas & Bartha 2005).

6.3. Diseño de los sistemas de microcosmos

Los sistemas experimentales a escala laboratorio, donde se encuentra representada una porción del universo en estudio y donde es posible simplificar las interacciones entre factores bióticos y abióticos mediante el manejo controlado de las principales variables experimentales, se denominan microcosmos (Dias et al. 2012; Mohammadi-Sichani et al. 2017).

Con el fin de disponer de un sistema experimental adecuado para el estudio de la degradación de hidrocarburos del suelo y el efecto de cada uno de los factores bióticos y abióticos que inciden en dicho proceso, se diseñó el experimento de microcosmos. Para ello se utilizaron frascos de vidrio estériles, de 0,36 L y 6 cm de diámetro interno. La cantidad de tierra que se colocó en cada frasco fueron 200 g, y se taparon con polietileno. Se mantuvieron a temperatura ambiente. Con esta disposición se realizaron sucesivamente los siguientes sistemas experimentales:

1. Microcosmos I

Duración 100 días (diciembre, enero, febrero) toma de muestra cada 20 días, sin regulación del contenido de humedad, por duplicado.

Tabla 3. Sistemas de microcosmos I

Sistema	Condición
C	Control atenuación natural
MT1A3	Bioaumentación MT1A3

2. Microcosmos II

Duración 120 días (febrero, marzo, abril), toma de muestra cada 30 días, sin regulación del contenido de humedad, por triplicado.

Tabla 4. Sistemas de microcosmos II

Sistema	Condición
C	Control atenuación natural
B	Bioestimulación nitrógeno y fósforo
MT1A3	Bioaumentación MT1A3
Mix*	Bioaumentación mezcla de cepas*
MT1A3 + B	Bioaumentación MT1A3 + Bioestimulación nitrógeno y fósforo
Mix* + B	Bioaumentación mezcla de cepas* + Bioestimulación nitrógeno y fósforo

*Mezcla de las cepas MT1A3, CO1A1, CO1A2, TK1A2.

3. Microcosmos III

Duración 120 días (octubre, noviembre, diciembre), toma de muestra cada 30 días, con regulación del contenido de humedad, por duplicado.

Tabla 5. Sistemas de microcosmos III

Sistema	Condición
C	Control atenuación natural
B	Bioestimulación nitrógeno y fósforo
MT1A3	Bioaumentación MT1A3
Mix	Bioaumentación mezcla de cepas*
MT1A3 + B	Bioaumentación MT1A3 + Bioestimulación nitrógeno y fósforo
Mix + B	Bioaumentación mezcla de cepas* + Bioestimulación nitrógeno y fósforo

*Mezcla de las cepas MT1A3, CO1A1, CO1A2, TK1A2.

La actividad de la flora bacteriana endógena fue observada en el ensayo de atenuación natural (C). En los ensayos en donde se aplicó la estrategia de bioestimulación (microcosmos II y III) se agregó 5 mL de una solución 20 % p/v de NaNO_3 como fuente de nitrógeno para lograr una concentración de 5000 mg de NaNO_3 / kg de suelo, y 5 mL una solución 4 % p/v de Na_2HPO_4 como fuente de fósforo para obtener una concentración de 1000 mg de Na_2HPO_4 / kg de suelo, a los correspondientes frascos (Márquez-Rocha et al. 2001; Ruberto et al. 2003; Ruberto et al. 2009). Ambas soluciones se prepararon a partir de reactivos de marca Biopack. Los tratamientos de bioestimulación se realizaron con el fin de evaluar la influencia de los nutrientes NaNO_3 y Na_2HPO_4 sobre el crecimiento de la microflora endógena y las cepas inoculadas, B, MT1A3 + B y Mezcla + B, respectivamente.

Para llevar a cabo los ensayos a los cuales se les aplicó los tratamientos de bioaumentación, ya sea con la cepa MT1A3 y la mezcla de cepas (CO1A1, CO1A2, MT1A3 y TK1A2), previamente se confeccionaron curvas de calibración DO_{600} (Densidad óptica a 600 nm) Vs. UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias / mL), con el fin de estimar la concentración de biomasa de los inóculos (UFC/mL) y a partir de esto poder calcular la cantidad de biomasa (mL) a inocular en los microcosmos. Se estimó que la cantidad de inóculo (mL) para cada ensayo tuviese una densidad celular de 1×10^8 CFU/g de suelo seco (Jiang et. al 2016; Surendra et. al 2017).

Para el caso de microcosmos I, el crecimiento del inóculo fue llevado a cabo en medio MSM con aceite de maní crudo (AMC) como única fuente de carbono (20 g/L). Se realizó en Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen final de 100 mL de cultivo. Se incubó a 135 rpm y 25 °C, durante 5 días. A partir del inóculo crecido, se agregaron 2 mL de cultivo a cada uno de los tratamientos de bioaumentación.

Para los microcosmos II y III, los inóculos fueron crecidos en Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen final de 100 mL de cultivo MSM con AMC (18,7 g/L), NaNO_3 (2,4 g/L), incubados a 135 rpm y 26 °C (condiciones optimizadas en resultados sección 3), durante 5 días. A partir de estos cultivos se tomaron 1,8 mL del inóculo correspondiente a la cepa MT1A3 y 1,5 mL del inóculo correspondiente a la mezcla de cepas (CO1A1, CO1A2, MT1A3 y TK1A2) respectivamente.

Se tomaron 30 g de suelo de cada ensayo y se realizó el análisis de temperatura, humedad, pH, crecimiento microbiano y degradación de hidrocarburos.

6.4. Métodos analíticos empleados en los microcosmos

A las muestras recolectadas de los microcosmos se le realizó la determinación de humedad y de pH como se detalla en las secciones 6.2.1. y 6.2.3.

6.4.1. Análisis microbiológico

El recuento de microorganismos de cada ensayo se realizó mediante la técnica de viabilidad celular (Brock & Madigan 2015). De esta manera se determinó el conteo de bacterias heterotróficas aeróbicas totales (BHAT) y de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) contenidas en el suelo.

Se resuspendió 1 g de muestra de suelo en 10 ml de NaCl 0,9% estéril. A partir de esto se realizaron diluciones seriadas en base 10. Las mismas fueron sembradas en placas de Petri conteniendo por un lado medio sólido (agar 15 g/L) LB, para el recuento de bacterias heterotróficas aeróbicas totales (BHAT); y por otro lado en placas con medio sólido (agar 15 g/L) MSM suplementado con HC como única fuente de carbono, para el recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) (Dias et. al 2012; Jiang et. al 2016). Para el recuento de BHAT las placas se incubaron durante 24 h. En el caso de las placas en donde se realizó el recuento de BDH, estas fueron incubadas durante 48 h. En ambos casos la temperatura de incubación fue de 25 °C. Teniendo en cuenta el número de colonias contado para cada dilución (placa de recuento óptima: con 30 – 300 colonias) y el % de humedad del suelo de cada sistema de microcosmos estudiado, se realizaron los cálculos correspondientes para expresar los resultados como el número de UFC/g de suelo seco según la siguiente ecuación:

$$\text{Unidades Formadoras de Colonias / g de suelo seco} =$$
$$\frac{\text{Recuento por placa} \times \text{factor de dilución}}{\text{g de suelo seco}} \times \text{mL sembrados}$$

6.4.2. Análisis de la degradación de hidrocarburos en suelo

6.4.2.1. Extracción

La determinación de hidrocarburos totales (HT) se realizó por cromatografía gaseosa (CG). La extracción se realizó acorde Márquez-Rocha et al. 2001. Para ello 5 g de muestra de

suelo fueron resuspendidos en 10 mL de diclorometano, en tubos de vidrio de 20 mL. Luego se agitó en vórtex durante 5 min y se incubó a 135 rpm durante toda la noche. Posteriormente, se recuperó la fase orgánica para analizar por CG.

Observación: en la técnica de extracción se implementó un cambio cuando se desarrolló el experimento de microcosmos III, en la cual la fase orgánica recuperada al final de la extracción fue almacenada 24 hs para producir un efecto de decantación y sedimentar residuos sólidos. De esta manera se obtuvieron muestras que dieron resultados con mayor intensidad de señal para los picos.

6.4.2.2. Cromatografía gaseosa

El análisis cromatográfico se llevó a cabo con el cromatógrafo GC-2010 Plus (Shimadzu), equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar (100 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno, 0.5 μ m de espesor del film, Petrocol DH Sepulco). La temperatura inicial del horno fue de 45 °C, luego tres rampas de 8 °C / min a 150 °C, 4 °C / min a 250 °C, 8 °C / min a 300 °C, y se mantuvo a 300 °C durante 48 min. La temperatura del inyector fue de 300 °C y la temperatura del detector fue de 320 °C. El gas portador (H_2) tuvo un flujo de 2 ml / min. Los datos fueron adquiridos y analizados empleando el software GC-Solution. La cuantificación de los hidrocarburos totales (HT) de cada muestra de suelo fue determinada mediante la integración del cromatograma considerando el área bajo la curva de todos los picos, interpolando este valor en una curva de calibración. Dicha curva se construyó a partir del análisis cromatográfico de un suelo no contaminado al cual se le agregó distintas concentraciones de HC (mezcla en partes iguales de nafta, kerosene, nafta), en el rango de 1000 a 20000 ppm. El resultado de este procedimiento resultó una línea recta que relaciona el área de los picos con la concentración de HC:

$$C_{HT} = \frac{A - b}{m}$$

donde, C_{HT} es la concentración de hidrocarburos totales (ppm); A es el área de los picos obtenidos; m y b son la pendiente y el corte de la recta obtenida. Asimismo, numerosos picos fueron para identificados y cuantificados empleando los estándares 50.16.512 gravimetric standard DHA classis (PAC) y alcanes mix C8-C40 (Accustandard). Este método fue una adaptación de la determinación de hidrocarburos realizada por Ramirez et al. 2012 y Jiang et al. 2016.

7. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico utilizando diferentes sistemas de comparación mediante análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas y post-test de Tukey de comparación múltiple según el caso. El análisis se realizó a través del software Statgraphics.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Identificación de las cepas

1.1. Identificación bioquímica y susceptibilidad a antibióticos

Con las cepas aisladas previamente por Liporace et al. 2012, se procedió a la identificación bioquímica y molecular de las mismas. Se realizaron ensayos con los sistemas de identificación API (BioMérieux), API 20 NE para bacilos gram-negativos, aerobios, no fermentadores (Tabla 6); API 20 Strep para estreptococos (Tabla 7); API Coryne para corinebacterias (Tabla 8), para poder conocer los perfiles metabólicos de cada una. Paralelamente a esto, también se realizaron estudios de resistencia o susceptibilidad a los diferentes tipos de antibióticos (Tabla 9), lo cual nos permitirá en un futuro estudiar la presencia de genes plasmídicos que confieran resistencia a estos compuestos y a su vez esté relacionado con la metabolización de compuestos derivados del petróleo.

Según los resultados obtenidos se obtuvieron los siguientes perfiles metabólicos y susceptibilidades:

- CO1A1: Demostró asimilación de glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-acetil glucosamida, maltosa, glucanato, ácido cáprico, ácido adípico, ácido málico. Produjo acidificación a partir de ribosa, arabinosa, trealosa, almidón, glicógeno. Asimismo, se generó la fermentación de glucosa, ribosa, xilosa, manitol, maltosa, sacarosa. Presentó actividades enzimáticas de reducción de nitrato, catalasa, pirazinamidasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, β -glucosidasa, α -glucosidasa, leucina aminopeptidasa. También realizó hidrólisis de gelatina.
Mostró sensibilidad a eritromicina 15 μ g, imipenem 10 μ g, cefalotina 30 μ g, meropenem 10 μ g, vancomicina 30 μ g, minociclina 30 μ g, penicilina 10 U, piperaciclina 100 μ g / tazobactam 10 μ g. Mientras que presentó resistencia a ampicilina 10 μ g, ampicilina 10 μ g / sulbactama 10 μ g, ciprofloxacina 5 μ g.
- CO1A2: Demostró asimilación de glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-acetil glucosamida, maltosa, ácido cáprico, ácido adípico, ácido málico, citrato trisódico. No produjo reacciones de acidificación ni de fermentación, por lo que se trataría de un microorganismo aerobio estricto. Presentó actividades enzimáticas de fosfatasa alcalina,

α -glucosidasa, β -glucosidasa, pirolidonil arilamidasa, ureasa, catalasa, citocromo oxidasa.

Mostró sensibilidad a todos los antibióticos ensayados, imipenem 10 μ g, ampicilina 10 μ g, cefalotina 30 μ g, meropenem 10 μ g, vancomicina 30 μ g, ampicilina 10 μ g / sulbactama 10 μ g, minociclina 30 μ g, penicilina 10 U, piperaciclina 100 μ g / tazobactam 10 μ g, ciprofloxacina 5 μ g., excepto a eritromicina 15 μ g.

- MT1A3: Mostró asimilación de glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-acetil glucosamida, maltosa, glucanato, ácido cáprico, ácido adípico, ácido málico, citrato trisódico, ácido fenil acético. No produjo reacciones de acidificación ni de fermentación. Presentó actividades enzimáticas de reducción de nitrato, pirazinamidasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa, α -glucosidasa, pirolidonil arilamidasa, fosfatasa alcalina, leucina aminopeptidasa, ureasa, catalasa, citocromo oxidasa.
Presentó sensibilidad a imipenem 10 μ g, meropenem 10 μ g, minociclina 30 μ g, ciprofloxacina 5 μ g. Mientras que mostró resistencia a eritromicina 15 μ g, ampicilina 10 μ g, ampicilina 10 μ g / sulbactama 10 μ g, cefalotina 30 μ g, vancomicina 30 μ g, penicilina 10 U, piperaciclina 100 μ g / tazobactam 10 μ g.
- TK1A2: Mostró asimilación de glucosa, arabinosa, glucanato, ácido cáprico, ácido málico. No produjo reacciones de acidificación ni de fermentación. Presentó actividades enzimáticas de reducción de nitrato, hidrólisis de ácido hipúrico, leucina aminopeptidasa, arginina dihidrolasa, pirazinamidasa, β -glucosidasa, ureasa, catalasa, citocromo oxidasa.
Presentó sensibilidad solo a tres antibióticos, eritromicina 15 μ g, vancomicina 30 μ g, minociclina 30 μ g; mientras que mostró resistencia a imipenem 10 μ g, ampicilina 10 μ g, ampicilina 10 μ g / sulbactama 10 μ g, cefalotina 30 μ g, meropenem 10 μ g, penicilina 10 U, piperaciclina 100 μ g / tazobactam 10 μ g, ciprofloxacina 5 μ g.

Tabla 6. Identificación bioquímica de las cepas con API 20 NE.

<i>API 20 NE</i>	CO1A1	CO1A2	MT1A3	TK1A2
Reducción de nitratos en nitritos	+	-	+	+
Formación de Indole (Triptofano)	-	-	-	-
Fermentación (Glucosa)	+	-	-	-
Arginina dihidrolasa	-	-	-	-
Ureasa	-	+	+	+
β -glucosidasa	+	+	+	+
Hidrólisis (proteasa) gelatina	+	-	-	-
β -galactosidasa	+	-	+	-
Asimiliación (Glucosa)	+	+	+	+
Asimiliación (Arabinosa)	+	+	+	+
Asimiliación (Manosa)	+	+	+	-
Asimiliación (Manitol)	+	+	+	-
Asimiliación (N-Acetil-glucosamina)	+	+	+	-
Asimiliación (Maltosa)	+	+	+	-
Asimiliación (Gluconato potásico)	+	-	+	+
Asimiliación (Ácido cáprico)	+	+	+	+
Asimiliación (Ácido adípico)	+	+	+	-
Asimiliación (Ácido málico)	+	+	+	+
Asimiliación (Citrato trisódico)	-	+	+	-
Asimiliación (Ácido fenilacético)	-	-	+	-
Citocromo oxidasa	-	+	+	+

Tabla 7. Identificación bioquímica de las cepas con API 20 Strep.

<i>API 20 Strep</i>	CO1A1	CO1A2	MT1A3	TK1A2
Producción de acetona (piruvato)	-	-	-	-
Hidrólisis de ácido hipúrico	-	-	-	+
β -glucosidasa	+	+	+	+
Pirolidonil arilamidasa	-	+	+	-
α -Galactosidasa	+	-	+	-
β -Glucuronidasa	+	-	-	-
β -Galactosidasa	+	-	+	-
Fosfatasa alcalina	+	-	+	-
Leucina aminopeptidasa	+	+	+	+
Arginina dihidrolasa	-	-	-	+
Acidificación (Ribosa)	+	-	-	-
Acidificación (Arabinosa)	+	-	-	-
Acidificación (Manitol)	-	-	-	-
Acidificación (Sorbitol)	-	-	-	-
Acidificación (Lactosa)	-	-	-	-
Acidificación (Trehalosa)	+	-	-	-
Acidificación (Inulina)	-	-	-	-
Acidificación (Rafinosa)	-	-	-	-
Acidificación (Almidón)	+	-	-	-
Acidificación (Glicógeno)	+	-	-	-
β -Hemólisis	-	-	-	-

Tabla 8. Identificación bioquímica de las cepas con API Coryne.

<i>API Coryne</i>	CO1A1	CO1A2	MT1A3	TK1A2
Reducción de nitratos	+	-	+	+
Pirazinamidasa	+	-	+	+
Pirolidonil arilamidasa	-	-	-	-
Fosfatasa alcalina	+	-	-	-
β -Glucuronidasa	-	-	-	-
β -Galactosidasa	+	-	+	-
α -Glucosidasa	+	+	+	-
N-Acetil- β -Glucosaminidasa	-	-	-	-
β -glucosidasa	+	+	+	+
Ureasa	-	+	+	+
Hidrólisis gelatina	+	-	-	-
Fermentación (Glucosa)	+	-	-	-
Fermentación (Ribosa)	+	-	-	-
Fermentación (Xilosa)	+	-	-	-
Fermentación (Manitol)	-	-	-	-
Fermentación (Maltosa)	+	-	-	-
Fermentación (Lactosa)	-	-	-	-
Fermentación (Sacarosa)	+	-	-	-
Fermentación (Glicógeno)	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+

Tabla 9. Susceptibilidad antimicrobiana (sensible (S) o resistente (R)) de las cepas por el método de difusión de discos en agar, empleando diversos antibióticos.

Antibióticos	CO1A1	CO1A2	MT1A3	TK1A2
Eritromicina 15 µg	S	R	R	S
Imipenem 10 µg	S	S	S	R
Ampicilina 10 µg Sulbactama 10 µg	R	S	R	R
Cefalotina 30 µg	S	S	R	R
Meropenem 10 µg	S	S	S	R
Vancomicina 30 µg	S	S	R	S
Ampicilina 10 µg	R	S	R	R
Minociclina 30 µg	S	S	S	S
Penicilina 10 U	S	S	R	R
Piperaciclina 100 µg Tazobactana 10 µg	S	S	R	R
Ciprofloxacina 50 µg	R	S	S	R

Si bien los estudios bioquímicos y metabólicos nos sirven para ampliar nuestro conocimiento acerca de las cepas aisladas, los mismos no fueron suficientes para llegar a la identificación final. Es por eso que se realizaron ensayos de análisis genéticos, para poder saber a qué género y especie corresponden cada una.

1.2. Identificación genética

La identificación genética de las cepas bacterianas fue realizada en la cátedra de Biotecnología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, bajo la dirección de la Dra. Susana Vázquez. La identificación se realizó por análisis comparativo de la secuencia del gen ARNr 16S. Las secuencias genéticas obtenidas fueron procesadas con el software BioEdit® y comparadas con las existentes en las bases de datos: EZ Taxon, RDP y SILVA. Los resultados obtenidos mostraron (Tabla 10) que las cepas MT1A3 y TK1A2 pertenecen al género *Pseudomonas*, CO1A1 al *Cellulosimicrobium*, y CO1A2 al *Ochrobactrum*.

Tabla 10. Identificación genética de las cepas, a partir de secuencias del gen ARNr 16S.

	Largo de la secuencia (pares de bases)	Relacionada con	Identidad (%)
CO1A1	1373	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> LMG 16121 (T)	99,9
CO1A2	1338	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC49188 (T)	100
MT1A3	1402	<i>Pseudomonas kunmingensis</i> HL22-2 (T) JQ246444	99,4
TK1A2	1380	<i>Pseudomonas panipatensis</i> Esp-1 (T) EF424401	100

De acuerdo a la bibliografía consultada (Stackebrandt et al. 2004; Holmes et al. 1988; Xie et al. 2014; Gupta et al. 2008) las especies identificadas en este estudio se corresponden con los ensayos bioquímicos y metabólicos realizados en el apartado 1.1.

La clasificación taxonómica del género *Cellulosimicrobium* indica que pertenece al reino de bacteria, filo actinobacteria, clase actinobacteria, subclase actinobacteridae, orden actinomycetales, suborden micrococcineae, familia promicromonosporaceae (Schumann et al. 2001). Dentro de las especies encontradas en este género podemos mencionar *C. cellulans*, *C. funkei*, *C. terrum*. En el caso de la cepa CO1A1 mostró estar relacionada con *Cellulosimicrobium cellulans* LMG 16121 (T), con 99,5 % de identidad. Si bien *Cellulosimicrobium sp.* es un microorganismo celulolítico y hemicelulolítico, que produce varias enzimas (glicosidasa, proteasa, quitinasa), y es ampliamente empleado en la biodegradación de celulosa y xilano y en la fermentación alcohólica (Yuan et al. 2015), también se lo ha relacionado con la degradación de hidrocarburos (Nkem et al. 2016). Recientemente se demostró que una cepa *C. cellulans* aislada de suelos contaminados con hidrocarburos poliaromáticos de una planta de coque, presentó la capacidad de utilizar benzo(a)pirene como fuente de carbono y energía (Qin et al. 2018). De esta manera se posiciona a *C. cellulans* como un microorganismo potencial para la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos.

En el caso de CO1A2, los resultados genéticos mostraron que se encuentra relacionada con *Ochrobactrum anthropi* ATCC49188 (T), con 100 % de identidad. El género *Ochrobactrum* pertenece al reino bacteria, filo proteobacteria, clase alfa proteobacteria, orden rhizobiales, familia brucellaceae. Dentro del género *Ochrobactrum* se propuso a la especie *anthropi* (Holmes

et al. 1988), luego se reconocieron otras 18 especies dentro del género (LPSN, List of prokaryotic names with standing in nomenclature). Si bien *Ochrobactrum anthropi* ha sido reportado como una alfaproteobacteria común en el suelo que coloniza un alto espectro de organismos y principalmente reconocido como un patógeno oportunista en humano (Chain et al. 2011), otros estudios realizados muestran que tiene la capacidad de producir de exopolisácaridos para la degradación de diésel (Ramasamy et al. 2014). En otras especies dentro del género, como *Ochrobactrum intermedium*, *Ochrobactrum oryzae*, se han sido identificado microorganismos degradadores de hidrocarburos (Ghosal et al. 2010; Mishra & Singh 2012; Obi et al. 2016; Tirado-Torres et al. 2017; Chikere et al. 2017), incluso se ha detectado la presencia de ciertos genes, como el gen alcano 1-monooxigenasa para la degradación de alcanos, 2-poliprenilfenol hidroxilasa y fosfatasa alcalina responsables de la degradación de aminobenzoato, ácido 2-haloalcanoico dehalogenasa y alcohol dehidrogenasa para la degradación de cloroalcanos and cloroalquenos (Chai et al. 2015).

Dentro del género *Pseudomonas* encontramos a las cepas MT1A3 y TK1A2, perteneciente al reino bacteria, filum proteobacteria, clase gammaproteobacteria, orden pseudomonadales, familia pseudomonadaceae. Los microorganismos pertenecientes a este género, se encuentran distribuidos en la naturaleza, como agua y suelo, presentando una gran versatilidad metabólica que les permite sobrevivir y colonizar nichos ecológicos con condiciones poco favorables. Se los ha aislados de ambientes extremos donde predominan bajas temperaturas y altas salinidades, entre otros, y también en aquellos contaminados con hidrocarburos. Estas bacterias son capaces de crecer utilizando una amplia variedad de compuestos como fuente de carbono, entre ellos alifáticos, alicíclicos, aromáticos (Lageveen et al. 1988; van Beilen et al. 1994; Whyte et al. 1997; Barathi & Vasudevan 2001).

La identificación genética de MT1A3 mostró estar relacionada con *Pseudomonas kunmingensis* HL22-2 (T) JQ246444, con 99,4 % de identidad. Esta especie e incluso otras con gran similitud genética respecto a MT1A3, como *Pseudomonas xanthomarina* KMM 1447(T), *Pseudomonas alcaliphila* AL15-21(T) y *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588(T), con 98,9 %, 98,10 % y 98.06% de similitud respectivamente (Xie et al. 2014), mostraron ser capaces de degradar hidrocarburos (Muratova et al. 2015; El-Sheshtawy et al. 2014; Kaczorek et al. 2012; Sałek et al. 2015), Asimismo en *P. stutzeri* se realizó la predicción múltiple de genes que están involucrados en las vías catabólicas de los hidrocarburos, tales como protocatechuate 3,4-dioxigenasa, 3-carboximuconato cicloisomerasa, y 4-carboximuconolactona decarboxilasa, que corresponden a la vía central de degradación de compuestos aromáticos (Brown et al. 2017).

El análisis genético para la cepa TK1A2 resultó ser *Pseudomonas panipatensis* Esp-1 (T) EF424401, con 100 % de identidad. De hecho, el primer reporte en que se identifica genéticamente a esta cepa corresponde a un aislado de suelo contaminado con hidrocarburos perteneciente a una refinería en India (Gupta et al. 2008). Es importante destacar, que según el análisis filogenético de la secuencia parcial del 16S ARNr, *P. panipatensis* pertenece al grupo de *Pseudomonas aeruginosa* (Mulet et al. 2010); y diversos trabajos se han realizado empleando *Pseudomonas aeruginosa* en la degradación de hidrocarburos, por ejemplo compuestos alcanos C8-C36 (Liu et al. 2012; Varjani & Upasani 2016), y compuestos policíclicos aromáticos como naftaleno, fenantreno, antraceno (Qi et al. 2015; Fulekar 2017). En la cepa *P. aeruginosa* DQ8 se han identificado genes responsables del catabolismo de n-alcanos y policíclicos aromáticos, como por ejemplo el operón *alkBFGHJKL* que codifican enzimas involucradas en la oxidación de alcanos: alcano hidroxilasa (AlkB), dos rubredoxinas (AlkF y AlkG), una alcohol y aldehído dehidrogenasa (AlkJ y AlkH), una acil-coenzima A sintetasa (AlkK), y una proteína de función desconocida (AlkL). El operón *alkST* codifica para rubredoxina reductasa (AlkT), y AlkS regula positivamente la expresión del operón *alkBFGHJKL* y genes de *alkST* (Gai et al. 2012). Por otro lado, *P. aeruginosa* se ha probado en ensayos de microcosmos como estrategias de biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos (Das & Mukherjee 2007; Thavasi et al. 2011; Bezza & Chirwa 2016; Ramadass et al. 2018), e incluso se ha planteado como estrategia para remediar suelos salinos contaminados con estos compuestos (Ebadi et al. 2017).

Todas las cepas nativas que se han identificado genéticamente en este trabajo, presentan antecedentes publicados que relacionan a las mismas con el metabolismo de los hidrocarburos, posicionándose como potenciales microorganismos para ser empleados en estrategias de biorremediación.

2. Estudio de las cepas en cultivo líquido

2.1. Evaluación del crecimiento de las cepas, previamente identificadas, con hidrocarburos y/o glicerol como fuente de carbono.

Siendo que las cepas en estudio fueron previamente aisladas de áreas contaminadas con hidrocarburos (Liporace et al. 2012), se evaluó la capacidad de crecimiento de cada una de las cepas en cultivos líquidos de medio salino mínimo (MSM) suplementado con una mezcla de hidrocarburos (HC) de nafta, kerosene y diesel como única fuente de carbono. Para ello se ensayaron dos concentraciones de HC, 2 y 4,5 % (v/v). Además, se emplearon dos controles utilizando medios formulados con 2 y 4,5 % (v/v) de HC, los cuales no fueron inoculados.

De esta manera se observó que todas las cepas fueron capaces de crecer en presencia de hidrocarburos como única fuente de carbono y energía, obteniéndose valores que van desde 0,11 hasta 1,86 g/L (Figura 4, Figura 5, Tabla 11, Tabla 12). En los ensayos donde el medio contenía 2 % (v/v) de HC, el crecimiento de todas las cepas fue inferior que en los ensayos de 4,5 % (v/v) de HC. Lo cual indicaría que cuando se emplea 2 % (v/v) de HC, la fuente de carbono resultaría ser un factor limitante para el crecimiento, en comparación con 4,5 % (v/v) de HC.

Asimismo, es importante destacar que la cepa de mayor crecimiento resultó ser MT1A3, tanto en 2 % (v/v) como en 4,5 % (v/v) de HC, alcanzado valores de 0,63 y 1,86 g/L respectivamente. A los 5 días de incubación, cuando los cultivos se encontraron en la fase estacionaria, la biomasa obtenida para MT1A3 fue significativamente mayor al resto de las cepas, siendo 42,85 % hasta 93,01 % superior al resto (Tabla 11, Tabla 12).

También se realizó el seguimiento del pH de los cultivos a lo largo del periodo de incubación. En la tabla 11 y tabla 12 se muestran los valores de pH al final del ensayo. En todos los casos se observó una tendencia al aumento de pH, siendo que inicialmente era 7. La cepa MT1A3 fue la que registró mayor pH, 8,34 y 7,98, a 2 % (v/v) y 4,5 % (v/v) de HC, respectivamente; y esto coincide en que fue la que presentó mayor desarrollo de biomasa también. Probablemente este efecto se debe una mayor actividad metabólica, ya que se sabe que el pH del medio de cultivo microbiano es modificado por los productos terminales del metabolismo (Atlas & Bartha 2002).

Paralelamente, se realizaron mediciones de la tensión superficial (TS) en los sobrenadantes de los cultivos para obtener una medida indirecta de la síntesis de biosurfactantes

por parte de cada una de las cepas. La importancia de buscar esta característica en los microorganismos analizados radica en que muchas bacterias degradadoras de hidrocarburos presentan la capacidad de emulsionar el sustrato en disolución mediante la producción de biosurfactantes, de esta manera responderían a la necesidad de cambiar la superficie interfacial de la célula o el medio ambiente local, para aumentar la interacción entre las células microbianas y los hidrocarburos, dando como resultado una mayor velocidad de difusión, utilización de sustrato y crecimiento celular en hidrocarburos (Hommel 1990; Neu 1996; Desai & Banat 1997; Bredholt et al. 1998).

En todos los casos, los resultados de TS no mostraron diferencias significativas con respecto al control, dado que los valores disminuyeron hasta 42,37 mN / m en relación con 46,41 mN / m del control 2 % (v/v) de HC; y hasta 42,41 mN / m en relación con 47,40 mN / m del control 4,5 % v/v de HC, a los 5 días de incubación. (Figura 4, Figura 5, Tabla 11, Tabla 12). Con estos resultados no se podría considerar que son cepas productoras de biosurfactantes, o al menos no producen tensioactivos eficientes para disminuir la tensión superficial en relación a su control, ya que se considera que un biosurfactante eficiente puede reducir la tensión superficial entre el agua pura y el aire de 72 mN / m a menos de 30 mN / m. Por ejemplo, la surfactina es uno de los biosurfactantes más potentes y puede reducir la tensión superficial del agua de 72 mN / m a 27 mN / m (Cooper 1986). En nuestros casos, ya partimos de controles que presentan baja TS, 46,41 mN / m en 2 % (v/v) de HC y 47,40 mN / m en 4,5 % (v/v) de HC, siendo valores inferiores al TS del agua (72 mN / m), sin embargo, los cultivos inoculados no lograron bajar la TS hasta 30 mN / m, como indica la bibliografía de referencia. Con lo cual, si bien las cepas pueden usar la mezcla de hidrocarburos como fuente de carbono y energía, no se ha podido demostrar experimentalmente por el método del anillo de Du Nouy en el tensiómetro, que las cepas nativas evaluadas en este trabajo producen biosurfactantes.

En base a esta situación, podemos pensar que alguna/s cepa/s tal vez produce/n biosurfactantes en pequeñas cantidades, lo suficiente para poder crear un microambiente alrededor de la célula y permitir la incorporación de los hidrocarburos cercanos a la superficie celular, e ingresar al metabolismo de la misma. Pero esta cantidad de biosurfactantes producido no sería suficiente para lograr disminuir la TS medida con el tensiómetro. De otro modo, podríamos pensar que las condiciones de cultivo, por ejemplo, la agitación a 135 rpm, están favoreciendo la difusión de los hidrocarburos hacia las células, y de allí estimular el crecimiento celular de estas cepas (Rosenberg 1993; Kronemberger et al. 2008).

Tabla 11. Biomasa, pH y TS de los cultivos, en medios con 2 % de HC, medidos a los 5 días de incubación.

	2 % HC		
	Biomasa (g/L)	pH	TS (mN/m)
Control			46,41 ± 0,17
CO1A1	0,11 ± 0,04	7,32 ± 0,04	43,27 ± 1,87
CO1A2	0,22 ± 0,01	7,48 ± 0,09	43,41 ± 1,34
MT1A3	0,63 ± 0,05	7,98 ± 0,12	42,95 ± 1,61
TK1A2	0,13 ± 0,03	7,55 ± 0,07	42,37 ± 1,20

Tabla 12. Biomasa, pH y TS de los cultivos, en medios con 4,5 % de HC, medidos a los 5 días de incubación.

	4,5 % HC		
	Biomasa (g/L)	pH	TS (mN/m)
Control			47,40 ± 1,57
CO1A1	0,13 ± 0,01	7,55 ± 0,07	47,27 ± 0,45
CO1A2	0,66 ± 0,06	7,63 ± 0,09	46,91 ± 1,20
MT1A3	1,86 ± 0,07	8,34 ± 0,15	42,95 ± 1,61
TK1A2	0,47 ± 0,01	7,77 ± 0,10	42,41 ± 1,42

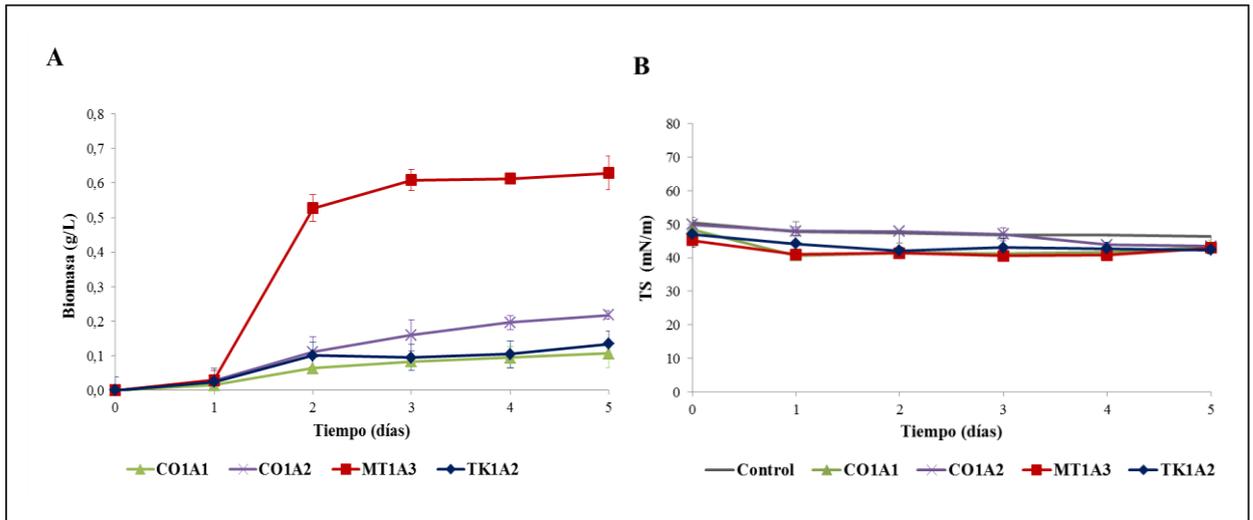


Figura 4. (A) Crecimiento celular de las cepas en MSM + HC (2%), y (B) tensión superficial de los sobrenadantes de los cultivos, en el transcurso de 5 días de incubación.

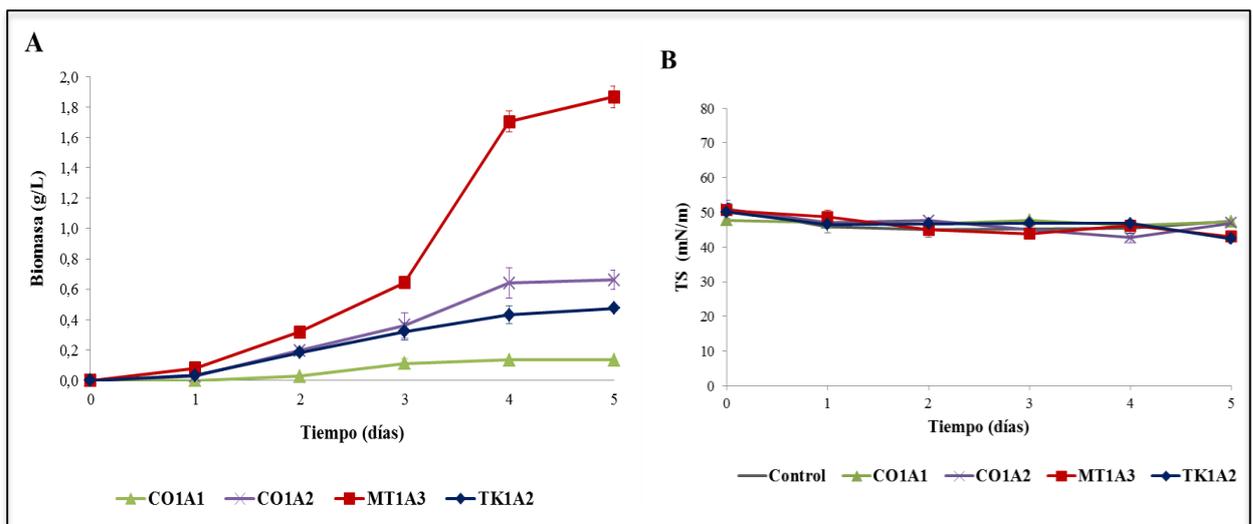


Figura 5. (A) Crecimiento celular de las cepas en MSM + HC (4,5%), y (B) tensión superficial de los sobrenadantes de los cultivos, en el transcurso de 5 días de incubación.

Bajo estas condiciones de cultivos y en base a los resultados obtenidos, se evaluó la capacidad de las cepas de crecer en glicerol (2% v/v) como única fuente de carbono y concomitantemente poder observar si la producción de agentes tensioactivos puede venir acompañado con el uso de este sustrato. En estudios realizados en cepas de *P. aeruginosa* se observó la producción de ramnolípidos cuando se empleó glicerol en el medio de cultivo (Santa Anna et al. 2002). Además el glicerol representa ser una fuente de carbono alternativa muy interesante por tratarse de un co-producto de la industria local de bajo costo.

Los resultados mostraron que las cepas nativas presentaron la capacidad de crecer en un medio con glicerol como única fuente de carbono y energía. Nuevamente, se observó que MT1A3 fue la cepa que presentó mayor rendimiento de biomasa, registrando un valor de 2,61 g/L a los 5 días de incubación (Figura 6, Tabla 13). En cuanto al pH, se observó nuevamente un incremento del mismo, como se observó cuando los HC fueron utilizados como fuente de carbono.

En todos los casos, la producción de biomasa se vió aumentada cuando se utilizó glicerol comparada con el uso de HC, lo cual es esperable ya que el glicerol es una fuente de carbono más asimilable en comparación con la mezcla de hidrocarburos.

En relación a la TS, no se observaron disminuciones de los valores de la misma con respecto al control durante los 5 días que duró el ensayo (Figura 6, Tabla 13). Esta circunstancia vuelve a repetirse si lo comparamos con los resultados obtenidos en los medios con HC. Si bien existen antecedentes en relación a la producción de biosurfactantes eficientes por parte del género *Pseudomonas* (Syldatk et al. 1985; van Dyke et al. 1993; Rahman et al. 2002; Moussa et al. 2014), en el caso de las cepas MT1A3 y TK1A2 que pertenecen a este género, los resultados de ST no demostraron dicha característica.

Tabla 13. Biomasa, pH y TS de los cultivos, en medios con 2 % de glicerol, medidos a los 5 días de incubación.

	Glicerol (2%)		
	Biomasa (g/L)	pH	TS (mN/m)
Control			68,85 ± 2,84
CO1A1	0,38 ± 0,04	7,56 ± 0,09	67,29 ± 1,41
CO1A2	1,07 ± 0,08	7,79 ± 0,05	67,03 ± 1,39
MT1A3	2,61 ± 0,06	8,41 ± 0,12	65,95 ± 2,25
TK1A2	0,71 ± 0,10	7,85 ± 0,11	68,11 ± 1,08

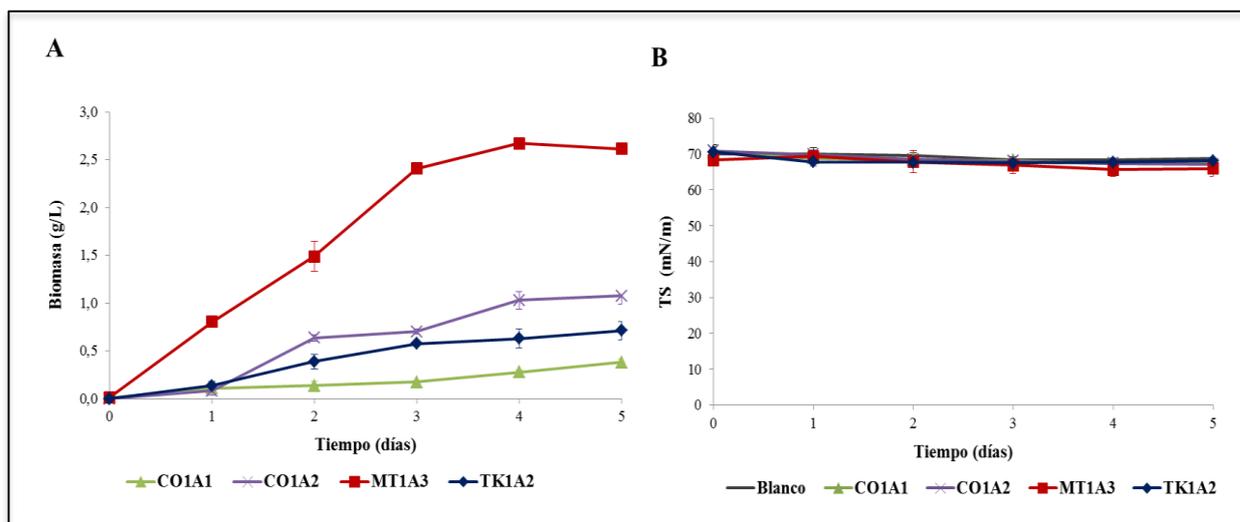


Figura 6. (A) Crecimiento celular de las cepas en MSM + glicerol (2%), y (B) tensión superficial de los sobrenadantes de los cultivos, en el transcurso de 5 días de incubación.

2.2. Evaluación de la influencia sobre el crecimiento de MT1A3 de fuentes de carbono y de nitrógeno

En base a los ensayos realizados, dado que la cepa MT1A3 fue la que presentó mayor concentración de producción de biomasa en medio formulados ya sea con la mezcla de HC o glicerol como fuentes de carbono (ver sección resultados 2.1.), fue la seleccionada para abordar los estudios descriptos a continuación.

Se procedió a evaluar la producción de biomasa de MT1A3 frente a la utilización de fuentes de carbono alternativas y fuentes de nitrógeno.

Entre los sustratos de carbono se emplearon HC, glicerol, glucosa y varios co-productos agroindustriales de bajo costo: suero de leche bovino, suero de leche ovino, aceite de girasol refinado, aceite de girasol alto oleico, aceite de maní crudo, aceite de maní frito, aceite de camelina, maní prensado molido provistos por diferentes empresas regionales. MT1A3 fue capaz de crecer en todas las fuentes de carbono ensayadas, pero el crecimiento fue significativamente mayor en aceite de maní crudo con respecto a todos los otros sustratos ($p < 0,05$), obteniéndose una biomasa de 7,29 g/L (Tabla 14).

Tabla 144. Biomasa y pH de los cultivos de MT1A3, en distintas fuentes de carbono.

Fuente de carbono	Biomasa (g/L)	pH
HC (4,5%)	1,74 ± 0,11	8,12 ± 0,09
Glucosa (2%)	4,01 ± 0,14	7,15 ± 0,05
Glicerol (2%)	2,69 ± 0,13	8,25 ± 0,12
Suero de leche bovino (2%)	2,21 ± 0,09	6,86 ± 0,08
Suero de leche ovino (2%)	1,94 ± 0,06	6,67 ± 0,09
Aceite de girasol refinado (2%)	3,98 ± 0,12	7,35 ± 0,13
Aceite de girasol alto oleico (2%)	2,78 ± 0,15	7,49 ± 0,10
Aceite de maní crudo (2%)	7,29 ± 0,49	7,61 ± 0,11
Aceite de maní frito (2%)	2,08 ± 0,11	7,27 ± 0,07
Aceite de Camelina (2%)	1,23 ± 0,19	7,02 ± 0,05
Maní prensado molido (2%)	4,42 ± 0,25	7,25 ± 0,13

Por otro lado, se evaluó la tensión superficial en los ensayos para ver si con el uso de estas fuentes de carbono la cepa era capaz de producir agentes tensioactivos. Para estos casos se observó que los cultivos que contenían sustratos de naturaleza oleica no fueron capaces de bajar la tensión superficial, y además observamos que los controles correspondientes a estas fuentes de carbono, inicialmente mostraron una baja TS con respecto al MSM, debiéndose a las propiedades tensioactivas que presentan los ácidos grasos (Tabla 15). Si bien hay reportes que han mostrado que diferentes tipos de microorganismos, como es el caso de *P. aeruginosa*, al crecer en medios de cultivos con aceites vegetales, como sustratos hidrofóbicos, son eficientes para la producción de biosurfactantes (Maier & Soberón-Chávez 2000; Mata-Sandoval et al. 2001; Lotfabad et al. 2009; Govindammal 2014); en el caso de MT1A3 no detectamos esta característica al hacerla crecer en las fuentes de carbono empleadas en este estudio.

Tabla 15. TS de los controles y los cultivos de MT1A3, en distintas fuentes de carbono.

Fuente de carbono	TS (mN/m)	
	Control	MT1A3
HC (4,5%)	43,25 ± 0,08	40,24 ± 0,09
Glucosa (2%)	61,57 ± 0,12	55,58 ± 0,53
Glicerol (2%)	69,09 ± 0,05	65,86 ± 0,07
Suero de leche bovino (2%)	60,75 ± 0,23	55,44 ± 0,58
Suero de leche ovino (2%)	60,05 ± 0,08	52,62 ± 0,11
Aceite de girasol refinado (2%)	38,71 ± 0,13	33,88 ± 0,24
Aceite de girasol alto oleico (2%)	40,95 ± 0,07	40,29 ± 0,08
Aceite de maní crudo (2%)	39,11 ± 0,15	34,22 ± 0,32
Aceite de maní frito (2%)	41,87 ± 0,07	41,07 ± 0,18
Aceite de Camelina (2%)	35,22 ± 0,11	33,05 ± 0,12
Maní prensado (2%)	46,25 ± 0,14	45,71 ± 0,21

Todos los organismos necesitan nitrógeno para sintetizar enzimas, proteínas y ácidos nucleicos. El producto final de todas las vías de asimilación del nitrógeno es la forma más reducida del elemento, el ion amonio (NH_4^+). Algunos microorganismos, tales como los que pertenecen al género *Pseudomonas*, poseen capacidad para asimilar el nitrato (NO_3^-) y el nitrito (NO_2^-) de manera reductiva al convertir a estos iones en amoníaco (NH_3) (Atlas & Bartha 2002). Como tal previamente observamos en las características bioquímicas (Tabla 6, sección resultados 1.1.) que MT1A3 presenta la capacidad de reducir nitrato a nitrito.

El siguiente paso fue establecer la fuente de nitrógeno apropiada para el crecimiento de la cepa MT1A3. Las mismas fueron NaNO_3 , NH_4Cl y urea. Como fuente de carbono, fue utilizado aceite de maní crudo, dado que previamente observamos que fue el mejor sustrato en donde se observó la mejor producción de biomasa.

La fuente de nitrógeno que resultó ser la más eficiente para la obtención de biomasa de MT1A3 fue NaNO_3 , con un valor de 7,14 g/L. Los valores para NH_4Cl y urea fueron significativamente menores, siendo 1,71 y 0,62 g/L, respectivamente (Tabla 16). Es importante destacar que en el caso de NH_4Cl , el cultivo tuvo una caída de pH hasta 5,35, provocando la acidificación del medio y junto a esto quizás una inhibición del crecimiento de la cepa, ya que el cloruro de amonio eleva la acidez al incrementar la concentración de H^+ libres, provocando

cambios en la composición química del medio. Por otro lado, nuevamente los valores de TS no disminuyeron significativamente con respecto a cada control.

Tabla 16. Biomasa, pH y TS de los cultivos de MT1A3, en distintas fuentes de nitrógeno.

Fuente de nitrógeno	Biomasa (g/L)	pH	TS (mN/m)	
			Control	MT1A3
NaNO ₃ (4g/L)	7,14 ± 0,35	8,15 ± 0,10	39,96 ± 0,37	34,90 ± 2,46
NH ₄ Cl (2,5g/L)	0,62 ± 0,12	5,36 ± 0,11	41,10 ± 0,83	37,69 ± 0,83
Urea (1,39g/L)	1,71 ± 0,18	7,08 ± 0,05	38,32 ± 1,82	39,75 ± 1,83

2.3. Evaluación del crecimiento a distintas concentraciones de hidrocarburos y temperaturas de incubación

Con el objetivo de buscar maximizar la producción de biomasa y mejorar las condiciones de cultivo, se llevaron a cabo estudios en cuanto a su crecimiento a diferentes concentraciones de HC y poder evaluar la máxima concentración tolerada y a diferentes temperaturas de incubación que optimice el uso de HC como única fuente de carbono. Con tal fin, se realizaron ensayos con medio MSM suplementado con HC, 2; 4,5; 20; 50 y 60 % (v/v). Las temperaturas de incubación fueron 20 y 25 °C.

Se observó que MT1A3 presentó la capacidad de crecer a concentraciones de hasta 50 % (v/v) de HC, en cuya concentración se obtuvo 0,90 g/L a 20 °C y 1,17 g/L a 25 °C, a los 14 días de cultivo (Figura 7). No se observó crecimiento cuando la cepa fue expuesta a 60 % (v/v). No obstante, que la bacteria pueda tolerar hasta 50 % (v/v) y luego de 14 días de incubación y a ambos rangos de temperatura estudiada, demuestra ser una cepa con potencial para ser usada en tecnologías de remediación. Esto se correlaciona con estudios donde se han reportado el crecimiento de microorganismos con altas tolerancias a compuestos como tolueno, xileno, estireno, fenol (Heipieper et al. 1994, Rabodonirina et al. 2019).

La mayor producción de biomasa fue cuando la cepa se cultivó a 4,5 % (v/v) de HC, obteniéndose 1,36 g/L a 20 °C y 1,79 g/L a 25 °C, a los 7 días (Figura 7).

Con estos ensayos pudimos observar el comportamiento frente a la adaptación metabólica de la misma (Atlas & Bartha 2002), al aumentar la concentración de HC, la fase lag en la curva de crecimiento se hacía más larga. Este tiempo de adaptación requerido por MT1A3,

probablemente se debe al hecho de que las bacterias Gram negativas tolerantes a solventes necesitan realizar ciertos cambios en la composición y estructura de la membrana externa de la pared celular en respuesta a la exposición a solventes, dado que la tolerancia es un proceso multifactorial que involucra cambios genéticos y fisiológicos (Obuekwe et al. 2005; Segura et al. 2012). Por ejemplo, se ha visto que *P. aeruginosa* creciendo en un medio con 33 % (v/v) de alcanos, varía la hidrofobicidad y la proteómica de la membrana externa (Hemamalini & Khare 2014).

Otro factor a considerar fue la temperatura, en donde se evaluó la influencia de la misma en el crecimiento de MT1A3, a 20 y 25 °C. El crecimiento microbiano fue mayor a 25 °C que a 20 °C, para todos los casos (Tabla 17 y Tabla 18). Este efecto puede atribuirse a que la temperatura influye directamente sobre la actividad biológica de los procariontes (Atlas & Bartha 2005). Por otro lado, se ha estudiado que varios factores de un sistema, entre ellos la temperatura, pueden influir sobre la correlación entre el grado de disolución de un hidrocarburo y la tasa de biodegradación de los compuestos insolubles (Thomas et al. 1986; Ortega Calvo & Alexander 1994; Koshlaf & Ball 2017).

Junto con la estimación de biomasa se realizó la medición de pH y de TS durante los días de incubación. Estos parámetros mostraron los mismos comportamientos que en los ensayos anteriores (sección resultados 2.1.), una tendencia al aumento del pH y un registro de la TS similares a los controles (medios con 2, 4.5, 20, 50 y 60 % (v/v) de HC sin inocular). En las tablas 17 y 18, se muestran los valores obtenidos de cada condición al final del ensayo.

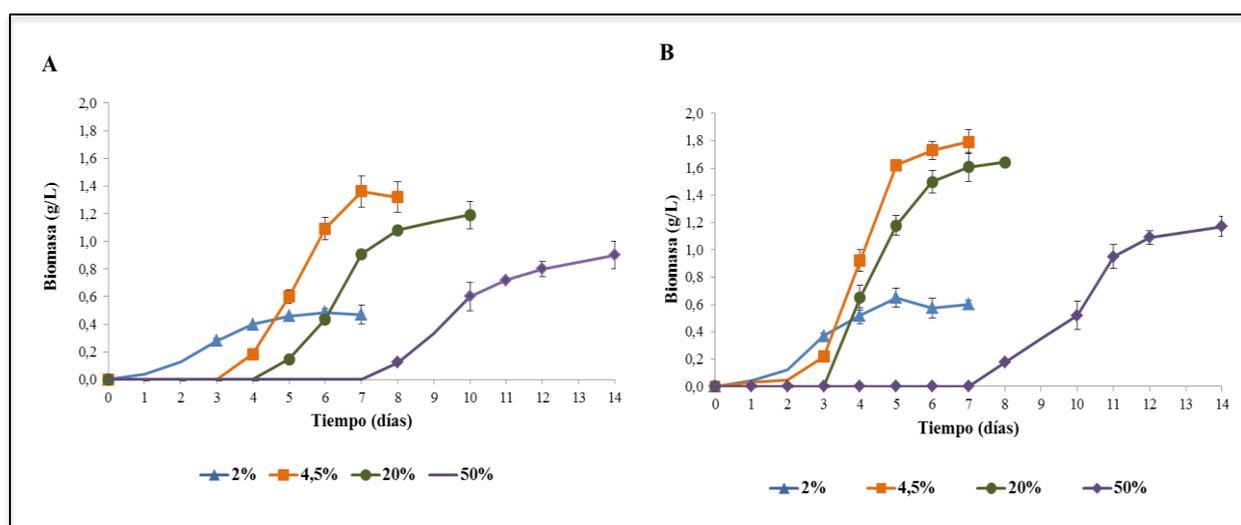


Figura 7. Crecimiento celular de MT1A3 en medio MSM suplementado con 2; 4,5; 20 y 50 % de HC; a 20 °C (A) y 25 °C (B).

Tabla 17. Biomasa, pH y TS de los cultivos de MT1A3, en medios con 2; 4,5; 20 y 50 % de HC, mantenidos a 20 °C.

Condiciones	Temperatura 20 °C			Tiempo (días)
	Biomasa (g/L)	pH	TS (mN/m)	
Control 2 % HC			46,05 ± 0,35	
MT1A3 en 2 % HC	0,47 ± 0,07	7,46 ± 0,06	44,37 ± 1,02	7
Control 4,5 % HC			46,22 ± 0,60	
MT1A3 en 4,5 % HC	1,32 ± 0,11	8,02 ± 0,09	42,82 ± 1,22	8
Control 20 % HC			41,16 ± 0,75	
MT1A3 en 20 % HC	1,19 ± 0,10	7,86 ± 0,10	41,75 ± 1,09	10
Control 50 % HC			40,20 ± 0,75	
MT1A3 en 50 % HC	0,90 ± 0,07	7,66 ± 0,12	41,55 ± 0,86	14

Tabla 15. Biomasa, pH y TS de los cultivos de MT1A3, en medios con 2; 4,5; 20 y 50 % de HC, mantenidos a 25 °C.

Condiciones	Temperatura 25 °C			Tiempo (días)
	Biomasa (g/L)	pH	TS (mN/m)	
Control 2 % HC			45,95 ± 0,45	
MT1A3 en 2 % HC	0,60 ± 0,03	7,75 ± 0,10	42,97 ± 0,95	7
Control 4,5 % HC			45,12 ± 0,50	
MT1A3 en 4,5 % HC	1,79 ± 0,09	8,13 ± 0,06	42,28 ± 1,05	7
Control 20 % HC			42,35 ± 0,65	
MT1A3 en 20 % HC	1,64 ± 0,01	8,05 ± 0,08	41,29 ± 1,03	8
Control 50 % HC			41,79 ± 0,35	
MT1A3 en 50 % HC	1,17 ± 0,07	7,94 ± 0,11	42,02 ± 0,93	14

2.4. Estudio de la biodegradación de las diferentes fracciones de los hidrocarburos por parte de MT1A3.

El siguiente paso fue evaluar la capacidad de MT1A3 para degradar hidrocarburos de diferentes pesos moleculares. Previamente ya habíamos observado que MT1A3 es capaz de crecer en un medio con HC como única fuente de carbono (sección resultados 2.1.), pero en esta instancia intentamos dilucidar si la cepa metaboliza las tres fracciones de la mezcla HC (nafta, kerosene, diesel) o sólo alguna/s de ella/s, siendo que cada fracción representa distintos compuestos de hidrocarburos. En este contexto se cultivó el microorganismo en medios formulados con las tres fracciones por separado y juntos contenidos en la mezcla HC.

Como se muestra en la figura 8 hubo crecimiento microbiano en todos ellos. Es decir, que esta cepa nativa presenta la capacidad de metabolizar y de utilizar como fuente de carbono y energía, compuestos de las tres fuentes de hidrocarburos, nafta, kerosene y diésel por separado usadas en este estudio. Es así que la biomasa obtenida fue mayor en el medio con la mezcla de HC (1,76 g/L), lo cual es esperable ya que presentaba mayor concentración de fuente de carbono (4,5 %) con respecto al resto de las fracciones (1,5%).

En cuanto a los cultivos con las tres fracciones de hidrocarburos por separado MT1A3 presentó una producción de biomasa diferencial, siendo en diésel 1,49 g/L, luego en nafta 0,69 g/L y por último en kerosene 0,15 g/L, a los 10 días de cultivo. La misma tendencia se observó a los 5 días de incubación (Figura 8). Estos datos indicarían que MT1A3 presenta mayor capacidad para utilizar como sustrato el diésel, luego nafta y kerosene.

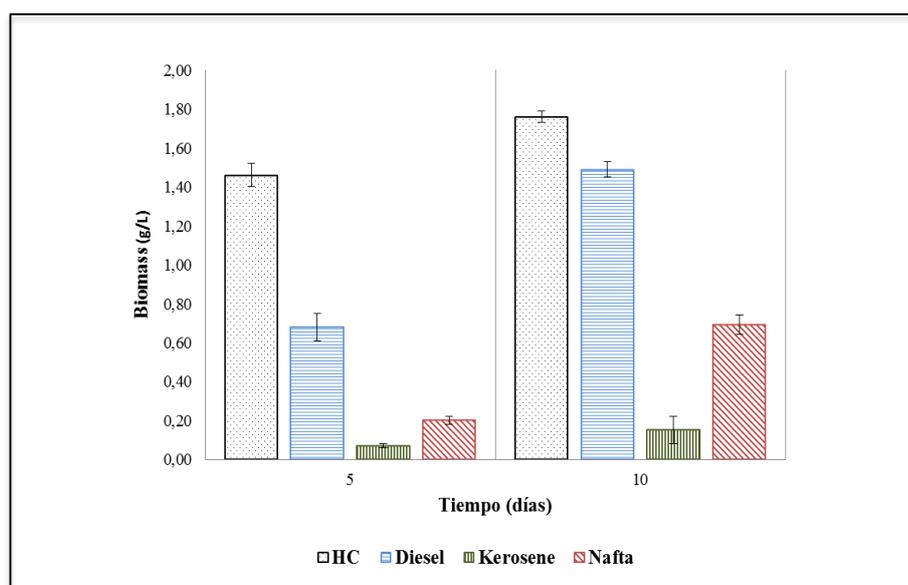


Figura 8. Crecimiento celular (g/L) de MT1A3 en medio MSM suplementado con HC (4,5 %), diesel (1,5 %), kerosene (1,5 %) o nafta (1,5 %); medido a los 5 y 10 días de incubación.

Mediante la técnica de cromatografía gaseosa (CG) se determinó la cantidad de hidrocarburos totales (HT) presentes en todos los ensayos a los 0, 5 y 10 días de incubación. Se definió HT como la concentración hidrocarburos totales expresada en ppm.

La cepa MT1A3 crecida en la mezcla de HC mostró una degradación de 26051 ppm a 14702 ppm de HT, representando una disminución del 56,43% con respecto al control a los 5 días de incubación. Entre los 5 y 10 días de cultivo tanto para el ensayo control como para MT1A3, no se observaron diferencias significativas en cuanto a los valores de HT (Tabla 19).

Cuando fue analizado el porcentaje de degradación de cada uno de los componentes de la mezcla de HC, se observó que el mayor valor fue el correspondiente al cultivo que contenía diesel, siendo de 46,24% en comparación con el control, a los 10 días (Tabla 19). Este resultado se correlaciona con los valores anteriormente obtenidos en cuanto a la producción de biomasa (Figura 8).

Tabla 16. Concentración (ppm) de hidrocarburos totales (HT) en los controles y cultivos de MT1A3, evaluados en distintas fuentes de hidrocarburos, HC, diesel, kerosene y nafta; a los 0, 5 y 10 días de incubación.

	HT (ppm)				
	0	5		10	
	Control	Control	MT1A3	Control	MT1A3
HC	36582 ± 409	31023 ± 251	17928 ± 309	26051 ± 305	14702 ± 210
Diesel	12881 ± 223	10081 ± 154	7510 ± 103	8780 ± 301	4724 ± 166
Kerosene	11664 ± 352	10382 ± 232	9943 ± 214	9555 ± 195	6194 ± 233
Nafta	11520 ± 275	6020 ± 201	4962 ± 239	5422 ± 122	3412 ± 169

Los análisis de CG que se muestran a continuación corresponden a la identificación de cada analito presente en las diferentes fracciones de hidrocarburos (nafta, kerosene y diésel) y la mezcla HC utilizadas como fuente de carbono, realizadas al inicio (día 0) y a los 10 días de cultivo, dado que en el caso de los mismos que fueron crecidos en kerosene, nafta y diésel a los 5 días, la cepa todavía continuaba en fase exponencial.

En la figura 9 se muestran los cromatogramas correspondientes a los ensayos cuando se utilizó la mezcla de HC como fuente de carbono, tanto para el inicio del ensayo (día 0) como para el control y la cepa MT1A3 a los 10 días de cultivo.

Con respecto al ensayo correspondiente al día 0, varios picos fueron identificados, los cuales se corresponden a un total de 20 compuestos que van desde C7 al C20: tolueno, etilbenceno, o-xileno, 1c,2t,3c-trimetilciclohexano, 1,1,2-trimetilciclohexano, n-nonano, n-decano, 2,3-dihidroindeno, t-decahidronaftaleno, n-undecano, 1,2,4,5-tetrametilbenceno, n-dodecano, n-tridecano, n-tetradecano, n-pentadecano, n-hexadecano, n-heptadecano, n-octadecano, n-nonadecano, n-eicosano. Luego de 10 días de incubación se registró que la concentración de los compuestos identificados disminuyó 36,03 % en el control y 70,37 % en el cultivo con MT1A3. Asimismo, tanto en el cultivo control como en el cultivo inoculado, se detectaron 15 compuestos de C9 a C20, y no se registró la presencia de tolueno, etilbenceno, o-xileno, 1c,2t,3c-trimetilciclohexano, 1,1,2-trimetilciclohexano, al final del ensayo, esto se puede atribuir que sea a causa de efectos abióticos, como la volatilización, ocurridos durante el periodo la incubación (Tabla 20).

En la figura 10 se pueden observar los cromatogramas correspondientes a los ensayos realizados con diesel: el control al día 0, el control y con MT1A3 a los 10 días de cultivo. En el control al día 0 se detectaron 12 picos pertenecientes a compuestos que van desde C9 a C20, entre ellos 1,1,2-trimetilciclohexano, n-nonano, 2,3-dihidroindeno, t-decahidronaftaleno, n-undecano, 1,2,4,5-tetrametilbenceno, n-dodecano, n-tridecano, n-tetradecano, n-pentadecano, n-hexadecano, n-heptadecano, n-octadecano, n-nonadecano, n-eicosano. Todos estos picos se identificaron en el control de diésel a los 10 días, con una disminución de la concentración de 17,42 %, esto puede deberse a efectos de volatilización. En el caso del cultivo de diesel con MT1A3, también se identifican los mismos picos pero con una reducción de 64,18 %, y la ausencia de 1,1,2-trimetilciclohexano, n-nonadecano e n-eicosano. Esto podría indicar que los mismos presentaron una concentración donde el límite de detección de la técnica no alcanzó a cubrir, o bien los mismos fueron degradados de manera completa por acción de MT1A3 (Tabla 21).

En el ensayo correspondiente a los cultivos con kerosene, al inicio se identificaron 6 compuestos, de C9 a C14, los cuales fueron n-nonano, n-decano, n-undecano, n-dodecano, n-tridecano, n-tetradecano. A los 10 días de incubación, en el caso del control se detectaron todos mismos los picos identificados al día 0, con una disminución 16,79 %; mientras que el cultivo con MT1A3 mostró una reducción de la concentración de 45,29 % y la ausencia de n-nonano y n-decano (Figura 11, Tabla 22).

Cuando se analizó la nafta en los medios de cultivos, inicialmente pudieron detectarse 9 compuestos, de C7 a C12, los cuales fueron tolueno, etilbenceno, o-xileno, 1c,2t,3c-trimetilciclohexano, n-nonano, n-decano, t-decahidronaftaleno, 1,2,4,5-tetrametilbenceno, n-

dodecano. Luego a los 10 días de incubación, el control presentó los mismos compuestos, pero con una reducción del 34,13 % con respecto al día 0. En cambio en el cultivo con MT1A3 se observó una reducción de 68,52 % de todos los picos identificados, y se registró la ausencia de 3 compuestos, etilbenceno, o-xileno y 1c,2t,3c-trimetilciclohexano (Figura 12, Tabla 23).

En base a los analitos identificados, el perfil de degradación de hidrocarburos por parte de MT1A3 indicaría que esta bacteria presentaría la capacidad de metabolizar compuestos como tolueno, etilbenceno, o-xileno, 1c,2t,3c-trimetilciclohexano, n-nonano, n-decano, n-undecano, n-dodecano, n-tridecano, n-tetradecano, n-pentadecano, n-hexadecano, n-heptadecano, n-octadecano, n-nonadecano, n-eicosano. Sin embargo la predominancia para metabolizar cada uno de estos compuestos parece estar influenciada por los tipos de hidrocarburos que están presentes en el medio (Hammershøj et al. 2019). Por ejemplo, n-nonano es medianamente metabolizado por la bacteria en los medios con solo diesel o solo nafta, mientras que es totalmente metabolizado cuando la única fuente es kerosene. Posiblemente en los dos primeros medios la bacteria encuentra mayor disponibilidad de otros sustratos de hidrocarburos, en cambio, en el cultivo con kerosene ante la ausencia de otros sustratos emplea al n-nonano como recurso.

Finalmente, dado que el perfil de analitos identificados está representado predominante por la presencia de alcanos, de cierta manera nos permitiría pensar que gran parte de los compuestos degradados en los ensayos con mezcla de HC / diésel / kerosene / nafta lo constituyen los alcanos de C8 a C20.

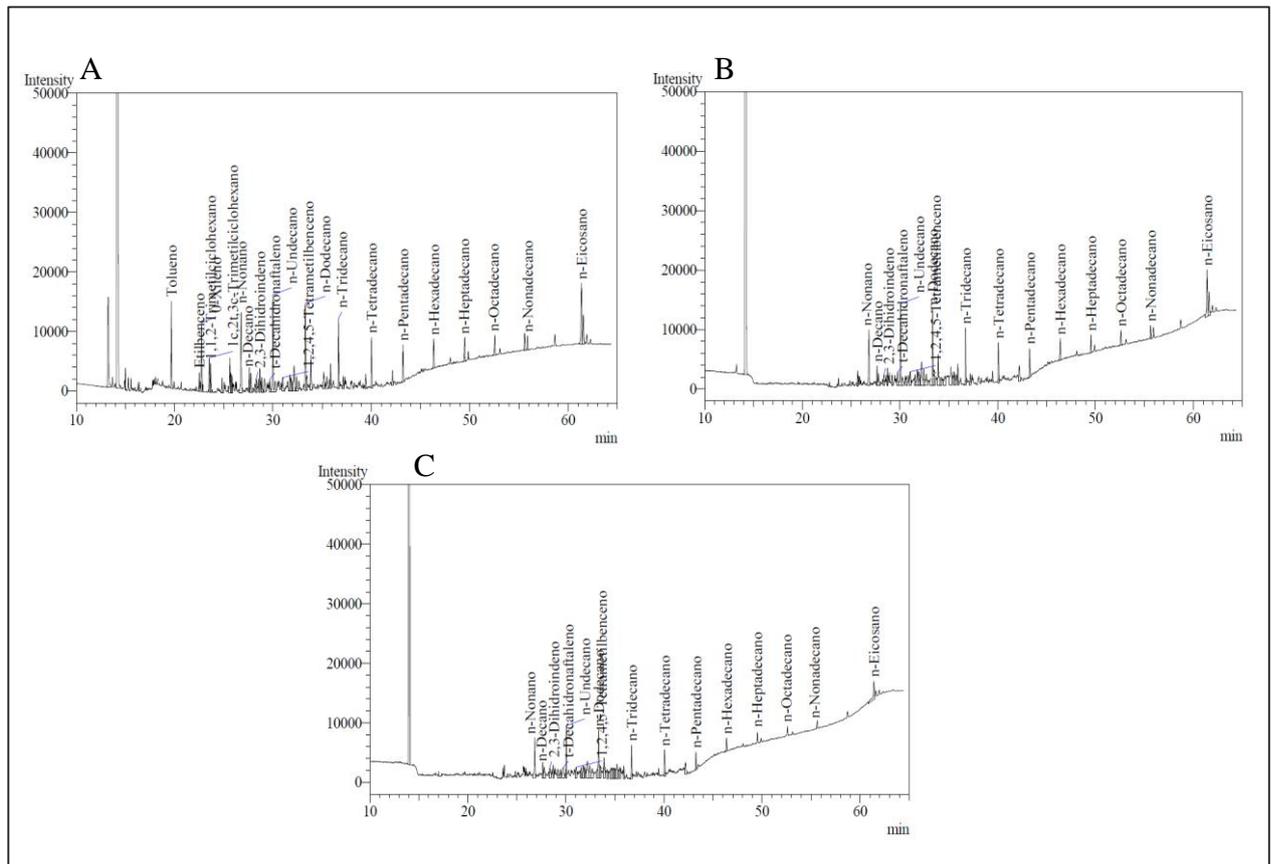


Figura 9. Cromatogramas de cultivos con HC, A) control día 0, B) control 10 días, C) MT1A3 10 días.

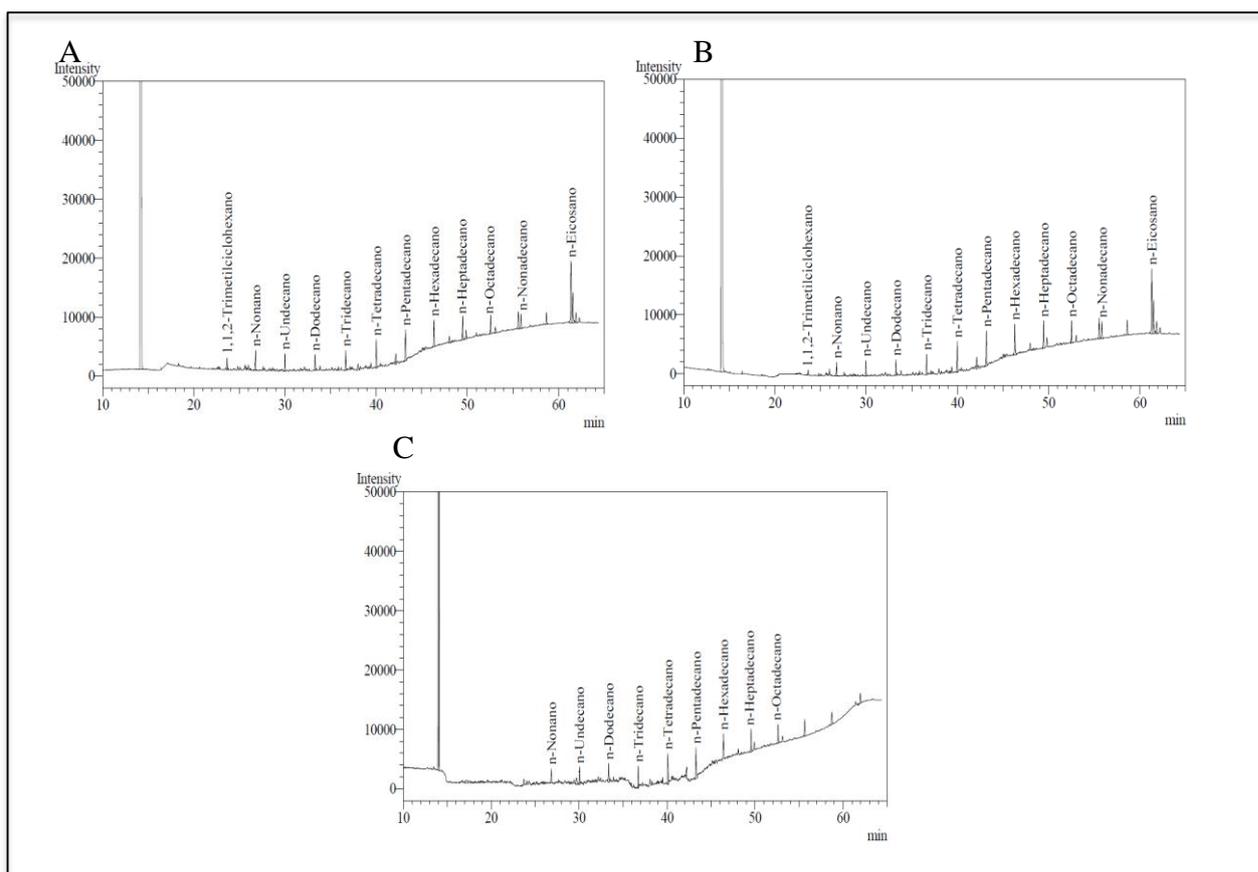


Figura 10. Cromatogramas de cultivos con diesel, A) control 0 día, B) control 10 días, C) MT1A3 10 días.

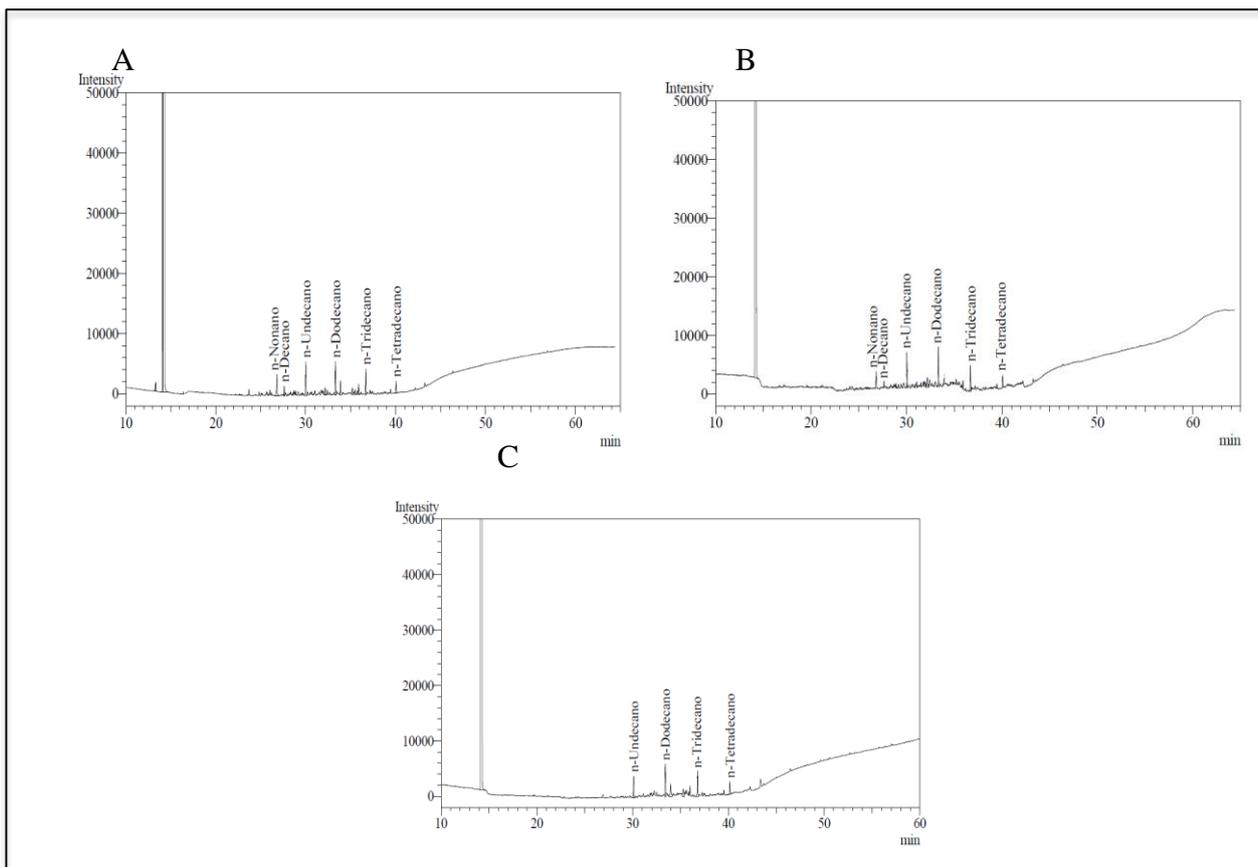


Figura 11. Cromatogramas de cultivos con kerosene, A) control 0 día, B) control 10 días, C) MT1A3 10 días.

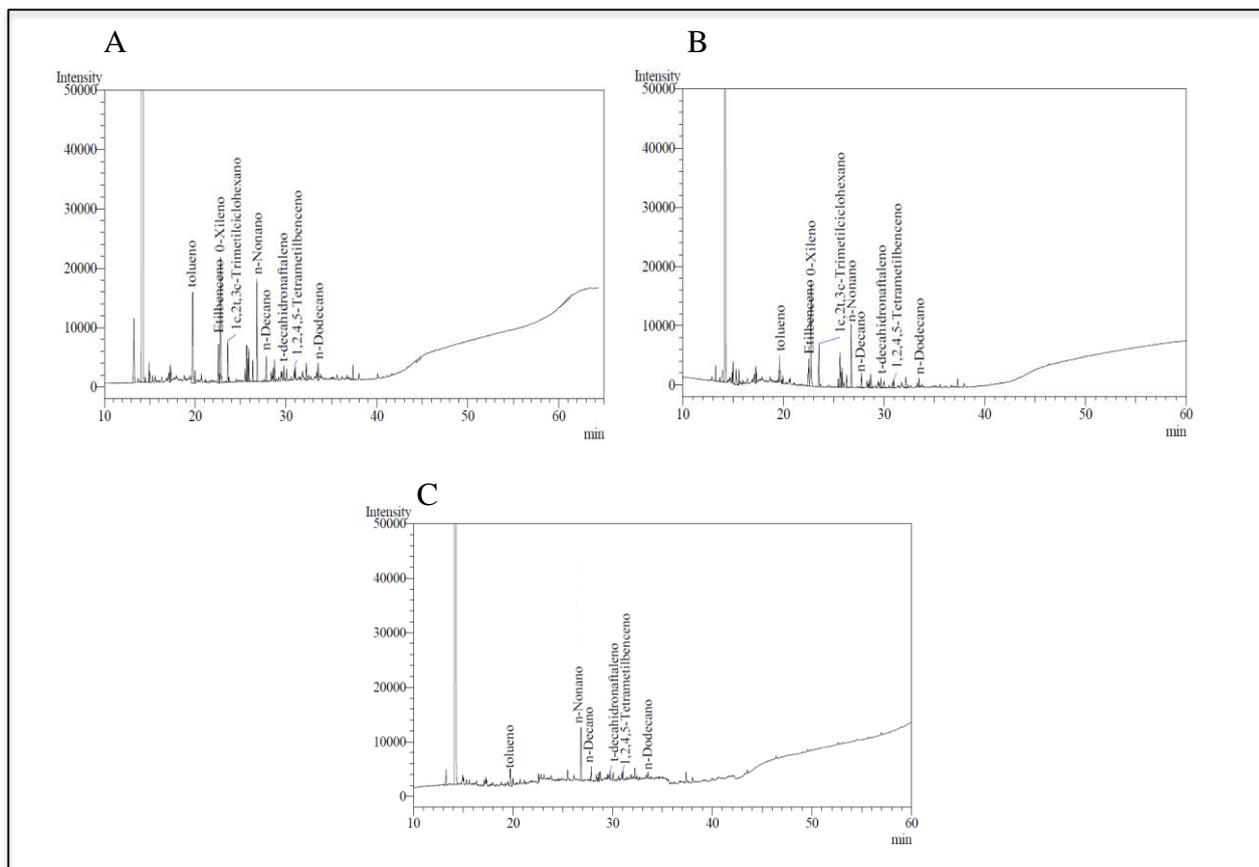


Figura 12. Cromatogramas de cultivos con nafta, A) control 0 día, B) control 10 días, C) MT1A3 10 días.

Tabla 17. Concentración (ppm) de los analitos identificados al inicio y a los 10 días en el ensayo con HC, evaluados en el control y en el cultivo inoculado con MT1A3.

HC	Concentración de ppm		
	0	10	
	Control	Control	MT1A3
Tolueno	1454,24	ND	ND
Etilbenceno	345,00	ND	ND
0-Xileno	1334,52	ND	ND
1c,2t,3c-Trimetilciclohexano	574,66	ND	ND
1,1,2-Trimetilciclohexano	515,03	ND	ND
n-Nonano	2380,38	1872,15	738,70
n-Decano	855,00	529,52	305,26
2,3-Dihidroindeno	362,87	242,47	199,12
t-Decahidronaftaleno	297,28	247,99	214,68
n-Undecano	1865,24	1637,75	720,44
1,2,4,5-Tetrametilbenceno	486,78	341,52	316,20
n-Dodecano	1646,58	1693,67	972,98
n-Tridecano	1300,30	1160,31	492,13
n-Tetradecano	918,58	713,25	341,47
n-Pentadecano	711,35	592,24	266,99
n-Hexadecano	651,96	455,84	221,02
n-Heptadecano	525,61	428,76	178,19
n-Octadecano	484,48	374,71	159,98
n-Nonadecano	339,91	205,64	136,70
n-Eicosano	1682,43	1486,13	285,63
Total	18732,21	11981,95	5549,50

Tabla 18. Concentración (ppm) de los analitos identificados al inicio y a los 10 días en el ensayo con diesel, evaluados en el control y en el cultivo inoculado con MT1A3.

Diesel	Concentración de ppm		
	0		10
	Control	Control	MT1A3
1,1,2-Trimetilciclohexano	301,81	125,10	ND
n-Nonano	674,78	465,38	344,49
n-Decano	355,00	329,52	305,26
n-Undecano	473,21	335,91	241,96
n-Dodecano	450,80	350,45	295,12
n-Tridecano	540,33	444,72	306,29
n-Tetradecano	738,18	645,37	368,18
n-Pentadecano	771,51	771,37	398,42
n-Hexadecano	694,72	507,71	243,47
n-Heptadecano	551,77	457,84	221,70
n-Octadecano	421,96	458,85	180,95
n-Nonadecano	388,48	361,17	ND
n-Eicosano	1748,73	1569,86	ND
Total	8111,28	6698,15	2905,85

Tabla 19. Concentración (ppm) de los analitos identificados al inicio y a los 10 días en el ensayo con kerosene, evaluados en el control y en el cultivo inoculado con MT1A3.

Kerosene	Concentración de ppm		
	0		10
	Control	Control	MT1A3
n-Nonano	711,10	523,96	ND
n-Decano	318,29	205,02	ND
n-Undecano	924,25	756,31	505,22
n-Dodecano	922,19	875,45	602,67
n-Tridecano	717,14	692,36	463,00
n-Tetradecano	380,28	252,98	245,10
Total	3973,25	3306,08	1815,99

Tabla 20. Concentración (ppm) de los analitos identificados al inicio y a los 10 días en el ensayo con nafta, evaluados en el control y en el cultivo inoculado con MT1A3.

Nafta	Concentración de ppm		
	0	10	
	Control	Control	MT1A3
Tolueno	1582,12	635,95	384,26
Etilbenceno	345,24	284,36	ND
0-Xileno	1702,56	1222,23	ND
1c,2t,3c-Trimetilciclohexano	625,35	265,37	ND
n-Nonano	1352,00	965,22	822,75
n-Decano	335,25	296,00	233,06
t-Decahidronaftaleno	255,36	266,95	235,04
1,2,4,5-Tetrametilbenceno	301,66	310,58	296,15
n-Dodecano	256,95	203,56	155,50
Total	6756,49	4450,22	2126,76

3. Optimización de producción de biomasa

Con el fin emplear la cepa MT1A3 como inóculo en estrategias de biorremediación, se procedió a optimizar la producción de biomasa del microorganismo, mediante la aplicación de los diseños experimentales. El estudio fue llevado a cabo en dos etapas, durante la primera etapa se buscó seleccionar factores que resultaran importantes para la producción de biomasa, mientras que en la segunda fue hallar los niveles óptimos de dichas variables.

Dado que previamente (sección resultados 2.2.) observamos que MT1A3 presentó la mayor producción de biomasa en el aceite de maní crudo (AMC) como fuente de carbono y en NaNO_3 como fuente de nitrógeno, se procedió a realizar la optimización empleando estos sustratos.

3.1. Diseños de selección

Además del carbono y el nitrógeno, los microorganismos necesitan suministro de ciertos minerales, especialmente el fósforo cuyo elemento es empleado para sintetizar ATP, fosfolípidos y ácidos nucleicos (Atlas & Bartha 2002). Es por ello que en el primer diseño realizado 2^3 factorial completo I (Montgomery 2001) se estudiaron los efectos de la concentración de AMC (10 – 30 g/L) como fuente de carbono, NaNO_3 (1 – 4 g/L) como fuente de nitrógeno, KH_2PO_4 (0,1 – 1,5 g/L) como fuente de fósforo, sobre la producción de biomasa de MT1A3. En la tabla 24 se muestra la matriz del diseño experimental, junto con los valores de respuesta obtenidos para cada experimento. La matriz incluye puntos centrales (nivel 0) por duplicado para calcular el error puro del método.

Tabla 21. Factorial completo I. Matriz experimental con los valores codificados (C) y reales (R), en las unidades correspondientes para cada una de las variables estudiadas. La respuesta medida fue biomasa (g/L).

Factorial completo I	AMC		NaNO ₃		KH ₂ PO ₄		Respuesta
	C	R (g/L)	C	R (g/L)	C	R (g/L)	Biomasa (g/L)
1	-1	10	-1	1	-1	0,1	0,32
2	1	30	-1	1	-1	0,1	4,15
3	-1	10	1	4	-1	0,1	3,39
4	1	30	1	4	-1	0,1	7,02
5	-1	10	-1	1	1	1,5	0,39
6	1	30	-1	1	1	1,5	3,98
7	-1	10	1	4	1	1,5	2,77
8	-1	30	1	4	1	1,5	6,19
9	0	20	0	2,5	0	0,8	8,22
10	0	20	0	2,5	0	0,8	8,05

El análisis matemático del diseño ajustó las respuestas obtenidas mediante una función polinómica de primer orden, cuyos coeficientes se obtuvieron por análisis de regresión múltiple. La regresión se realizó por el método de cuadrados mínimos, minimizando el error residual, representado por la suma de cuadrados de las diferencias entre los valores de respuesta observados y los valores estimados por el modelo. En la tabla 25 se representan los resultados del análisis estadístico, los coeficientes de determinación y los errores estándares, así como los valores *P* y *t* para cada uno de los coeficientes. El modelo se analizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA), y su significancia se estudió por el test *F* de Fisher (Tabla 26).

Los valores de los coeficientes b_i de la ecuación de regresión están relacionados con los valores codificados de los parámetros independientes y las respuestas obtenidas para cada combinación de los mismos. El valor absoluto de cada coeficiente de la regresión es proporcional al efecto que éste tiene sobre la respuesta. Así, un valor absoluto elevado para un coeficiente determinado implica que el efecto del mismo será notable (positivo o negativo, dependiendo del signo de b_i), mientras que si tiende a cero el factor tendrá un efecto menor.

Tabla 22. Análisis de regresión del diseño factorial completo I para biomasa. El modelo se ajustó según la función polinómica de primer grado $Y = b_0 + b_i x_i$, donde Y es la respuesta observada, b_0 es el intercepto y b_i es el i -ésimo coeficiente de regresión. Los factores fueron AMC, NaNO_3 y KH_2PO_4 . * significancia con un valor de $P < 0,05$.

Término	Coefficiente de regresión	t	P
b_0	3,5262	82,97	0,008
AMC	1,8088	42,56	0,015*
NaNO_3	1,3162	30,97	0,021*
KH_2PO_4	-0,1937	-4,56	0,137
AMC - NaNO_3	-0,0462	-1,09	0,473
AMC - KH_2PO_4	-0,0563	-1,32	0,412
NaNO_3 - KH_2PO_4	-0,1687	-3,97	0,157

Un modelo de regresión que presenta un valor del coeficiente de determinación R^2 mayor a 0,9, en general, se considera un modelo de muy alta correlación, y los modelos que presentan un R^2 entre 0,7 y 0,9 se consideran de alta correlación (Montgomery 2001). En este diseño experimental, el coeficiente de determinación para biomasa resultó ser $R^2 = 0,999$; lo que significa que un 99,9 % de los resultados experimentales puede ser explicado por el diseño realizado, y sólo un 0,1 % de las respuestas observadas puede deberse al azar. El valor del $F_{\text{significativo}}$ indicó que, los resultados obtenidos a partir del modelo, fue significativo ($P < 0,05$) en cuanto a la respuesta.

Tabla 23. Análisis estadístico del diseño factorial completo I para biomasa. Análisis del modelo aplicado mediante ANOVA. FC: falta de correlación, EP: error puro.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F	$F_{\text{significativo}}$
Modelo	8	74,5883	9,3235	645,23	0,030
Residuos	7	40,6033	4,6501		
FC	1	33,9849	33,9849		
EP	1	0,0145	0,0145		
Total	9	74,6028			

En el diseño factorial completo I, se observó que la concentración de AMC y NaNO_3 resultaron ser factores de significativos para la producción de biomasa, mientras que el factor

KH_2PO_4 y las interacciones entre las distintas variables independientes no presentaron influencia significativa sobre la respuesta. En el caso de la concentración de KH_2PO_4 no resultó ser un factor significativo para la producción de biomasa, al menos en las concentraciones ensayadas.

En la figura 13 se muestran los efectos de la concentración de AMC y de NaNO_3 , para el crecimiento de MT1A3. Al observar los niveles -1 y 1, se advierte que la biomasa incrementa en la dirección en que aumenta la concentración de AMC y cuando aumenta la concentración de NaNO_3 . Sin embargo, en ambos casos, el nivel central indicaría que la concentración óptima para la máxima obtención de biomasa sería alguna concentración intermedia entre -1 y 1.

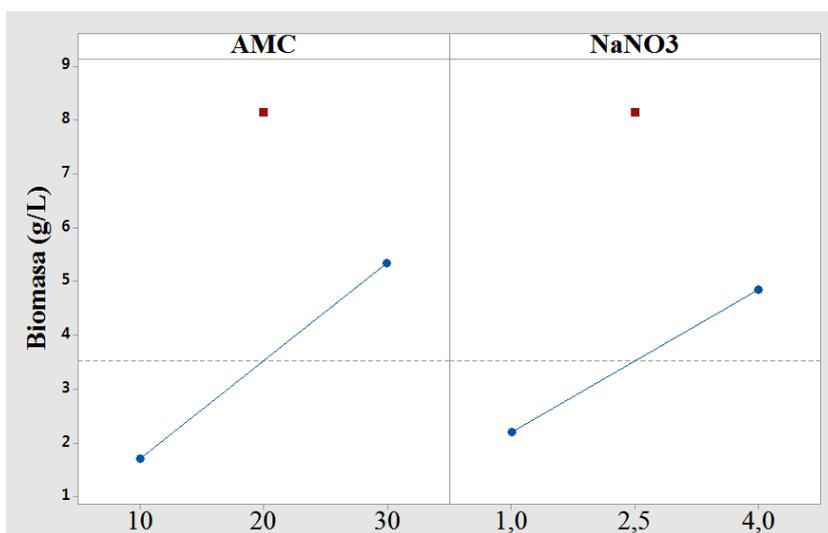


Figura 13. Factorial completo I. Efecto de la concentración de AMC y de NaNO_3 para la respuesta de biomasa (g/L), según los niveles -1 y 1 (azul), y el nivel central (rojo).

Dado los resultados de factorial completo I, en el siguiente diseño se decidió continuar estudiando los factores AMC y NaNO_3 con un rango de concentraciones más cercanas a los niveles centrales del diseño factorial completo I.

De esta manera en el siguiente diseño también se procedió a evaluar la temperatura de incubación, dado que la misma influye directamente sobre la actividad de biológica de los procariontas (Atlas & Bartha, 2005). Otro factor a considerar fue el tiempo, ya que la duración de un proceso es un aspecto económicamente importante cuando se considera como una estrategia de biorremediación.

De esta manera, en el diseño 2^4 factorial completo II se estudiaron nuevamente la concentración de AMC (10 – 20 g/L) y de NaNO_3 (1 – 2,5 g/L), como fuente de carbono y nitrógeno y a esto se sumaron las variables temperatura (16 – 32 °C) y tiempo de incubación (5 – 7 días). La matriz experimental de este segundo diseño, junto a las respuestas medidas, se

muestra en la tabla 27. En las tablas 28 y 29 se exponen el análisis de regresión y el análisis estadístico del modelo lineal aplicado, respectivamente.

Tabla 24. Factorial completo II. Matriz experimental con los valores codificados (C) y reales (R), en las unidades correspondientes para cada una de las variables estudiadas. La respuesta medida fue biomasa (g/L).

Factorial completo II	AMC		NaNO ₃		Temperatura		Tiempo		Respuesta
	C	R (g/L)	C	R (g/L)	C	R (°C)	C	R (días)	Biomasa (g/L)
1	-1	10	-1	1	-1	16	-1	5	0,22
2	1	20	-1	1	-1	16	-1	5	3,15
3	-1	10	1	2,5	-1	16	-1	5	4,65
4	1	20	1	2,5	-1	16	-1	5	5,32
5	-1	10	-1	1	1	32	-1	5	2,09
6	1	20	-1	1	1	32	-1	5	6,00
7	-1	10	1	2,5	1	32	-1	5	4,95
8	1	20	1	2,5	1	32	-1	5	7,86
9	-1	10	-1	1	-1	16	1	7	0,34
10	1	20	-1	1	-1	16	1	7	3,65
11	-1	10	1	2,5	-1	16	1	7	4,75
12	1	20	1	2,5	-1	16	1	7	5,66
13	-1	10	-1	1	1	32	1	7	2,43
14	1	20	-1	1	1	32	1	7	6,20
15	-1	10	1	2,5	1	32	1	7	5,13
16	1	20	1	2,5	1	32	1	7	7,95
17	0	15	0	1,75	0	24	0	6	6,75
18	0	15	0	1,75	0	24	0	6	6,6

En este segundo diseño de selección se encontró que los factores que afectaron significativamente la producción de biomasa de MT1A3 fueron la concentración de AMC y de NaNO₃, y la temperatura, cuyos efectos fueron positivos en todos los casos (Tabla 28, Figura 14). El tiempo de incubación, en el rango estudiado, no influyó significativamente en la respuesta. Asimismo, las interacciones AMC - NaNO₃ y AMC - Temperatura dieron efectos significativos para la producción de biomasa, pero no para el resto de las interacciones entre las distintas variables independientes.

Tabla 25. Análisis de regresión del diseño factorial completo II para biomasa. El modelo se ajustó según la función polinómica de primer grado $Y = b_0 + b_i x_i$, donde Y es la respuesta observada, b_0 es el intercepto y b_i es el i -ésimo coeficiente de regresión. Los factores fueron: AMC, NaNO_3 , temperatura, tiempo.* significancia con un valor de $P < 0,05$.

Término	Coefficiente de regresión	t	P
b_0	4,3844	165,35	0,004
AMC	1,3394	50,51	0,013*
NaNO_3	1,3994	52,77	0,012*
Temperatura	0,9169	34,58	0,018*
Tiempo	0,1294	4,88	0,129
AMC - NaNO_3	-0,4256	-16,05	0,040*
AMC - Temperatura	0,3619	13,65	0,047*
AMC - Tiempo	0,0119	0,45	0,732
NaNO_3 - Temperatura	-0,2281	-8,6	0,074
NaNO_3 - Tiempo	-0,0406	-1,53	0,368
Temperatura - Tiempo	-0,0031	-0,12	0,925

Tabla 26. Análisis estadístico del diseño factorial completo II para biomasa. Análisis del modelo aplicado mediante ANOVA. FC: falta de correlación, EP: error puro.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F	$F_{\text{significativo}}$
Modelo	16	89,4145	5,5884	496,75	0,035
Residuos	15	80,0866	5,3391		
FC	1	9,3279	9,3279		
EP	1	0,0112	0,0112		
Total	17	89,4258			

Para este diseño, el coeficiente de determinación para la respuesta fue $R^2 = 0,999$, lo cual implica una alta correlación entre la predicción del modelo y las respuestas experimentales. El análisis estadístico mostró la adecuación en la aplicación de este modelo para explicar las observaciones experimentales, dado el valor del $F_{\text{significativo}} = 0,035$.

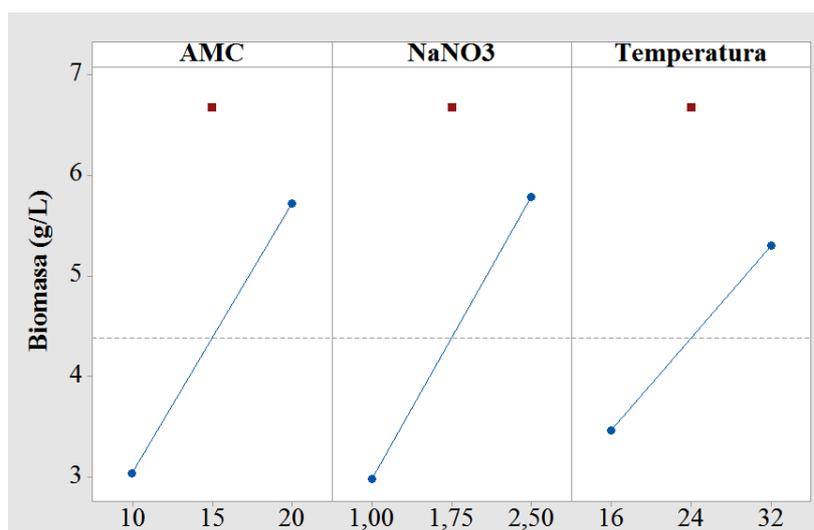


Figura 14. Factorial completo II. Efecto de la concentración de AMC y de NaNO₃, de la temperatura, y de las interacciones AMC - NaNO₃ y AMC - Temperatura, para la respuesta de biomasa (g/L), según los niveles -1 y 1 (azul), y el nivel central (rojo).

En virtud de los datos aportados por los diseños de selección, pudimos hallar que los tres factores que presentaron influencia significativa sobre la producción de biomasa de MT1A3 fueron la concentración de AMC, la concentración de NaNO₃ y la temperatura de incubación.

3.2. Diseños de optimización

Siendo que en los diseños de selección se encontraron factores que resultaron significativos para la producción biomasa de MT1A3, se procedió a encontrar los niveles óptimos de estas variables que maximicen dicha respuesta. Para ello se utilizó el diseño Box Behnken (Whittinghill 1998). Los factores que se optimizaron fueron la concentración de AMC (10 – 20 g/L) y de NaNO₃ (1 – 2,5 g/L), y la temperatura de incubación del cultivo (20 – 30 °C).

El diseño experimental y las respuestas observadas se muestran en la tabla 30. Los resultados de la regresión se analizaron mediante ANOVA, y la adecuación del modelo aplicado se verificó mediante el test F de Fischer. El análisis matemático y el análisis estadístico se exponen en las tablas 31 y 32, respectivamente.

Tabla 27. Matriz experimental del diseño Box Behnken utilizado para la optimización de la producción de biomasa de MT1A3.

Box Behnken	AMC		NaNO ₃		Temperatura		Respuesta
	C	R (g/L)	C	R (g/L)	C	R (g/L)	Biomasa (g/L)
1	-1	10	-1	1	0	25	2,33
2	1	20	-1	1	0	25	5,25
3	-1	10	1	2,5	0	25	3,06
4	1	20	1	2,5	0	25	9,05
5	-1	10	-1	1,75	-1	20	0,89
6	1	20	0	1,75	-1	20	1,79
7	-1	10	0	1,75	1	30	2,63
8	1	20	0	1,75	1	30	4,59
9	0	15	0	1	-1	20	1,16
10	0	15	0	2,5	-1	20	2,89
11	0	15	-1	1	1	30	2,56
12	0	15	1	2,5	1	30	5,24
13	0	15	0	1,75	0	25	7,55
14	0	15	0	1,75	0	25	7,29
15	0	15	0	1,75	0	25	7,42

A partir del modelo Box Behnken se encontró que el efecto de los tres factores fue positivo para la producción biomasa de MT1A3, y los coeficientes de significancia estadística fueron los lineales y los cuadráticos (excepto para NaNO₃). Para el caso de las interacciones de estos factores, pudo observarse que no presentaron ser significativas.

El coeficiente de determinación fue $R^2 = 0,950$. De esta manera la fracción sobre la totalidad de las variaciones observadas que no puede ser explicada por el modelo experimental fue 5 %. El valor del $F_{\text{significativo}}$ indicó que los resultados obtenidos a partir del modelo fueron significativos ($P < 0,01$) para la respuesta.

Tabla 28. Análisis de regresión del diseño *Box Behnken* para la biomasa de MT1A3.

El modelo se ajustó según la función polinómica de segundo grado $Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2$, donde Y es la respuesta observada, β_0 es el intercepto, β_i es el *i*-ésimo coeficiente de regresión lineal, β_{ij} es el *i,j*-ésimo coeficiente interactivo y β_{ii} es el *i*-ésimo coeficiente cuadrático. Los factores fueron: AMC, NaNO₃, temperatura. * significancia con un valor de $P < 0,05$.

Término	Coefficiente de regresión	t	P
b0	7,420	13,27	< 0,001*
AMC	1,471	4,3	0,008*
NaNO ₃	1,117	3,26	0,022*
Temperatura	1,036	3,03	0,012*
AMC - AMC	-1,493	-2,96	0,031*
NaNO ₃ - NaNO ₃	-1,005	-1,99	0,103
Temperatura - Temperatura	-3,452	-6,85	0,001*
AMC - NaNO ₃	0,768	1,59	0,174
AMC - Temperatura	0,265	0,55	0,608
NaNO ₃ - Temperatura	0,237	0,49	0,645

Tabla 29. Análisis estadístico del diseño *Box Behnken* para la biomasa de MT1A3.

Análisis del modelo interactivo-cuadrático por ANOVA. FC: falta de correlación, EP: error puro

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados Medios	F	F _{significativo}
Modelo	9	89,9490	9,9943	10,66	0,009
Residuos	9	89,9491	9,9943		
FC	3	4,6551	1,5517		
EP	2	0,0338	0,0112		
Total	14	94,6379			

Las observaciones que surgen de los resultados analíticos, pueden corroborarse gráficamente al analizar las superficies de respuesta obtenidas (Figura 15). En estas figuras se muestra la producción de biomasa como función de las tres combinaciones posibles entre las tres variables independientes.

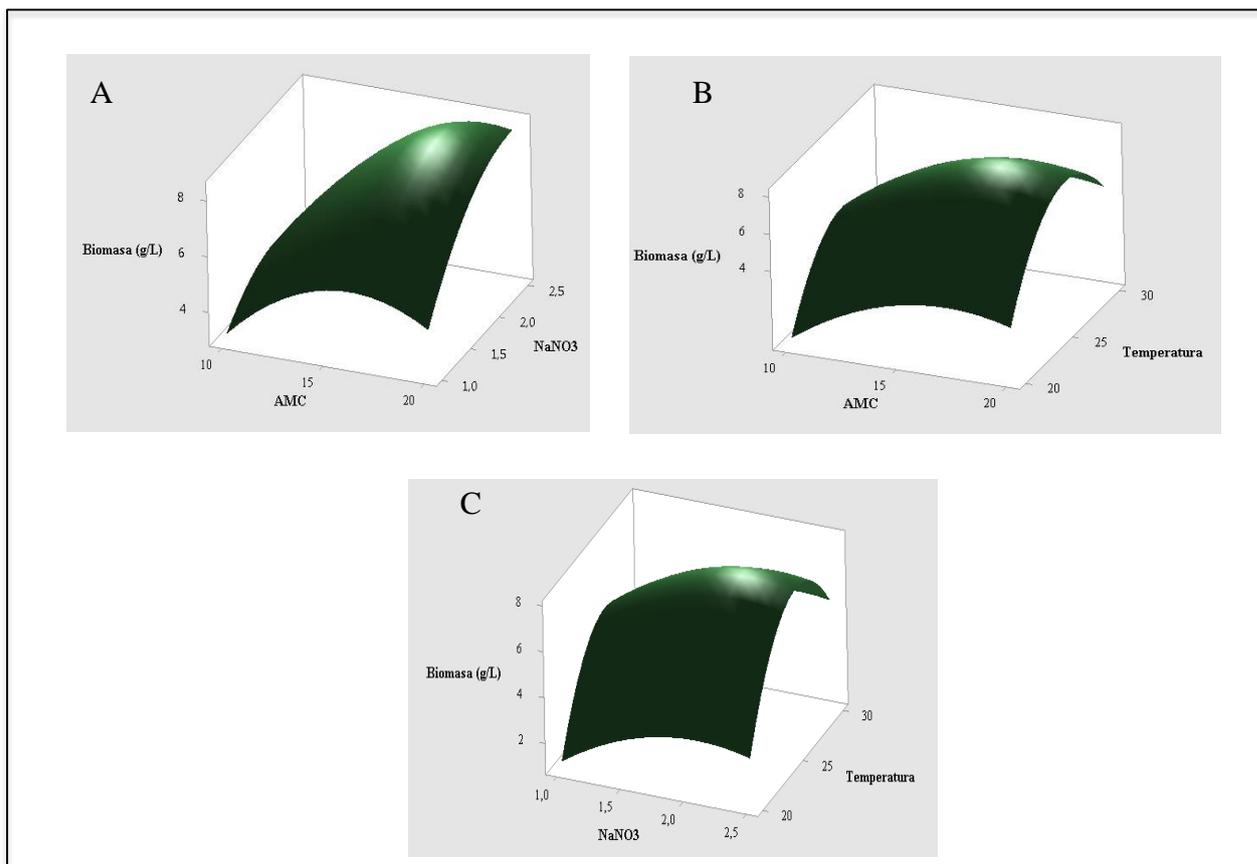


Figura 15. Producción volumétrica de biomasa como función de (A) AMC y NaNO₃, (B) AMC y temperatura, (C) NaNO₃ y temperatura.

El modelo Box Behnken permitió obtener una combinación óptima de los parámetros que maximiza la producción de biomasa de MT1A3, la cual corresponde al máximo de la función cuadrática que interpreta las respuestas. Siendo los valores óptimos: 18,69 g/L de AMC, 2,39 g/L de NaNO₃ y 26,06 °C temperatura. De esta manera, el medio de producción optimizado consiste en (g/L): AMC (18,7); NaNO₃ (2,4); KH₂PO₄ (1,5); Na₂HPO₄ (0,5); FeSO₄·7H₂O (0,0011); MgSO₄·7H₂O (0,2); CaCl₂·2H₂O (0,0132), incubado a 26 °C.

3.3. Validación del medio optimizado

Habiendo optimizado los niveles de las variables críticas para maximizar la producción de biomasa de MT1A3, se procedió realizar la validación del estudio en sistema de erlenmeyers, en

los cuales se analizaron las condiciones óptimas contrastando las respuestas experimentales con las predichas por el modelo teórico.

En el ensayo de validación se obtuvo $8,95 \pm 0,20$ g/L de biomasa de MT1A3 a los 5 días, lo cual mostró que el modelo matemático describe adecuadamente las tendencias experimentales, ya que los resultados experimentales difieren porcentualmente de los valores predichos en < 5 % (Biomasa máxima estimada = 8,54).

En el cultivo del medio optimizado en comparación con el cultivo en el medio original, se obtuvo un aumento del 22,77 % de biomasa, 8,95 g/L vs. 7,29 g/L (sección resultados 2.2.).

4. Microcosmos

4.1. Características del suelo

El suelo contaminado con hidrocarburos empleado en el estudio de microcosmos presentó las características que se muestran en la tabla 33, tales como la humedad, la pérdida por ignición y la capacidad de campo. También se muestran los resultados del área superficial promedio de las partículas de cada uno de los suelos; así como el volumen de suelo (en %) ocupado por los distintos tamaños de partículas. Las partículas de tamaño menor a 2 μm se consideran arcillas; las partículas cuyos tamaños se encuentran entre 2 y 60 μm se clasifican como limo; las partículas de tamaños entre 60 y 2.000 μm corresponden a arena, que puede ser desde muy fina (60 – 100 μm) hasta muy gruesa (1.000 – 2.000 μm); mientras que aquellas partículas cuyo tamaño sobrepasa los 2.000 μm corresponden a piedra y grava. La determinación de la textura de los suelos, en base al contenido de arena, limo y arcilla, realizada mediante el triángulo de texturas (Atlas & Bartha 2005) mostró que el suelo correspondía a la clase de textura franco arenoso.

Tabla 30. Contenido porcentual de agua, pérdida por ignición, capacidad de campo, pH, área superficial y distribución del volumen del suelo (en %) según los distintos tamaños de partículas del suelo en estudio.

Características del suelo	
Humedad (%)	38,42 \pm 1,23
Pérdida por ignición (%)	15,44 \pm 1,42
Capacidad de campo (mL / 100 g de suelo)	56,60 \pm 0,09
pH	7,77 \pm 0,36
Área superficial (m ² /g)	19,35 \pm 0,02
Volumen del suelo (%)	
Tamaño de partícula	
2000 – 60 μm	75,21
60 – 2 μm	16,25
< 2 μm	8,54

La textura de los suelos determina en gran medida la actividad biológica de los mismos, ya que según el tamaño de partículas predominante serán su aireación, el movimiento de agua y la capacidad de adsorción y formación de microagregados (Shahsavarzadeh-Jangi et al. 2015). En el suelo estudiado, la baja presencia de arcillas y su característica de suelo franco arenoso, permitieron predecir que se trataba de un suelo de porosidad intermedia, con moderado drenaje de agua y aireación intermedia para el desarrollo de microflora aerobia.

4.2. Microcosmos I

La degradación o remoción de un contaminante del suelo depende de las interrelaciones entre los factores abióticos y bióticos del mismo. Las relaciones que se establecen entre suelo – microorganismos son extremadamente complejas, debido a la intrincada red de interacciones físicas, químicas y biológicas (Atlas & Bartha 2005). Para el estudio de procesos de biorremediación, es necesario el desarrollo de sistemas experimentales, que permitan simplificar el manejo de las variables bióticas y abióticas involucradas y la manipulación de los parámetros más importantes de manera controlada. Dado que esto suele ser imposible de manera *in situ*, se requieren sistemas de laboratorio que reproduzcan fielmente el ecosistema y las condiciones ambientales reales, de forma tal que los resultados obtenidos a partir del modelo experimental puedan extrapolarse a un sistema a escala real. Tales ensayos de laboratorio no eliminan la necesidad de estudios sobre el terreno, pero son fundamentales para establecer las bases científicas de las estrategias de biorremediación, así como para el hallazgo y desarrollo de nuevos posibles tratamientos de remediación (Adams et al. 2015; Mohammadi-Sichani et al. 2017). Con el objetivo de explorar a escala laboratorio una porción del universo en estudio se realizaron ensayos de microcosmos.

Como punto de partida se realizó el primer sistema experimental, que llamamos microcosmos I. El mismo consistió en un control, microcosmos A, en el cual se evaluó el potencial catabólico de la comunidad endógena microbiana del suelo (atenuación natural). Por otro lado se ensayó el microcosmos B, que presentó la inoculación con la cepa MT1A3, con el fin de explorar la estrategia de bioaumentación (Figura 16).

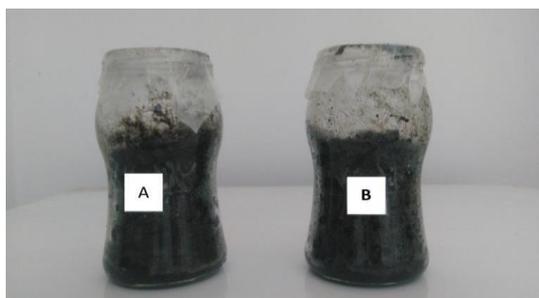


Figura 16. Microcosmos I, compuesto por atenuación natural (microcosmos A) y bioaumentación con MT1A3 (microcosmos B).

La temperatura de los microcosmos fue en promedio de $25,02 \pm 2,55$ °C, este valor se aproxima a temperaturas ambiente promedio de la zona de 22-23 °C, entre noviembre y enero. Los resultados de humedad del suelo se mantuvieron entre 33,70 - 38,72 %, con lo cual el contenido de humedad no varió significativamente en ninguno de los dos casos ($p > 0,05$) (Figura 17). Con respecto a los valores de pH, inicialmente fue de 7,85 y se mantuvieron similares en el microcosmos A (7,77) y el microcosmos B (7,41) al final del ensayo. Estos datos estarían cercanos al pH 7,8, que previamente se ha reportado como el óptimo para la mineralización de los hidrocarburos (Dibble & Bartha 1979, Koshlaf & Ball 2017).

Para evidenciar la actividad biológica en los dos microcosmos, se realizó el recuento de microorganismos, BHAT y BDH (Figura 17). A los 60 días, en el microcosmos B (bioaumentación) se registró mayor cantidad BHAT que el microcosmos A (atenuación natural). Pero al final de ensayo, a los 100 días, los dos sistemas en estudio mostraron un conteo de BHAT similares, $2,5 \times 10^6$ UFC/g para microcosmos A y $6,5 \times 10^6$ UFC/g para microcosmos B. En cuanto las BDH, se pudo observar en ambos casos que aumentaron significativamente con respecto al día 0, y fue similar en ambos ensayos, a lo largo de los 100 días. Siendo el recuento final de $8,1 \times 10^4$ UFC/g para microcosmos A y $4,0 \times 10^5$ para microcosmos B. Se estima que la concentración mínima de microorganismos degradadores específicos de hidrocarburos para poder llevar a cabo la biorremediación del suelo es de 10^3 a 10^4 UFC (Alexander 1994), en este caso las BDH alcanzaron valores hasta del orden de 10^5 .

Al evaluar la concentración de hidrocarburos en microcosmos I (Figura 17), se registró que inicialmente el suelo contenía 3850,21 ppm. Luego de 100 días de cultivo el microcosmos A (atenuación natural) mostró un contenido de 1740,02 ppm HT, lo que representa una disminución del 54,82 %, como resultado de procesos abióticos (volatilización) y la eliminación biológica por acción de los microorganismos endógenos del suelo. Por otro lado, aunque ambos sistemas (A y B) presentaron recuentos de BDH similares, en el microcosmos B se midió 680,00

ppm de HT al final del ensayo, logrando una remoción de 54,70 % superior al microcosmos A. De la misma manera, el microcosmos B mostró una disminución significativa de 82,33 % de HT en comparación con el nivel inicial.

Varios picos de los cromatogramas fueron identificados (Figura 18). Inicialmente se reportaron 23 compuestos de hidrocarburos, desde C7 a C22. Ellos fueron: 2,2,4-trimetilpentano, tolueno, 1t,2-dimetilciclohexano, 1c,2-Dimetilciclohexano, etilbenceno, o-xileno, 1c,2t,3c-trimetilciclohexano, n-nonano, n-decano, 2,3-dihidroindeno, t-decahidronaftaleno, n-undecano, 1,2,4,5-Tetrametilbenceno, n-dodecano, n-tridecano, n-tetradecano, n-pentadecano, n-hexadecano, n-heptadecano, n-octadecano, n-nonadecano, n-eicosano, n-docosano. A los 100 días, en ambos sistemas, compuestos de C7 a C10 no fueron detectados, como 2,2,4-trimetilpentano, tolueno, 1t,2-dimetilciclohexano, 1c,2-dimetilciclohexano, etilbenceno, o-xileno, 1c,2t,3c-trimetilciclohexano, n-nonano, n-decano, 2,3-dihidroindeno, t-decahidronaftaleno, 1,2,4,5-tetrametilbenceno. También se vió que n-eicosano no fue detectado al final del ensayo para ambos sistemas.

En la tabla 34 se observan las concentraciones (ppm) de los picos identificados. Si tomamos en cuenta la concentración de los mismos, vemos que el microcosmos A (atenuación natural) presentó un 58,38% de reducción de dichos picos, mientras que el microcosmos B (bioaugmentación) alcanzó el 78,20 %, lo que implica que el microcosmos B fue un 47,63 % más eficiente en la remoción de hidrocarburos que el microcosmos A al considerar sólo los analitos identificados. Estos porcentajes son comparables a los obtenidos del análisis de los picos totales (HT).

Asimismo, se pudo observar que en ambos sistemas de estudio varios de los compuestos identificados, presentaron una remoción de 70 al 100 % a los 100 días de cultivo, excepto n-undecano, n-tetradecano y n-docosano que no alcanzaron el 50 % de reducción. Además, el microcosmos B mostró reducción de más de 50% para el n-dodecano, n-pentadecano, n-heptadecano, n-octadecano y n-nonadecano, en comparación con el microcosmos A (atenuación natural), lo que indicaría que la estrategia de bioaugmentación con MT1A3 podría estar favoreciendo la degradación de estos hidrocarburos en particular. De hecho estos resultados se condicen con los vistos en la sección resultados 2.3., donde MT1A3 en cultivos líquidos presentó también predominancia para la degradación de n-undecano, n-dodecano, n-tridecano, n-tetradecano, n-pentadecano, n-hexadecano, n-heptadecano, n-octadecano, n-nonadecano, n-eicosano.

Por otro lado, vemos que al inicio del ensayo en microcosmos I, el área total de los picos identificados (1359,33 ppm) representan un 35,30 % del área total de los picos del cromatograma (HT) (3850,25 ppm). Como los picos identificados son en su mayoría alcanos, es probable que el resto de los hidrocarburos que están presentes en el suelo contaminado se trate de compuestos como alquenos, alquinos, poliaromáticos.

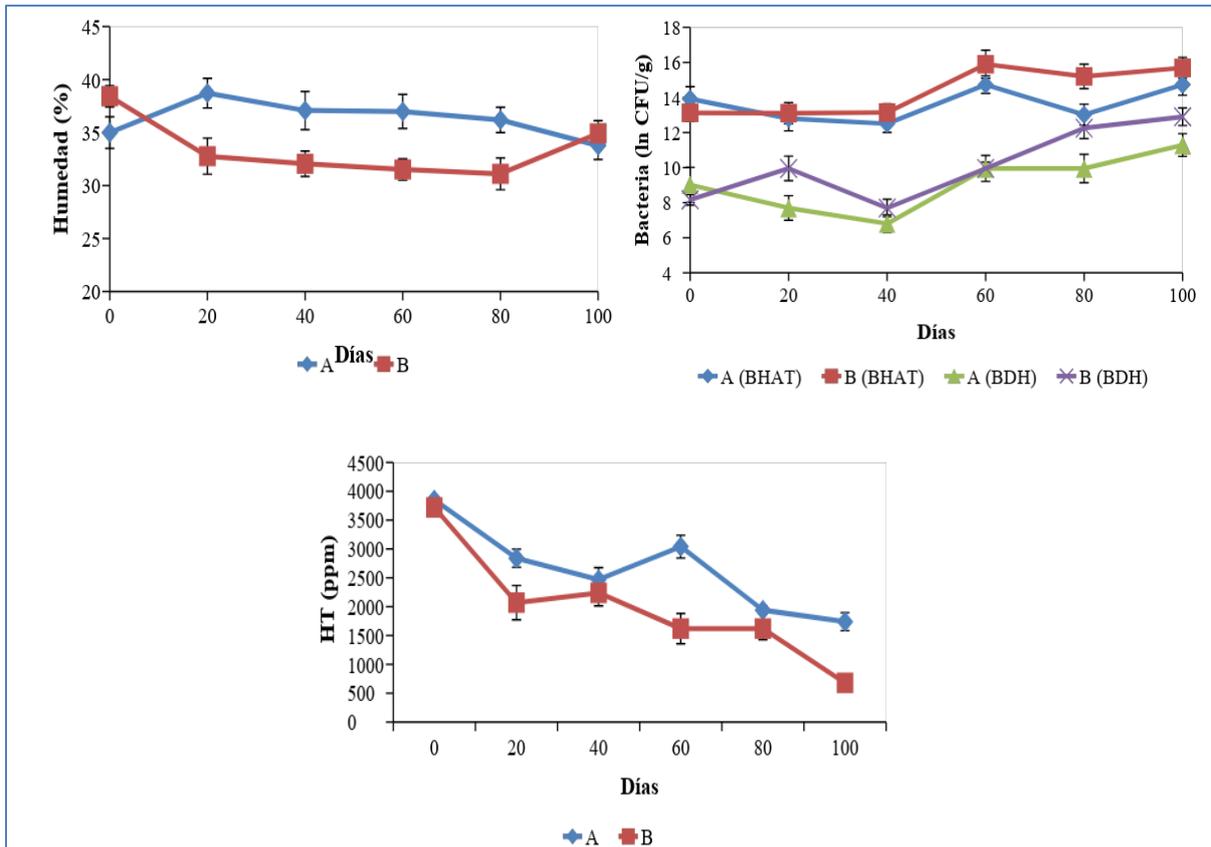


Figura 17. Microcosmos I. Humedad (%), recuento de bacterias (ln CFU/g) BHAT y BDH, concentración de HT (ppm), para control abiótico (microcosmos A) y bioaugmentación con MT1A3 (microcosmos B), durante 100 días.

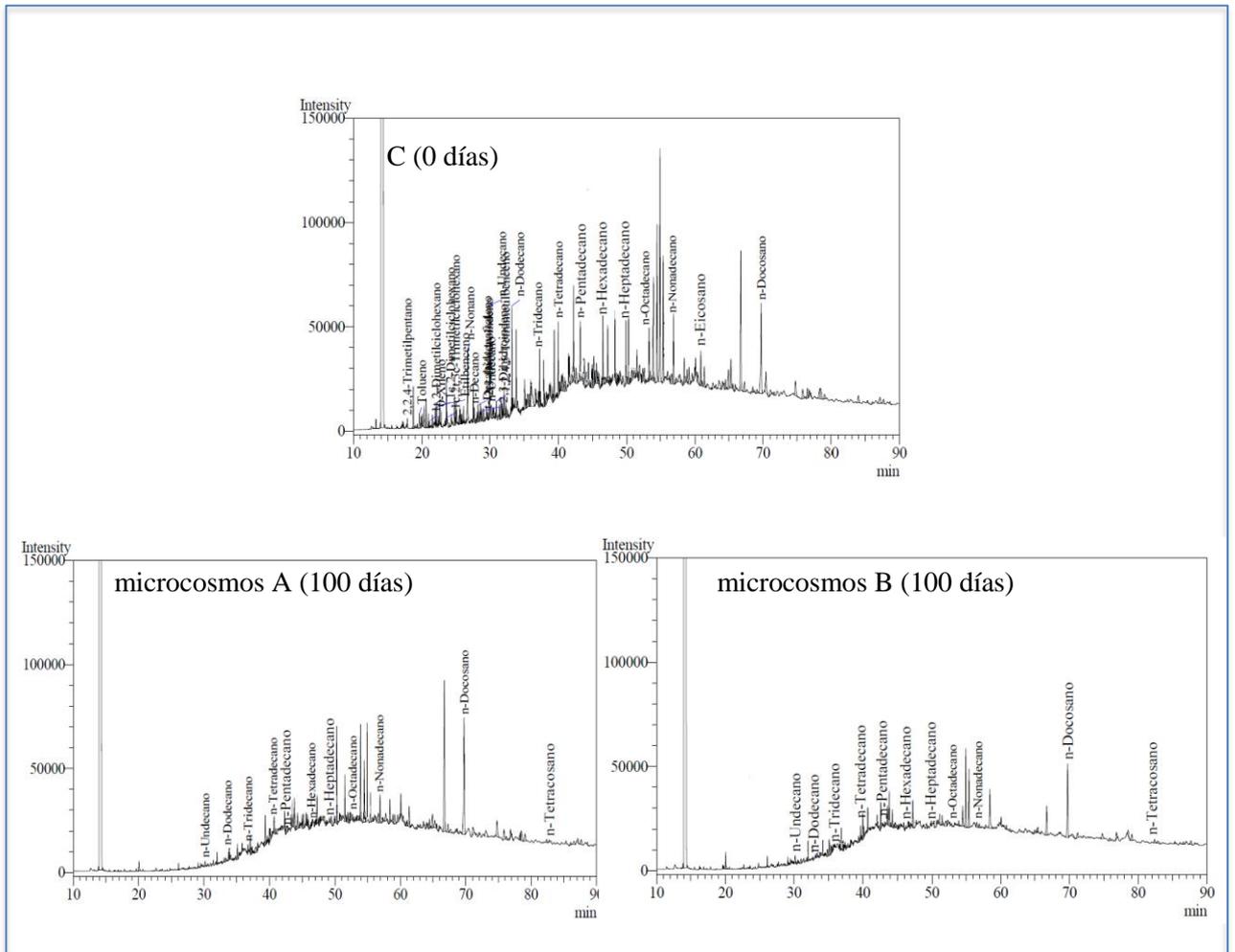


Figura 18. Cromatogramas de microcosmos I: a) control 0 día, b) atenuación natural (microcosmos A) a los 100 días, b) bioaumentación con MT1A3 (microcosmos B) a los 100 días.

Tabla 31. Microcosmos I. Concentración (ppm) de los analitos identificados al inicio, y a Los 100 días en atenuación natural (microcosmo A) y en bioaumentación con MT1A3 (microcosmo B).

Microcosmos I	Concentración de ppm		
	0	100	
		Microcosmos A	Microcosmos B
2,2,4-Trimetilpentano	6,90	ND	ND
Tolueno	23,26	ND	ND
1t,2-Dimetilciclohexano	6,58	ND	ND
1c,2-Dimetilciclohexano	15,75	ND	ND
Etilbenceno	23,49	ND	ND
0-Xileno	14,54	ND	ND
1c,2t,3c-Trimetilciclohexano	7,41	ND	ND
n-Nonano	90,66	ND	ND
n-Decano	16,05	ND	ND
2,3-Dihidroindeno	20,41	ND	ND
t-Decahidronaftaleno	7,35	ND	ND
n-Undecano	21,95	12,30	13,45
1,2,4,5-Tetrametilbenceno	22,23	ND	ND
n-Dodecano	105,29	20,77	9,49
n-Tridecano	91,28	22,09	12,78
n-Tetradecano	75,22	39,95	38,86
n-Pentadecano	79,09	17,63	7,93
n-Hexadecano	96,87	9,82	7,74
n-Heptadecano	90,00	16,29	6,77
n-Octadecano	140,60	41,69	7,78
n-Nonadecano	118,16	61,81	8,76
n-Eicosano	46,31	ND	ND
n-Docosano	239,93	327,11	174,10
n-Tetracosano	ND	6,26	8,62
Total	1359,33	565,73	296,28

4.3. Microcosmos II

En el estudio de la capacidad de remediación de hidrocarburos en suelos contaminados, resulta necesario entender el rol de cada uno de los factores presentes en ese microambiente y evaluar el aporte de cada uno de ellos al proceso de degradación. En este sentido, se procedió a realizar un segundo ensayo, Microcosmos II, en donde el objetivo fue ampliar la estrategia de biorremediación. Para ello se diseñaron seis sistemas experimentales de microcosmos: control atenuación natural (C), bioestimulación con nitrógeno y fósforo (B), bioaumentación con MT1A3 (MT1A3), bioaumentación con mezcla de cepas (Mix), bioaumentación con MT1A3 + bioestimulación nitrógeno y fósforo (MT1A3 + B), bioaumentación mezcla de cepas + bioestimulación nitrógeno y fósforo (Mix + B) (Figura 19).

Para el caso del microcosmos II, los inóculos fueron crecidos según las condiciones obtenidas del diseño de optimización mostrado en resultados sección 3.



Figura 19. Diseño experimental de Microcosmos II.

La temperatura de los microcosmos fue en promedio de $22,05 \pm 4,10$ °C, correspondiente a las temperaturas ambientes promedio de la zona de 17-22 °C, entre febrero a abril. En cuanto a el contenido inicial de agua de los sistemas fue en promedio de $29,72 \pm 2,24$ %, estos valores disminuyeron a los 120 días de cultivo, alcanzando valores inferiores al 15% de humedad en los casos de los sistemas C (atenuación natural), B (bioestimulación) y Mix (bioaumentación con Mix) (Figura 20). Este efecto podría deberse a la época en el año en que se llevó a cabo el ensayo, y por ende a las condiciones ambientales presentes en el laboratorio durante dicho periodo.

En cuanto al pH, se observó que los valores disminuyeron significativamente de $7,91 \pm 0,13$ hasta $6,01 \pm 0,26$ ($p < 0,05$), en todos los sistemas del microcosmo II a los 120 días de cultivo (Figura 20). Este efecto no lo habíamos observado previamente en el microcosmo I, donde el pH se mantuvo constante. Posiblemente este efecto esté asociado a la caída de humedad y por ende a la actividad metabólica de la microflora que predomina en estas condiciones reinantes.

Con respecto al recuento de BHAT, a los 90 días, solo el sistema B (bioestimulación) y en el sistema con bioaumentación (MT1A3) no se registró una disminución del crecimiento microbiano, mientras que al final del ensayo en todos los tratamientos se observó una caída significativa del mismo con respecto al valor inicial que va desde el orden de $10^8 - 10^{10}$ hasta $10^6 - 10^7$ UFC. En cuanto a las BDH se observó una marcada disminución en todos los sistemas desde los 30 días de cultivo, registrándose valores que van desde el orden de 10^6 hasta 10^5 UFC. Los mismos se mantuvieron estables hasta el final del ensayo (Figura 20). Probablemente la disminución del crecimiento microbiano estuvo influenciada por la baja de humedad presente en los sistemas.

En cuanto a la degradación de HC, inicialmente el suelo en estudio registró un valor de 3746,70 ppm. A los 120 días de tratamiento, los sistemas que resultaron ser más eficientes para la degradación de HT fueron los de bioestimulación (B), de bioaumentación (sistema MT1A3 y sistema Mix) y la combinación de ambas estrategias (Mix + B), cuyos valores finales fueron de 730,00; 713,33; 806,67; 936,67 ppm respectivamente, representando remociones de 39,34; 40,72; 32,96; 22,16 % con respecto al sistema de atenuación natural (C) (1203,33 ppm) ($p < 0,05$). No se evidenciaron diferencias significativas en cuanto a la degradación de HT en el sistema MT1A3 + B. (Figura 20).

Si comparamos los valores de HT obtenidos para cada sistema con la concentración inicial del suelo (3746,70 ppm), podemos inferir que en los tratamientos B, MT1A3, Mix, Mix + B se obtuvieron los mayores porcentajes de remoción de HT siendo superiores al 75%. De todos modos, en el ensayo C se obtuvo 67,88 % de degradación de HC, lo que representa un buen grado de saneamiento por parte de los microorganismos nativos del suelo en estudio.

Mediante la técnica de cromatografía gaseosa se identificaron varios de los compuestos presentes en microcosmos II (Figura 21). Inicialmente se reportaron 23 compuestos de hidrocarburos, desde C7 a C22. Ellos fueron: 2,2,4-trimetilpentano, tolueno, 1t,2-dimetilciclohexano, 1c,2-dimetilciclohexano, etilbenceno, o-xileno, 1c,2t,3c-trimetilciclohexano, n-nonano, n-decano, 2,3-dihidroindeno, t-decahidronaftaleno, n-undecano, 1,2,4,5-tetrametilbenceno, n-dodecano, n-tridecano, n-tetradecano, n-pentadecano, n-

hexadecano, n-heptadecano, n-octadecano, n-nonadecano, n-eicosano, n-docosano. A los 120 días de estudio, en todos los sistemas de microcosmos, el 50% de compuestos de menor peso molecular (C7-C9) no pudieron ser detectados (Tabla 35). Este efecto fue similar al previamente observado en el perfil de degradación de hidrocarburos a causa de la atenuación natural y la bioaumentación con MT1A3 observados en microcosmos I (sección resultados 4.2.). Sin embargo, en microcosmos II algunos compuestos, como n-pentadecano y n-heptadecano, se detectaron en el ensayo C (atenuación natural) pero no se encontraron en los otros sistemas de bioestimulación y de bioaumentación, lo que indica un mejor perfil de remoción de hidrocarburos en estas estrategias de biorremediación.

En cuanto a las concentraciones (ppm) de los picos identificados (Tabla 35), el área total de los picos identificados inicialmente en microcosmos II (1317,48 ppm) representan un 35,16 % del área total de los picos del cromatograma (HT) (3748,01 ppm), si tomamos en cuenta la concentración total los mismos a los 120 días, vemos que los dos ensayos que presentaron mayor degradación fueron la bioaumentación con MT1A3 y bioestimulación (B), siendo 67,46 y 51,95 % respectivamente superior al ensayo de atenuación natural (C). Asimismo, el área total de los picos identificados inicialmente en microcosmos II (1317,48 ppm) representan un 35,16 % del área total de los picos del cromatograma (HT) (3748,01 ppm).

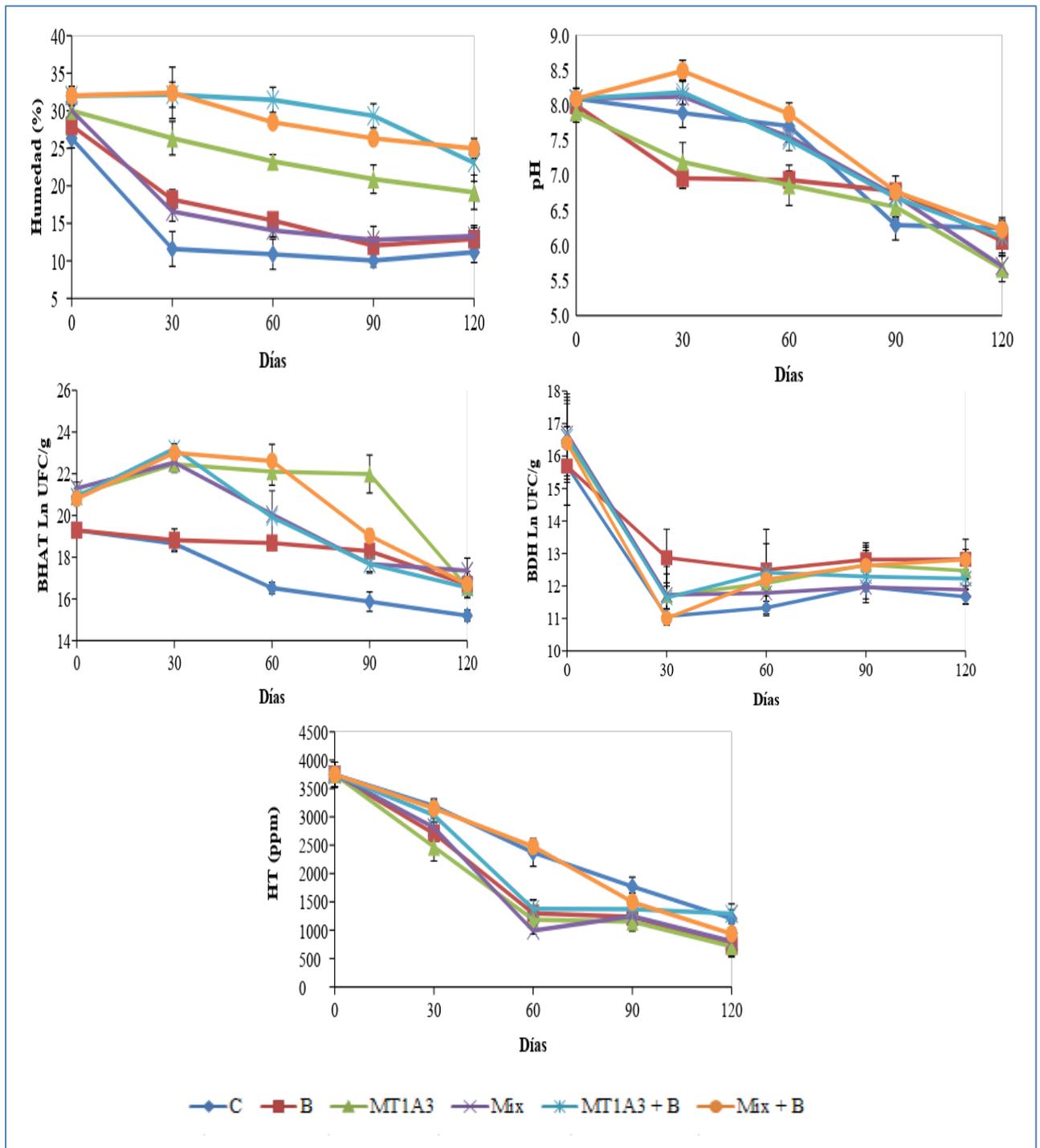


Figura 20. Microcosmos II. Determinación de humedad (%), pH, bacterias (ln CFU/g) BAHT y BDH, concentración de HT (ppm), en microcosmos II, durante 120 días

Tabla 32. Microcosmos II. Concentración (ppm) de los analitos identificados al inicio, y a los 120 días en atenuación natural (C), bioestimulación N, P (B), bioaumentación MT1A3 (MT1A3), bioaumentación Mix (Mix), bioaumentación MT1A3 + bioestimulación N,P (MT1A3 + B), bioaumentación con Mix + bioestimulación N,P (Mix + B).

Microcosmos II	Concentración (ppm)						
	Inicial	C	B	MT1A3	Mix	MT1A3 + B	Mix + B
2,2,4-Trimetilpentano	6,21	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tolueno	18,25	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1t,2-Dimetilciclohexano	12,82	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1c,2-Dimetilciclohexano	20,36	ND	ND	ND	10,22	ND	ND
Etilbenceno	19,99	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0-Xileno	10,52	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1c,2t,3c-Trimetilciclohexano	13,56	ND	ND	ND	ND	ND	ND
n-Nonano	79,11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
n-Decano	21,07	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2,3-Dihidroindeno	14,10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
t-Decahidronaftaleno	18,82	8,75	7,23	9,25	10,35	10,31	6,7
n-Undecano	21,21	9,23	7,68	11,47	13,52	14,93	19,91
1,2,4,5-Tetrametilbenceno	31,46	7,52	8,62	7,44	8,41	8,40	12,03
n-Dodecano	112,51	19,37	22,13	17,07	22,84	25,70	28,93
n-Tridecano	91,24	12,62	11,77	9,38	10,00	11,29	11,86
n-Tetradecano	94,32	14,11	15,07	13,31	24,97	20,59	31,34
n-Pentadecano	80,64	28,51	ND	ND	ND	ND	ND
n-Hexadecano	89,81	13,00	ND	ND	7,52	8,63	6,98
n-Heptadecano	91,21	8,85	ND	ND	ND	ND	ND
n-Octadecano	85,31	31,45	27,51	7,05	52,63	ND	40,26
n-Nonadecano	106,41	12,09	7,71	ND	16,50	18,79	14,41
n-Eicosano	55,34	6,48	6,96	ND	6,61	6,49	ND
n-Docosano	223,21	245,26	85,81	60,81	108,87	131,52	90,15
n-Tetracosano	ND	9,12	12,89	8,79	13,41	8,99	7,46
Total	1317,48	417,23	200,49	135,78	292,44	256,65	270,03

Si bien en microcosmos II los tratamientos de bioestimulación y bioaumentación mostraron mayor porcentaje de degradación de hidrocarburos con respecto al control (atenuación natural), el comportamiento acerca de la disminución del crecimiento observado en el conteo de las bacterias, refleja que la falta de regulación del contenido de agua probablemente produzca que los sistemas pierdan eficiencias de remoción de los contaminantes del suelo. La escasez de humedad puede estar afectando de forma negativa a la degradación de hidrocarburos ya que en ausencia de agua no se puede desarrollar correctamente la vida microbiana. Además los suelos relativamente secos tienden a absorber con más fuerza los contaminantes, puesto que los mismos compiten con el agua por los lugares de absorción (Das & Chandran 2011).

4.4. Microcosmos III

El sistema experimental microcosmos III se planteó de igual manera que microcosmos II, con la diferencia que los niveles de humedad se mantuvieron constantes a lo largo del ensayo. De esta manera los ensayos fueron: control atenuación natural (C), bioestimulación con nitrógeno y fósforo (B), bioaumentación con MT1A3 (MT1A3), bioaumentación con mezcla de cepas (Mix), bioaumentación con MT1A3 + bioestimulación nitrógeno y fósforo (MT1A3 + B), bioaumentación mezcla de cepas + bioestimulación nitrógeno y fósforo (Mix + B). Los inóculos fueron crecidos según las condiciones obtenidas del diseño de optimización mostrado en resultados sección 3.

La humedad promedio de todos los ensayos se registró en $31,67 \pm 4,45$. Los valores de pH presentaron un leve aumento, del orden desde pH 7 alcanzaron hasta 8, excepto el ensayo C que bajó hasta pH 6,88, a los 120 días (Figura 22).

En cuanto al crecimiento microbiano, en todos los ensayos se observó que la mayor tasa de crecimiento para las BHAT se dió principalmente en el periodo de los primeros 30 días. Asimismo, en el sistema de bioaumentación y bioestimulación (MT1A3 + B) se registró la mayor concentración de BHAT, alcanzando el valor de $2,17 \times 10^{10}$ UFC a los 120 días. Por otro lado, el recuento de las BDH mostró un comportamiento similar al de las BHAT, y el máximo de las bacterias degradadoras se obtuvo en el ensayo MT1A3 + B, con $8,91 \times 10^6$ UFC al final del ensayo (Figura 22).

Mediante la técnica de cromatografía gaseosa se determinó que inicialmente el suelo contenía una concentración de HT de 3960,24 ppm. Luego la cuantificación de hidrocarburos

mostró que a los 120 días la disminución de HT fue significativamente mayor en los tratamientos con bioaumentación y/o bioestimulación MT1A3, Mix, MT1A3 + B y Mix + B con respecto a la atenuación natural (C) ($p < 0,05$), registrándose los valores de 1090,35; 937,44; 879,65; 890,15 ppm en relación a 1440,76 ppm en C; lo cual representa remociones de hidrocarburos del 25,12; 34,95; 40,05; 38,19 % respectivamente, superiores con respecto a C. En el caso del tratamiento exclusivo de bioestimulación (B) se midió 1247,25 ppm de HT a los 120 días, cuya remoción no presentó una diferencia significativa con respecto a la atenuación natural (C) ($p > 0,05$). Nótese, que en la figura 21 puede observarse que desde el inicio del ensayo hasta los 60 días, la curva de concentración de HT tiene una pendiente negativa denotando que se produjo una degradación mayor con respecto al período comprendido entre los 60 y 120 días.

Teniendo en cuenta que inicialmente en el suelo se registró una concentración de HT de 3960,24 ppm, los porcentajes de remoción de hidrocarburos que se obtuvieron en todos los tratamientos C, B, MT1A3, Mix, MT1A3 + B y Mix + B, fueron de 63,64; 68,52; 72,47; 76,35; 77,95; 77,53 % respectivamente. Estos resultados muestran que todos los sistemas probados, incluso la atenuación natural (C), resultaron ser eficientes para la biorremediación de hidrocarburos. Es así que la atenuación natural del suelo permite la biodegradación de hidrocarburos por comunidades microbianas autóctonas, y comúnmente se considera el mecanismo principal para la eliminación natural de contaminantes (Declercq et al. 2012). En este estudio, a partir del nivel inicial de hidrocarburo medido en suelo contaminado, el sistema C (atenuación natural) mostró una reducción de 63,64 % probablemente como resultado de procesos abióticos y la actividad biológica de la microbiota del suelo ya adaptada. Teniendo en cuenta que el suelo estudiado contenía un alto nivel inicial de hidrocarburos, el 77,95 % de HT pudo ser removido con estrategias de bioaumentación y bioestimulación, lo cual las posiciona como tecnologías promisorias.

Al comienzo de microcosmos III se identificaron los mismos 23 compuestos que en microcosmos I y II: 2,2,4-trimetilpentano, tolueno, 1t,2-dimetilciclohexano, 1c,2-dimetilciclohexano, etilbenceno, o-xileno, 1c,2t,3c-trimetilciclohexano, n-nonano, n-decano, 2,3-dihidroindeno, t-decahidronaftaleno, n-undecano, 1,2,4,5-tetrametilbenceno, n-dodecano, n-tridecano, n-tetradecano, n-pentadecano, n-hexadecano, n-heptadecano, n-octadecano, n-nonadecano, n-eicosano, n-docosano (Figura 23).

Es así que a los 120 días, en los sistemas MT1A3, Mix, MT1A3 + B y Mix + B alrededor del 70 % de los compuestos identificados no fueron detectados o se detectaron con concentraciones cercanas a 10 ppm (Tabla 36). Otra observación es que el n-eicosano es el

único compuesto que no ha variado su concentración en ningún sistema desde el inicio del ensayo.

Tomando en cuenta la concentración total de los picos identificados, vemos que los ensayos que tuvieron mayor degradación fueron los tratamientos con bioaumentación y/o bioestimulación MT1A3, Mix, MT1A3 + B y Mix + B, siendo entre 40 y 45 % superior a la atenuación natural (C), a los 120 días (Tabla 36). En microcosmos III, el área total de los picos identificados inicialmente (2493,92 ppm) representaron el 62,95 % del área total de los picos del cromatograma (HT) (3960,24 ppm).

Resulta importante resaltar que en los sistemas de microcosmos propuestos en este estudio, el remanente de compuestos de hidrocarburos a los 120 días de cultivo puede deberse a la dificultad de los mismos de ser biodegradados durante este tiempo. Esto sugiere la perspectiva de ampliar la estrategia de bioaumentación en asociación con hongos o plantas, y a su vez optimizar las condiciones de bioestimulación para maximizar la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados. Asimismo, el hecho de que el propio suelo mediante la atenuación haya sido capaz de remediar hasta el 63% de los contaminantes, nos desafía a plantear nuevos ensayos de microcosmos que sean abordados desde el punto de vista de la optimización de las condiciones de remediación, para lograr aumentar la brecha de biorremediación entre los tratamientos con bioestimulación y bioaumentación en comparación con la atenuación natural.

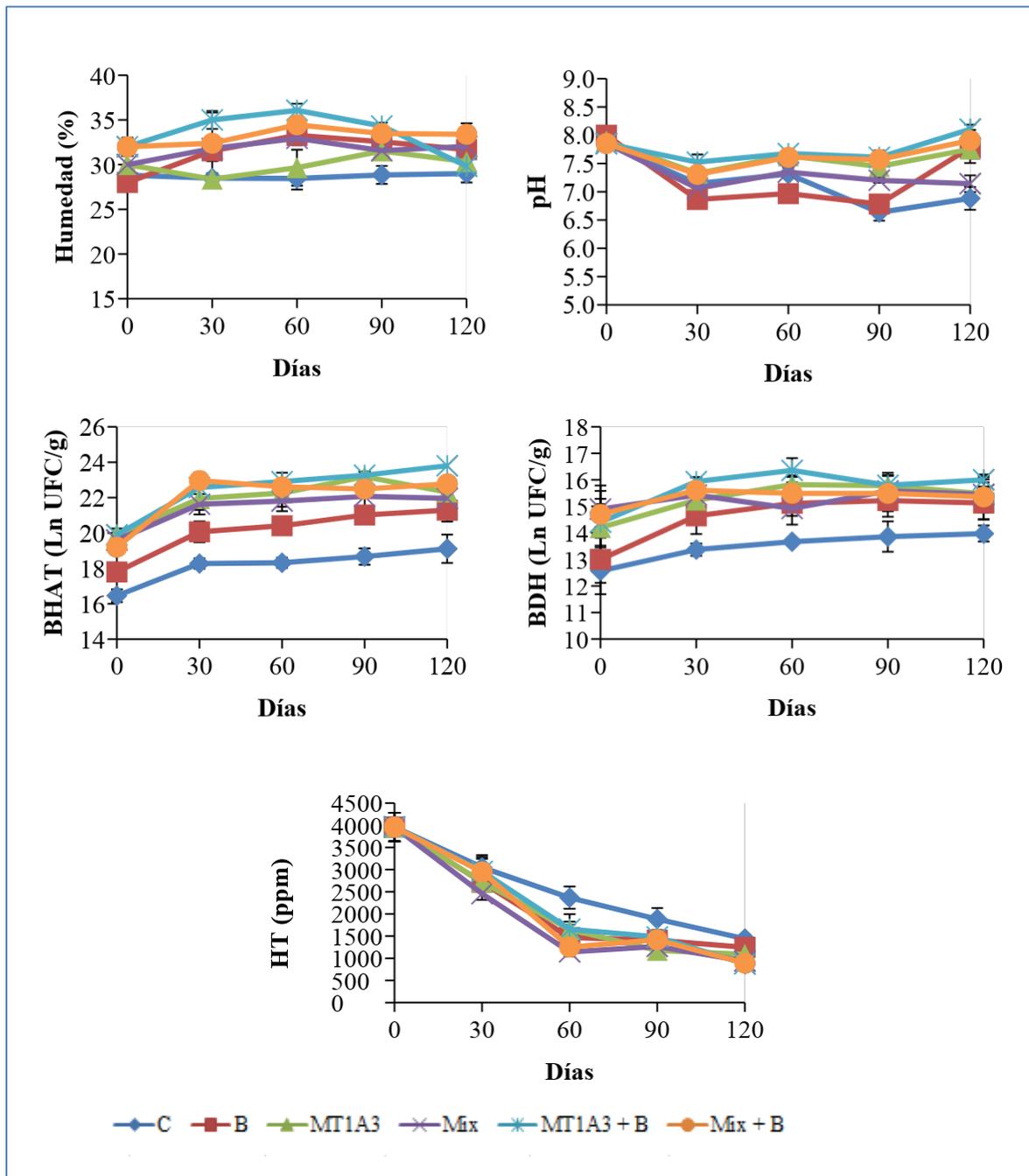


Figura 22. Determinación de humedad (%), pH, bacterias (ln UFC/g) BAHT y BDH, concentración de HT (ppm), en microcosmos III, durante 120 días.

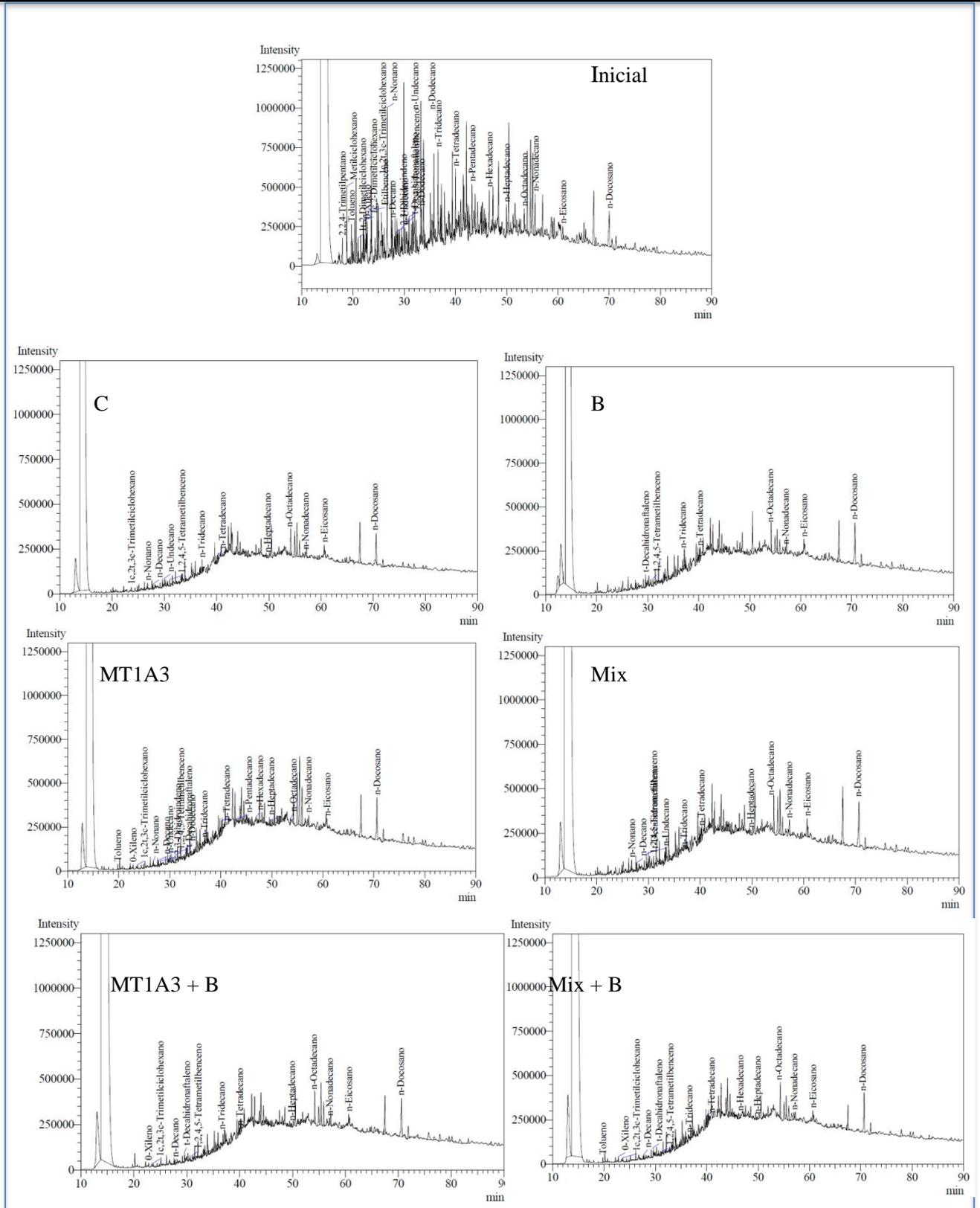


Figura 23. Cromatogramas de microcosmos III: al inicio del ensayo, control atenuación natural (C), bioestimulación (B), bioaumentación con MT1A3 (MT1A3), bioaumentación con mix (Mix), bioaumentación con MT1A3 + bioestimulación (MT1A3 + B), bioaumentación con Mix + bioestimulación (Mix + B), a los 120 días.

Tabla 33. Microcosmos III. Concentración (ppm) de los analitos identificados al inicio, y a los 120 días en atenuación natural (C), bioestimulación N, P (B), bioaumentación MT1A3 (MT1A3), bioaumentación Mix (Mix), bioaumentación MT1A3 + bioestimulación N,P (MT1A3 + B), bioaumentación con Mix + bioestimulación N,P (Mix + B).

Microcosmos III	Concentración (ppm)						
	Inicial	C	B	MT1A3	Mix	MT1A3 + B	Mix + B
2,2,4-Trimetilpentano	46,82	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tolueno	80,80	7,45	ND	ND	7,73	ND	ND
1t,2-Dimetilciclohexano	40,14	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1c,2-Dimetilciclohexano	49,62	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Etilbenceno	66,06	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0-Xileno	39,25	8,12	ND	7,23	9,36	ND	ND
1c,2t,3c-Trimetilciclohexano	182,01	6,29	ND	6,95	6,41	7,03	ND
n-Nonano	362,57	7,84	16,40	ND	ND	8,75	ND
n-Decano	69,99	10,03	15,78	8,84	8,73	8,83	ND
2,3-Dihidroindeno	42,94	7,55	ND	ND	ND	ND	ND
t-Decahidronaftaleno	34,26	13,23	22,83	15,75	11,8	ND	21,31
n-Undecano	313,87	6,94	19,40	ND	13,52	7,76	ND
1,2,4,5-Tetrametilbenceno	82,99	16,96	24,26	13,83	8,11	13,26	18,54
n-Dodecano	254,94	12,75	ND	ND	ND	ND	ND
n-Tridecano	130,59	6,76	23,71	16,99	20,10	10,67	18,75
n-Tetradecano	112,26	18,09	29,43	29,66	22,70	19,09	26,66
n-Pentadecano	96,76	27,99	ND	ND	ND	ND	ND
n-Hexadecano	81,68	13,97	ND	ND	6,77	ND	ND
n-Heptadecano	73,13	8,10	16,69	8,07	6,32	10,38	ND
n-Octadecano	41,94	13,11	65,32	15,50	10,22	23,87	25,23
n-Nonadecano	96,20	166,74	25,23	16,64	18,43	9,97	16,85
n-Eicosano	32,69	13,32	35,39	20,84	18,21	21,43	26,39
n-Docosano	162,41	158,74	159,85	135,22	137,18	144,23	155,57
Total	2493,92	523,99	454,29	295,52	305,59	285,27	309,30

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo fueron:

- ✓ Las cepas empleadas en esta tesis, previamente aisladas (de RHASA) en nuestro laboratorio, fueron identificadas filogenéticamente en los géneros *Pseudomonas*, *Cellulosimicrobium* y *Ochrobactrum*, los cuales presentan antecedentes que relacionan a las mismas con el metabolismo de degradación de los hidrocarburos.
- ✓ La cepa MT1A3 perteneciente al género *Pseudomonas*, fue la que presentó mayor capacidad de crecimiento cuando se cultivó en sustratos como HC y glicerol. Asimismo, esta bacteria presentó capacidad de crecer en los diferentes sustratos alternativos (co-productos agroindustriales de bajo costo) usados en este estudio.
- ✓ La mayor producción de biomasa de MT1A3 se obtuvo en aceite de maní crudo cuando este se empleó como fuente de carbono. En cuanto a las fuentes de nitrógeno utilizadas, NaNO_3 resultó ser la más apropiada para el crecimiento de la cepa.
- ✓ MT1A3 presentó la habilidad de ser tolerante a altas concentraciones de hidrocarburos, ya que creció en medios con HC de hasta 50 % (v/v). Por otro lado, al estudiar el perfil de degradación de hidrocarburos, la cepa metabolizó compuestos alcanos de C8 a C20 presentes en diesel, kerosene y nafta, sugiriendo que se trata de un microorganismo que presenta las rutas metabólicas necesarias para metabolizar estos compuestos, una herramienta clave para emplear como inóculo en técnicas de bioaumentación.
- ✓ Dentro de todas las condiciones que se ensayaron en este trabajo: distintas fuentes de carbono (HC, glicerol, glucosa, suero de leche bovino, suero de leche ovino, aceite de girasol refinado, aceite de girasol alto oleico, aceite de maní crudo, aceite de maní frito, aceite de camelina, maní prensado molido), fuentes de nitrógeno (NaNO_3 , NH_4Cl y urea) y temperatura, MT1A3 no fue capaz de producir compuestos biosurfactantes.

- ✓ Los factores que resultaron significativos para la producción de biomasa de MT1A3, hallados mediante los diseños experimentales (full factorial I y full factorial II), fueron la concentración de aceite de maní crudo como fuente de carbono, la concentración de NaNO_3 como fuente de nitrógeno y la temperatura de incubación de los cultivos. Al maximizar la producción de biomasa, los valores óptimos obtenidos por el diseño Box Behnken fueron 18,69 g/L de AMC, 2,39 g/L de NaNO_3 y 26,06 °C temperatura.
- ✓ En los ensayos de biorremediación se observó que en microcosmos III se obtuvo una considerable degradación de hidrocarburos, donde al aplicarse la bioestimulación y la bioaumentación con los microorganismos en estudio, se logró una remoción de alrededor del 75 % de hidrocarburos, siendo la mayor remoción de 77,95 % para el caso de la combinación de bioaumentación y bioestimulación MT1A3 + B. Este caso en estudio representa un resultado prometedor para abordar las estrategias de biorremediación.
- ✓ Por otro lado, dado que la atenuación natural mostró remoción de hidrocarburos del 63,64 %, nos lleva a plantear como perspectiva el desarrollo de nuevos ensayos de optimización de las condiciones de remediación en los sistemas de microcosmos, para maximizar la degradación de hidrocarburos en los tratamientos con bioestimulación y bioaumentación.

El empleo de microorganismos pertenecientes a cepas aisladas de suelos crónicamente contaminados de la refinería del petróleo durante el transcurso de esta tesis resultó promisorio para abordar técnicas de biorremediación, ya que dependiendo de la estrategia utilizada se logró remociones de hidrocarburos que van de 22 a 54 % en comparación con la atenuación natural en ensayos de microcosmos. Demostrándose una vez más que la biorremediación es una tecnología sitio específica que implica trabajar con cepas autóctonas del lugar en donde se produjo el evento de contaminación.

BIBLIOGRAFÍA

- Abha, S.; Cameotra S. (2012). Hydrocarbon Pollution. Effects on living organisms, remediation of contaminated environments, and effects of heavy metals co-contamination on bioremediation. Wolicka & Borkowski (eds.): *Microorganisms and Crude Oil*: INTECH Open Access Publisher.
- Abouseoud, M.; Maachi, R.; Amranec, A.; Boudergua, S.; Nabia, A. (2008): Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223, 143-151.
- Aburto, J. (2008). Evaluación técnico-económica de la producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos. *Tecnología, Ciencia, Educación (IMIQ)*, 23–30.
- Adams, G.O.; Fufeyin, P.T.; Okoro, S.E.; Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3, 28–39.
- Adenipekun, C.O., Oyetunji, O.J.; Kassim, L.Q. (2009): Screening of *Abelmoschus esculentus* L. moench for tolerance to spent engine oil. *Journal of Applied Bioscience.*, 20, 1131 - 1137.
- Agarry, S.E.; Ogunleye, O.O. (2012): Factorial designs application to study enhanced bioremediation of soil artificially contaminated with weathered bonny light crude oil through biostimulation and bioaugmentation strategy. *Journal of Environmental Protection*, 3, 748–759. DOI: 10.4236/jep.2012.38089.
- Albaigés, J.; Morales-Nin, B.; Vilas, F. (2006): The Prestige oil spill. A scientific response. *Marine Pollution Bulletin*, 53, 205–207. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2006.03.012.
- Alexander, M. (1965): Biodegradation: Problems of molecular recalcitrance and microbial fallibility. *Advances Applied Microbiology*, 7, 35–80.
- Alexander, M. (1994): Biodegradation and bioremediation. San Diego: Academic Press.
- Allard, A.; Remberger, M.; Neilson, A.H. (2000): The negative impact of aging on the loss of PAH components in a creosote-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46 (1), 43–49. DOI: 10.1016/S0964-8305(00)00050-0.
- Alvarez, R.; Leavy, S.; Marino, M. (2009): Zonas Agroeconómicas Homogéneas - Buenos Aires Norte. Estudios socioeconómicos de la sustentabilidad de los sistemas de producción y recursos naturales, INTA ISSN 1851-6955.
- Araruna, J.T.; Portes, V.L.; Soares A.P.; Silva M.G.; Sthel M.S.; Schramm D.U.; Tibana S.; Vargas H. (2004): Oil spills debris clean up by thermal desorption. *Journal of Hazardous Materials*, 110, 1-3: 161-171.
- Arima, K.; Kakinuma, A.; Tamura, G. (1968): Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 31 (3), 488–494.

- Atlas, R.M. (1981): Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. An environmental perspective. *Microbiological Reviews*, 45 (1), 180–209.
- Atlas R.; Bartha R. (2002): Ecología microbiana y Microbiología ambiental. 4ta Ed. Addison Wesley.
- Austin, B.; Calomiris, J.J.; Walker, J.D.; Colwell, R.R. (1977): Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria. *Applied & Environmental Microbiology*, 34 (1), 60–68.
- Azubuiké, C.C.; Chikere, C.B.; Okpokwasili, G.C. (2016): Bioremediation techniques-classification based on site of application: Principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 32, 180.
- Banat, I. M.; Makkar, R. S.; Cameotra, S. S. (2000): Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 53 (5), 495–508.
- Barathi, S.; Vasudevan, N. (2001): Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International* 26 (5-6), 413–416.
- Bernal, F. (2005): Petróleo, estado y soberanía. Hacia la empresa multiestatal latinoamericana de hidrocarburos. 1. ed. Buenos Aires: Editorial Biblos.
- Bezza, F.A.; Chirwa, E.M.; Nkhalambayausi Y. (2016): Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere*, 144, 635–644. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.08.027.
- Black, C.A. (1965): Operator Variation. C.A Black (ed.): Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical properties, including statistics of measurement and sampling. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America.
- Bossert, I.; Bartha, R. (1984): The fate of petroleum in soil ecosystems. R. M. Atlas (ed.), *Petroleum microbiology*, Macmillan Publishing Co., 434–476.
- Bouchez-Naïtali, M.; Rakatozafy, H.; Marchal, R.; Leveau, J. Y.; Vandecasteele, J. P. (1999): Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *Journal of Applied Microbiology*, 86 (3), 421–428.
- Braddock, J.F.; Ruth, M.L.; Catterall, P.H.; Walworth, J.L.; McCarthy, K.A. (1997): Enhancement and inhibition of microbial activity in hydrocarbon-contaminated arctic soils. Implications for nutrient-amended bioremediation. *Environmental Science & Technology*, 31 (7), 2078–2084. DOI: 10.1021/es960904d.
- Bredholt, H.; Josefsen, K.; Vatland, A.; Bruheim, P.; Eimhjellen, K. (1998): Emulsification of crude oil by an alkane-oxidizing *Rhodococcus* species isolated from seawater. *Canadian Journal of Microbiology*, 44 (4), 330–340. DOI: 10.1139/w98-005.
- Brock, T.D.; Madigan, M.T. (2015): Biología de los microorganismos. Madrid: Pearson Educación.

- Brown, L.M.; Gunasekera, T.S.; Ruiz, O.N. (2017): Draft genome sequence of *Pseudomonas stutzeri* strain 19, an isolate capable of efficient degradation of aromatic hydrocarbons. *Genome Announcements*, 5 (49). DOI: 10.1128/genomeA.01373-17.
- Burlage, R.S.; Hooper, S.W.; Saylor, G.S. (1989): The TOL (pWW0) catabolic plasmid. *Applied & Environmental Microbiology*, 55 (6), 1323–1328.
- Caplan, J. (1993): The worldwide bioremediation industry. Prospects for profit. *Trends in Biotechnology*, 11 (8), 320–323. DOI: 10.1016/0167-7799(93)90153-Z.
- Cavalca, L.; Colombo, M.; Larcher, S.; Gigliotti, C.; Collina, E.; Andreoni, V. (2002): Survival and naphthalene-degrading activity of *Rhodococcus* sp. strain 1BN in soil microcosms. *Journal of Applied Microbiology*, 92 (6), 1058–1065. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01640.x.
- Cerqueira, V.S.; Hollenbach, E.B.; Maboni, F.; Vainstein, M.H.; Camargo, F.A.; do Carmo R Peralba, M.; Bento, F.M. (2011): Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresource Technology*, 102 (23), 11003–11010. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.09.074.
- Chai, L.; Jiang, X.; Zhang, F.; Zheng, B.; Shu, F.; Wang, Z. (2015): Isolation and characterization of a crude oil degrading bacteria from formation water. Comparative genomic analysis of environmental *Ochrobactrum* intermedium isolate versus clinical strains. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 16 (10), 865–874. DOI: 10.1631/jzus.B1500029.
- Chain, P. S. G.; Lang, D. M.; Comerci, D. J.; Malfatti, S. A.; Vergez, L. M.; Shin, M. (2011): Genome of *Ochrobactrum anthropi* ATCC 49188 T, a versatile opportunistic pathogen and symbiont of several eukaryotic hosts. *Journal of Bacteriology*, 193 (16), 4274–4275. DOI: 10.1128/JB.05335-11.
- Chaîneau, C.H.; Yepremian, C.; Vidalie, J.F.; Ducreux, J.; Ballerini, D. (2003): Bioremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water, Air, and Soil Pollution*, 144 (1/4), 419–440. DOI: 10.1023/A:1022935600698.
- Chakrabarty, A.M. (1976): Plasmids in *Pseudomonas*. *Annual Review of Genetics*, 10, 7–30. DOI: 10.1146/annurev.ge.10.120176.000255.
- Chikere, C.B.; Azubuike, C.C.; Fubara, E.M. (2017): Shift in microbial group during remediation by enhanced natural attenuation (RENA) of a crude oil-impacted soil. A case study of Ikarama Community, Bayelsa, Nigeria. *Biotechnnology*, 7 (2), 152. DOI: 10.1007/s13205-017-0782-x.
- Chrzanowski, L.; Lawniczak, L.; Czaczyk, K. (2012): Why do microorganisms produce rhamnolipids?. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 28 (2), 401–419. DOI: 10.1007/s11274-011-0854-8.
- Chundawat, S.P.S.; Beckham, G.T.; Himmel, M.E.; Dale, B.E. (2011): Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual Review of Chemical & Biomolecular Engineering*, 2, 121–145.

- Clark, L. (1995): Hydrocarbon pollution control and remediation of groundwater. A brief review. *Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology*, 28 (Supplement_2), S93-S100. DOI: 10.1144/GSL.QJEGH.1995.028.S2.01.
- Congiu, E.; Ortega-Calvo, J.J. (2014): Role of desorption kinetics in the rhamnolipid-enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science & Technology*, 48, 10869–10877.
- Cooper, D.G. (1986): Biosurfactants. *Microbiological Sciences*, 3 (5), 145–149.
- Cooper, S.P.; Labarthe, D.; Downs, T.; Burau, K.; Whitehead, L.; Vernon, S. (1997): Cancer mortality among petroleum refinery and chemical manufacturing workers in Texas. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology & Oncology*, 16 (1), 1–14.
- Cutler, A.J.; Light, R.J. (1979): Regulation of hydroxydocosanoic acid sophoroside production in *Candida bogoriensis* by the levels of glucose and yeast extract in the growth medium. *Journal Biological Chemical*, 254 (6), 1944–1950.
- Das, K.; Mukherjee, A. K. (2007): Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98 (7), 1339–1345. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.05.032.
- Das, N.; Chandran, P. (2011): Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*, 941810.
- Declercq, I.; Cappuyns, V.; Duclos Y. (2012): Monitored natural attenuation (MNA) of contaminated soils: states of an art in Europe – a critical evaluation. *Science of the Total Environment*, 426, 393-405.
- Díaz E.; Jimenez J.I.; Nogales J. (2012): Aerobic degradation of aromatic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 1-12.
- Dias, R.; Ruberto, L.; Hernández, E.; Vázquez, S.; Lo Balbo, A.; Del Panno, M.; Mac Cormack, W. (2012): Bioremediation of an aged diesel oil-contaminated Antarctic soil: Evaluation of the “on site” biostimulation strategy using different nutrient sources. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 75, 96–103.
- Deleu, M.; Razafindralambo, H.; Popineau, Y.; Jacques, P.; Thonart, P.; Paquot, M. (1999): Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1-2 (152), 3–10.
- 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 & Technology*, 40 (1-2), 61–70. DOI: 10.1016/j.coldregions.2004.05.005.
- Desai, J.D.; Banat, I.M. (1997): Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (1), 47–64.

- Dibble, J.T.; Bartha, R. (1979): Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied & Environmental Microbiology*, 37 (4), 729–739.
- Dua, M.; Singh, A.; Sethunathan, N.; Johri, A.K. (2002): Biotechnology and bioremediation. Successes and limitations. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 59 (2-3), 143–152. DOI: 10.1007/s00253-002-1024-6.
- Duba, A.G.; Jackson, K.J.; Jovanovich, M.C.; Knapp, R.B.; Taylor, R.T. (1996): TCE remediation using resting-state bioaugmentation. *Environmental Science Technology*, 30 (10), 3132. DOI: 10.1021/es962010z.
- Dvořák, P.; Nikel, P.I.; Damborský, J.; Lorenzo, V. (2017): Bioremediation 3.0: Engineering pollutant-removing bacteria in the times of systemic biology. *Biotechnology Advances*, 35, 845–866.
- Ebadi, A.; Khoshkholgh S.; Nayer A.; Olamaee, M.; Hashemi, M.; Ghorbani N. (2017): Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Journal of Advanced Research*, 8 (6), 627–633. DOI: 10.1016/j.jare.2017.06.008.
- Edwards, J.R.; Hayashi, J.A. (1965): Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. En: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 111 (2), 415–421.
- El-Alam, I.; Verdin, A.; Fontaine, J.; Laruelle, F.; Chahine, R.; Makhlof, H.; Sahraoui, A.L.H. (2018): Ecotoxicity evaluation and human risk assessment of an agricultural polluted soil. *Environmental Monitoring Assessment*, 190, 738.
- El Fantroussi, S.; Agathos, S.N. (2005): Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology*, 8 (3), 268–275. DOI: 10.1016/j.mib.2005.04.011.
- El-Sheshtawy, H.S.; Khalil, N.M.; Ahmed, W.; Abdallah, R.I. (2014): Monitoring of oil pollution at Gemsa Bay and bioremediation capacity of bacterial isolates with biosurfactants and nanoparticles. *Marine Pollution Bulletin*, 87 (1-2), 191–200. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2014.07.059.
- Esquinas, N.; Rodríguez Valdés, E.; Márquez, G.; Gallego, J.L.R. (2017): Diagnostic ratios for the rapid evaluation of natural attenuation of heavy fuel oil pollution along shores. *Chemosphere*, 184, 1089–1098.
- Evans W.C.; Smith B.S.W.; Linstead R.P.; Elbidge J.A. (1951): Chemistry of the oxidative metabolism of certain aromatic compounds by micro-organisms. *Nature*, 168 (4279), 772–775. DOI: 10.1038/168772a0.
- Farag, S.; Soliman, N.A.; Abdel-Fattah, Y.R. (2018): Statistical optimization of crude oil biodegradation by a local marine bacterium isolate *Pseudomonas sp.* 48. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*, 16, 409–420.
- Floodgate G. (1984): The fate of petroleum in marine ecosystems. R. M. Atlas (ed.), *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing Co., 355–398.

- Fracchia, L.; Cavallo, M.; Giovanna, M.; Ibrahim M. (2012): Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications – Present status and future potentials. Husheng Yan, Keliang Liu y Miao Guo (eds.): Multifunctional Magnetic Hybrid Nanoparticles as a Nanomedical Platform for Cancer-Targeted Imaging and Therapy: INTECH Open Access Publisher.
- Frank, N.; Lissner, A.; Winkelmann, M.; Hüttl, R.; Mertens, F.O.; Kaschabek, S.R.; Schlömann, M. (2010): Degradation of selected (bio-)surfactants by bacterial cultures monitored by calorimetric methods. *Biodegradation*, 21 (2), 179–191. DOI: 10.1007/s10532-009-9292-9.
- Fulekar, M.H. (2017): Microbial degradation of petrochemical waste-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresources & Bioprocessing*, 4 (1), 28. DOI: 10.1186/s40643-017-0158-4.
- Gai, Z.i; Zhang, Z.i; Wang, X.; Tao, F.; Tang, H.; Xu, P. (2012): Genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* DQ8, an efficient degrader of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Bacteriology*, 194 (22), 6304–6305. DOI: 10.1128/JB.01499-12.
- Ghosal, D.; Chakraborty, J.; Khara, P.; Dutta, T.K. (2010): Degradation of phenanthrene via meta-cleavage of 2-hydroxy-1-naphthoic acid by *Ochrobactrum sp.* strain PWTJD. *FEMS Microbiology Letters*, 313 (2), 103–110. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02129.x.
- Gomes, N.; Kosheleva, I.; Wolf Rainer A.; Smalla, K. (2005): Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community. *FEMS Microbiology Ecology*, 54 (1), 21–33. DOI: 10.1016/j.femsec.2005.02.005.
- Govindammal M. (2014): Effect of carbon and nitrogen sources on the production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens* isolated from Mangrove Ecosystem. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, (5(2)), 108–115.
- Gray, Murray R. (1992): The chemistry and technology of petroleum, second edition, revised and expanded, New York, 1991, 38 (8), 1304–1305. DOI: 10.1002/aic.690380820.
- Greene, E.A.; Kay, J.G.; Jaber, K.; Stehmeier, L.G.; Voordouw, G. (2000): Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Applied & Environmental Microbiology*, 66 (12), 5282–5289.
- Griffin, L.F.; Calder, J.A. (1977): Toxic effect of water-soluble fractions of crude, refined, and weathered oils on the growth of a marine bacterium. *Applied & Environmental Microbiology*, 33 (5), 1092–1096.
- 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.
- Gupta, S.K.; Kumari, R.; Prakash, O.; Lal, R. (2008): *Pseudomonas panipatensis* sp. nov., isolated from an oil-contaminated site. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 58 (Pt 6), 1339–1345. DOI: 10.1099/ij.s.0.65401-0.

- Hallenbeck, P.C.; Grogger, M.; Mraz, M.; Veverka, D. (2015): The use of design of experiments and response surface methodology to optimize biomass and lipid production by the oleaginous marine green alga, *nannochloropsis gaditana* in response to light intensity, inoculum size and CO₂. *Bioresource Technology*, 184, 161–168. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.09.022
- Hammershøj, R.; Birch, H.; Redman, A.D.; Mayer, P. (2019): Mixture effects on biodegradation kinetics of hydrocarbons in surface water: increasing concentrations inhibited degradation whereas multiple substrates did not. *Environmental Science Technology*, 53, 3087–3094.
- Hayaishi, O.; Katagiri, M.; Rothberg, S. (1955): Mechanism of the pyrocatechase reaction. *Journal of American Chemical Society*, 77 (20), 5450–5451. DOI: 10.1021/ja01625a095.
- Head, I.M. (1998): Bioremediation. Towards a credible technology. *Microbiology*, 144 (3), 599–608. DOI: 10.1099/00221287-144-3-599.
- Heipieper, H.J.; Weber, F.J.; Sikkema, J.; Keweloh, H.; Bont, J. (1994): Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in Biotechnology*, 12 (10), 409–415. DOI: 10.1016/0167-7799(94)90029-9.
- Hemamalini, R.; Khare, S. (2014): A proteomic approach to understand the role of the outer membrane porins in the organic solvent-tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Plos One*, 9 (8), e103788. DOI: 10.1371/journal.pone.0103788.
- Hendrickx, B.; Junca, H.; Vosahlova, J.; Lindner, A.; Rüegg, I.; Bucheli-Witschel, M. (2006): Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation. Distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *Journal of Microbiological Methods*, 64 (2), 250–265. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.04.018.
- Holliger, C.; Zehnder, A.J.B. (1996): Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 7 (3), 326–330. DOI: 10.1016/S0958-1669(96)80039-5.
- Holmes, B.; Popoff, M.; Kiredjian, M.; Kersters, K. (1988): *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38 (4), pág. 406–416. DOI: 10.1099/00207713-38-4-406.
- Hommel, Rolf K. (1990): Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. *Biodegradation* 1 (2-3), 107–119. DOI: 10.1007/BF00058830.
- Huesemann, M.H. (1995): Predictive model for estimating the extent of petroleum hydrocarbon biodegradation in contaminated soils. *Environmental Science & Technology* 29 (1), 7–18. DOI: 10.1021/es00001a002.
- Itoh, S.; Suzuki, T. (2014): Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in n-Paraffin-utilizing ability. *Agricultural & Biological Chemistry*, 36 (12), 2233–2235. DOI: 10.1080/00021369.1972.10860546.

- Jarvis, F.G.; Johnson, M.J. (1949): A Glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of American Chemical Society*, 71 (12), 4124–4126. DOI: 10.1021/ja01180a073.
- 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. *Environmental Pollution*, 133 (1), 71–84. DOI: 10.1016/j.envpol.2004.04.015.
- Johnson, F.H.; Goodale, W.T.; Turkevich, J. (1942): The bacterial oxidation of hydrocarbons. *Journal of Cellular & Comparative Physiology*, 19 (2), 163–172. DOI: 10.1002/jcp.1030190205.
- Jördening, H.J.; Winter, J. (2005): Environmental biotechnology: Concepts and applications. Weinheim: Wiley-VCH.
- Júlio, A.D.L., Fernandes, R.C.R., Costa, M.D., Neves, J.C.L., Rodrigues, E.M.; Tótola, M.R. (2018): A new biostimulation approach based on the concept of remaining P for soil bioremediation. *J Environmental Management*, 207, 417–422.
- Juwarkar, A.A.; Singh, S.K.; Mudhoo, A. (2010): A comprehensive overview of elements in bioremediation. *Reviews in Environmental Science & Technology*, 9: 215-288.
- Kaczorek, E.; Jesionowski, T.; Giec, A.; Olszanowski, A. (2012): Cell surface properties of *Pseudomonas stutzeri* in the process of diesel oil biodegradation. *Biotechnology Letters*, 34 (5), 857–862. DOI: 10.1007/s10529-011-0835-x.
- Kaindl M. (2009): El abece del petróleo y del gas en el mundo y en la Argentina. *Instituto Argentino del petróleo y el gas*.
- Kaindl M (2011): Aspectos técnicos estratégicos y económicos de la refinación del petróleo. *Instituto Argentino del Petróleo y del Gas*.
- Kanally, R.A.; Harayama, S. (2000): Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182 (8), 2059–2067.
- Katayama, A.; Bhula, R.; Burns, G.R.; Carazo, E.; Felsot, A.; Hamilton, D.; Harris, C.; Kim, Y.H.; Kleter, G.; Koedel, W.; Linders, J.; Peijnenburg, J.G.M.W.; Sabljic, A.; Stephenson, R.G.; Racke, D.K.; Rubin, B.; Tanaka, K.; Unsworth, J.; Wauchope, R.D. (2010): Bioavailability of xenobiotics in the soil environment. *Review of Environmental Contamination Toxicology*, 203, 1–86.
- Kim, D.; Kim, Y.S.; Kim, S.K.; Kim, S.W.; Zylstra, G. J.; Kim, Y. M.; Kim, E. (2002): Monocyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by *Rhodococcus* sp. Strain DK17. *Applied Environmental Microbiology*, 68 (7), 3270–3278. DOI: 10.1128/AEM.68.7.3270-3278.2002.
- Kingston, P.F. (2002): Long-term Environmental Impact of Oil Spills. *Spill Science & Technology Bulletin*, 7 (1-2), 53–61. DOI: 10.1016/S1353-2561(02)00051-8.

- Kirk, R.E.; Othmer, D.F.; Kroschwitz, J.I.; Howe-Grant, M. (1998): Encyclopedia of chemical technology. 4th ed. New York: Wiley.
- Kloos, K.; Munch, J.C.; Schloter, M. (2006): A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (alkB) in soils based on PCR-hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 66 (3), 486–496. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.01.014.
- Korade, D.L.; Fulekar, M.H. (2009): Effect of organic contaminants on seed germination of *Lolium multiflorum* in soil. *Biology and Medicine (Bio. Med.)*, 1, 28-34.
- Korda, A.; Santas, P.; Tenente, A.; Santas, R. (1997): Petroleum hydrocarbon bioremediation. Sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 48 (6), 677–686.
- Kosaric, N. (2001): Biosurfactants for soil bioremediation. *Food Technology & Biotechnology*, 39(4), 295–304.
- Koshlaf, E.; Ball A.S. (2017): Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiology*, 3(1), 25-49.
- Kretschmer, A.; Bock, H.; Wagner F. (1982): Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *Applied Environmental Microbiology*, 44, 864–870.
- Kronemberger F.D.A.; Santa Anna L.M.M.; Fernandes A.C.L.B.; Menezes R.R.D.; Borges C.P.; Freire D.M.G. (2008): Oxygen-controlled biosurfactant production in a bench scale bioreactor. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 147 (1–3): 33–45.
- Kupiec, T.C.; Matthews, P.; Ahmad, R. (2000): Dry-heat sterilization of parenteral oil vehicles. *International Journal of Pharmaceutical Compounding* 4 (3), 223–224.
- Lageveen, R.G.; Huisman, G.W.; Preusting, H.; Ketelaar, P.; Eggink, G.; Witholt, B. (1988): Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*. Effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Applied & Environmental Microbiology*, 54 (12), 2924–2932.
- Leahy, J.G.; Colwell, R.R. (1990): Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 54 (3), 305–315.
- Lepo, J.E.; Hancock, M. P.; Zuleger, C.L.; Roupp-Edwards, K.; Reilly, T.; Fritz, D.E. (1997): Effectiveness and safety of biosurfactants as agents of oil spill response. *International Oil Spill Conference Proceedings 1997* (1), 687–696. DOI: 10.7901/2169-3358-1997-1-687.
- Li, X.; Li, P.; Liu, W.; Wang, L.; Ma, F.; Chukwuka, K.S. (2009): Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *Journal of Hazardous Materials*, 172 (2-3), 601–605. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.044.

- Liang, F.; Lu, M.; Keener, T.C.; Liu, Z.; Khang, S. (2005): The organic composition of diesel particulate matter, diesel fuel and engine oil of a non-road diesel generator. *Journal of Environmental Monitoring*, 7 (10), 983–988. DOI: 10.1039/b504728e.
- Liporace, F.; Quevedo, C.; Guilletti, A.M. (2012): Isolation of biosurfactant-producing microorganisms at the petrochemical area of Campana. *Biocell*, 36, 97.
- Liu, H.; Liang, R.; Tao, F.; Ma, C.; Liu, Y.; Liu, X.; Liu, J. (2012): Genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* strain SJTD-1, a bacterium capable of degrading long-chain alkanes and crude oil. *Journal of Bacteriology*, 194 (17), 4783–4784. DOI: 10.1128/JB.01061-12.
- Liu, S.; Suflita, J. M. (1993): Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 11 (8), 344–352. DOI: 10.1016/0167-7799(93)90157-5.
- Lotfabad, T.B.; Shourian, M.; Roostaazad, R.; Najafabadi, A.R.; Adelzadeh, M.R.; Noghabi, K. A. (2009): An efficient biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. *Colloids & Surfaces. B, Biointerfaces*, 69 (2), 183–193. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2008.11.018.
- Lovley, D.R. (2003): Cleaning up with genomics. Applying molecular biology to bioremediation. *Nature reviews. Microbiology* 1 (1), 35–44. DOI: 10.1038/nrmicro731.
- Lv, H.; Su, X.; Wang, Y.; Dai, Z.; Liu, M. (2018): Effectiveness and mechanism of natural attenuation at a petroleum-hydrocarbon contaminated site. *Chemosphere*, 206, 293–301.
- Madueño, L.; Coppotelli, B.M.; Morelli, I.S. (2009): Efecto de la inoculación de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA sobre la composición de un consorcio bacteriano degradador de fenantreno. *Revista Argentina de microbiología*, 41 (2), 65–72.
- Maier, R.M.; Soberón-Chávez, G. (2000): *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids. Biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 54 (5), 625–633.
- Maier, T.; Forster, H.; Asperger, O.; Hahn, U. (2001): Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 286 (3), 652–658. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5449.
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S. (2002): An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 58, 428–434.
- Maliszewska-Kordybach, B.; Smreczak, B (2003): Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environment International*, 28 (8), 719–728. DOI: 10.1016/S0160-4120(02)00117-4.
- Mao, J.; Luo, Y.; Teng, Y.; Li, Z. (2012): Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial community changes. *International Biodeterioration & Biodegradation* 70, 141–147. DOI: 10.1016/j.ibiod.2012.03.002.

- Margesin, R.; Schinner, F. (2001): Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Applied & Environmental Microbiology*, 67 (7), 3127–3133. DOI: 10.1128/AEM.67.7.3127-3133.2001.
- Márquez-Rocha, F.J., Hernández-Rodríguez, V., Lamela, M.T. (2001) Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water, Air, and Soil Pollution*, 128, 313–320.
- Martínez-Álvarez, L.M.; Ruberto, L.; Lo Balbo, A.; Mac Cormack, W.P. (2017): Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils in cold regions: Development of a pre-optimized biostimulation biopile-scale field assay in Antarctica. *Science of Total Environment*, 590-591, 194–203.
- Martínez-Lavanchy, P.M.; Müller, C.; Nijenhuis, I.; Kappelmeyer, U.; Buffing, M.; McPherson, K.; Heipieper, H.J. (2010): High stability and fast recovery of expression of the TOL plasmid-carried toluene catabolism genes of *Pseudomonas putida* mt-2 under conditions of oxygen limitation and oscillation. *Applied & Environmental Microbiology*, 76 (20), 6715–6723. DOI: 10.1128/AEM.01039-10.
- Mata-Sandoval, J.C.; Karns, J.; Torrents, A. (2001): Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. *Microbiological Research*, 155 (4), 249–256. DOI: 10.1016/S0944-5013(01)80001-X.
- McKenna, E.J.; Kallio, R.E. (1965): The biology of hydrocarbons. *Annual Review of Microbiology*, 19, 183–208. DOI: 10.1146/annurev.mi.19.100165.001151.
- Méndez, M.; Alarcón, L.R.; Sosa, M.P.; Rodríguez, P. (2011): Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) usando CG-FID en suelos de un patio de tanques en desuso situado en Catia La Mar–Venezuela. *Ciencia & Ingeniería*, 32, 31–38.
- Mishra, S.; Singh, S.N. (2012): Microbial degradation of n-hexadecane in mineral salt medium as mediated by degradative enzymes. *Bioresource Technology*, 111, 148–154. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.02.049.
- Miyoshi M. (1895): Die Durchbohrung von Membranen durch Pilzfäden. *Jahrb. Wiss. Botan.*, 28, 269–289.
- Mnif, I.; Mnif, S.; Sahnoun, R.; Maktouf, S.; Ayedi, Y.; Ellouze-Chaabouni, S.; Ghribi, D. (2015): Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: Comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants. *Environmental Science Polluiont Recherche*, 22, 14852–14861.
- Mogilevskii GA. (1940): Bacterial method of prospecting for oil and natural gas. *Razvedka Nedr*, 12.
- Mohammadi-Sichani, M.M.; Assadi, M.M.; Farazmand, A.; Kianirad, M.; Ahadi, A.M.; Ghahderijani, H.H. (2017): Bioremediation of soil contaminated crude oil by Agaricomycetes. *Journal Environmental Health Science & Engineering*, 15, 8.
- Montgomery, D. (2001): Design and analysis experiments. John Wiley & Sons, New York.

- Moussa, T.A.A.; Mohamed, M.S.; Samak, N. (2014): Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31, 867–880.
- Mrozik, A.; Piotrowska-Seget, Z. (2010): Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, 165, 363–375.
- Mulet, M; Lalucat, J; García-Valdés, E. (2010): DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology* 12 (6), 1513–1530. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x.
- Mulligan, C.N. (2005): Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 133 (2), 183–198. DOI: 10.1016/j.envpol.2004.06.009.
- Muratova, A.; Dubrovskaya, E.; Golubev, S.; Grinev, V.; Chernyshova, M.; Turkovskaya, O. (2015): The coupling of the plant and microbial catabolisms of phenanthrene in the rhizosphere of *Medicago sativa*. *Journal of Plant Physiology*, 188, 1–8. DOI: 10.1016/j.jplph.2015.07.014.
- Navacharoen, A.; Vangnai, A.S. (2011): Biodegradation of diethyl phthalate by an organic-solvent-tolerant *Bacillus subtilis* strain 3C3 and effect of phthalate ester coexistence. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, 818–826.
- Neu, T.R. (1996): Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological Reviews*, 60 (1), 151–166.
- Nikolopoulou, M.; Pasadakis, N.; Kalogerakis, N. (2007): Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers. *Desalination*, 211 (1-3), 286–295. DOI: 10.1016/j.desal.2006.02.095.
- Nkem, B.M.; Halimoon, N.; Yusoff, F.; Johari, W.; Zakaria, M.; Medipally, S.; Kannan, N. (2016): Isolation, identification and diesel-oil biodegradation capacities of indigenous hydrocarbon-degrading strains of *Cellulosimicrobium cellulans* and *Acinetobacter baumannii* from tarball at Terengganu beach, Malaysia. *Marine Pollution Bulletin*, 107 (1), 261–268. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2016.03.060.
- Obi, L.U.; Atagana, H.I.; Adeleke, R.A. (2016): Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria. *Springer Plus* 5 (1). DOI: 10.1186/s40064-016-3617-z.
- Obuekwe, C.O.; Al-Jadi, Z.K.; Al-Saleh, E.S. (2009): Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63 (3), 273–279. DOI: 10.1016/j.ibiod.2008.10.004.
- Obuekwe, C.O.; Badrudeen, A.M.; Al-Saleh, E.; Mulder, J.L. (2005): Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56 (4), 197–205. DOI: 10.1016/j.ibiod.2005.05.005.

- Ooyama, J.; Foster, J.W. (1965): Bacterial oxidation of cycloparaffinic hydrocarbons. *Antonie van Leeuwenhoek*, 31, 45–65.
- Ortega Calvo, J.J.; Alexander M. (1994) Roles of bacterial attachment and spontaneous partitioning in the biodegradation of naphthalene initially present in nonaqueous-phase liquids. *Applied & Environmental Microbiology*, 60 (7), 2643-2646.
- Pandey, A.; Soccol, C.R.; Mitchell, D. (2000): New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35, 1153–1169.
- Pepłońska, B. (1995): Ryzyko choroby nowotworowej wśród pracowników rafinerii ropy naftowej oraz wśród osób zatrudnionych przy dystrybucji paliw. *Medycyna pracy*, 46 (6), 603–617.
- Pérez de Mora, A.; Schulz S.; Scholter M. (2010) MPN- and real-time-based PCR methods for the quantification of alkane monooxygenase homologous genes (alkB) in environmental samples. *Method in Molecular Biology*, 599, 59-68. doi: 10.1007/978-1-60761-439-5_4.
- Ponce, B.L.; Latorre, V.K.; González, M.; Seeger, M. (2011) Antioxidant compounds improved PCB-degradation by *Burkholderia xenovorans* strain LB400. *Enzyme & Microbial Technology*, 49, 509–516.
- Poremba, K.; Gunkel, W.; Lang, S.; Wagner, F. (1991): Marine biosurfactants, III. Toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 46 (3-4), 210–216.
- Posada-Baquero, R.; Grifoll, M.; Ortega-Calvo, J.J. (2019): Rhamnolipid-enhanced solubilization and biodegradation of PAHs in soils after conventional bioremediation. *Science of the Total Environment*, 668, 790–796.
- Propst, T.L.; Lochmiller, R.L.; Qualls, C.W.; McBee, K. (1999): In situ (mesocosm) assessment of immunotoxicity risks to small mammals inhabiting petrochemical waste sites. *Chemosphere*, 38 (5), 1049–1067. DOI: 10.1016/S0045-6535(98)00349-X.
- Qi, J.; Wang, B.; Li, J.; Ning, H.; Wang, Y.; Kong, W.; Shen, L. (2015): Genetic determinants involved in the biodegradation of naphthalene and phenanthrene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Environmental Science & Pollution Research International*, 22 (9), 6743–6755. DOI: 10.1007/s11356-014-3833-4.
- Qin, W.; Fan, F.; Zhu, Y.; Huang, X.; Ding, A.; Liu, X.; Dou, J. (2018): Anaerobic biodegradation of benzo(a)pyrene by a novel *Cellulosimicrobium cellulans* CWS2 isolated from polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49 (2), 258–268. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.04.014.
- Rabodonirina, S.; Rasolomampianina, R.; Krier, 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. *Journal of Environmental Management*, 232, 1–7.

- Racine, C.H. (1994): Long-term recovery of vegetation on two experimental crude oil spills in interior Alaska black spruce taiga. *Canadian Journal of Botany*, 72, 1171-1177.
- Radice, M.; Marín, M.; Giovanakis, M.; Vay, C.; Almuzara, M.; Limansky, A. (2011): Criterios de ensayo, interpretación e informe de las pruebas de sensibilidad a los antibióticos en los bacilos gram negativos no fermentadores de importancia clínica. Recomendaciones de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas, Asociación Argentina de Microbiología. *Revista Argentina de Microbiología*, 43 (2), 136–153.
- Rahman, K.S.M.; Rahman, P.; Lakshmanaperumalsamy, R.; Marchant; Banat. I.M. (2002): Emulsification potential of bacterial isolates with a range of hydrocarbon substrates. *Acta Biotechnology*, 23, 335–345.
- Ramadass, K.; Megharaj, M.; Venkateswarlu, K.; Naidu, R. (2018): Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil. Impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas spp.* on bioremediation. *The Science of the Total Environment*, 636, 968–974. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.379.
- Ramasamy, S.; Mathiyalagan, P.; Chandran, P. (2014): Characterization and optimization of EPS-producing and diesel oil-degrading *Ochrobactrum anthropi* MP3 isolated from refinery wastewater. *Petroleum Science*, 11 (3), 439–445. DOI: 10.1007/s12182-014-0359-9.
- Ramírez, O.; Rivera, A.; Marin, L; Rojano, B.; Ruiz, O.; Gallo, S. (2012): Biorremediación de un suelo con diésel mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Gestión & Ambiente*, 15, 27–40.
- Raymond R.L.; Jamison V.W.; Hudson J.O. (1975): Final report on beneficial stimulation of bacterial activity in groundwater containing petroleum products. *American Petroleum Institute*, Washington (DC).
- Reis, R.S.; Pereira, A.G.; Neves, B.C.; Freire, D. (2011): Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* - a review. *Bioresource Technology*, 102 (11), 6377–6384. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.03.074.
- Rezende, .CA.; Atta, B.W.; Breikreitz M.C.; Simister, R., Gomez L.D.; McQueen-Mason, S.J. (2018): Optimization of biomass pretreatments using fractional factorial experimental design. *Biotechnology for Biofuels*, 24, 11: 206. DOI: 10.1186/s13068-018-1200-2.
- Rizzo, C.; Rappazzo, A.C.; Michaud, L.; Domenico, E.; Rochera, C.; Camacho, A.; Lo Giudice, A. (2018): Efficiency in hydrocarbon degradation and biosurfactant production by *Joostella sp.* A8 when grown in pure culture and consortia. *Jornal of Environmental Science*, 67, 115–126.
- Rodríguez Gallego J. (2003): La Biorremediación Frente al Vertido del Exxon Valdés. *Industria & Minería*, 351, 24–27.
- Röling, W.F.M.; Milner, M.G.; Jones, D.M.; Lee, K.; Daniel, F.; Swannell, R.J.P.; Head, I.M. (2002): Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during

- nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied & Environmental Microbiology*; 68 (11), 5537–5548.
- Rosenberg, E. (1993): Exploiting microbial growth on hydrocarbons? New markets. *Trends in Biotechnology*, 11 (10), 419–424. DOI: 10.1016/0167-7799(93)90005-T.
- Rosenberg, M.; Rosenberg, E. (1981): Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Journal of Bacteriology*, 148 (1), 51–57.
- 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. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1101–1101.
- Ruberto, L.A.M.; Vazquez, S.C.; Curtosi, A.; Mestre, M.C.; Pelletier, E.; Mac Cormack, W.P. (2006): Phenanthrene biodegradation in boils using an antarctic bacterial consortium. *Bioremediation Journal*, 10, 191–201.
- Ruberto, L.A.M.; Vazquez, S.C.; Mac Cormack, W.P. (2003): Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52, 115–125.
- Sabaté, J.; Viñas, M.; Solanas, A.M (2004): Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54 (1), 19–25. DOI: 10.1016/j.ibiod.2003.12.002.
- Sałek, K.; Kaczorek, E.; Guzik, U.; Zgoła-Grześkowiak, A. (2015): Bacterial properties changing under Triton X-100 presence in the diesel oil biodegradation systems. From surface and cellular changes to mono- and dioxygenases activities. *Environmental Science & Pollution Research International*, 22 (6), 4305–4315. DOI: 10.1007/s11356-014-3668-z.
- Santa Anna, L.M.; Sebastian, G.V.; Menezes, E.P.; Alves, T.L.M.; Santos, A.S.; Pereira, N.; Freire, D.M.G. (2002): Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA 1 isolated in oil environments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19 (2), 159–166. DOI: 10.1590/S0104-66322002000200011.
- Sarkar, P.; Roy, A.; Pal, S., Mohapatra, B.; Kazy, S.K.; Maiti, M.K.; Sar, P. (2017): Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation. *Bioresource Technology*, 242, 15–27.
- Sayler, G.S.; Ripp, S. (2000): Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 11 (3), 286–289.
- Schumann, P.; Weiss, N.; Stackebrandt, E. (2001): Reclassification of *Cellulomonas cellulans* (Stackebrandt and Kiedde 1986) as *Cellulosimicrobium cellulans* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 51 (Pt 3), 1007–1010. DOI: 10.1099/00207713-51-3-1007.

- Segura, A.; Molina, L.; Fillet, S.; Krell, T.; Bernal, P.; Muñoz-Rojas, J.; Ramos, J.L. (2012): Solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 23 (3), 415–421. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.11.015.
- Semple, K. T.; Reid, B. J.; Fermer T.R. (2001): Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution* 112 (2), 269–283. DOI: 10.1016/S0269-7491(00)00099-3.
- Shahsavarezadeh-Jangi, P.; Shojaosadati, S.A.; Hashemi-Najafabadi, S.; Mousavi, S.M. (2015): Assessment of bioavailability of crude oil in three different agricultural soils. *Iranian Journal of Chemical Engineering*, 12, 3–12.
- Sikkema, J.; Bont, J.A.; Poolman, B. (1995): Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59 (2), 201–222.
- Singh, P.; DeMarini, D.M.; Dick, C.; Tabor, D.G.; Ryan, J.V.; Linak, W.P. (2004): Sample characterization of automobile and forklift diesel exhaust particles and comparative pulmonary toxicity in mice. *Environmental Health Perspectives*, 112 (8), 820–825.
- Singh, S., Kang, S.H., Mulchandani, A., Chen, W. (2008): Bioremediation: Environmental clean-up through pathway engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 437–444.
- Smith, A.E.; Hristova, K.; Wood, I.; Mackay, D.M.; Lory, E.; Lorenzana, D.; Scow, K.M. (2004): Comparison of biostimulation versus bioaugmentation with bacterial strain PM1 for treatment of groundwater contaminated with methyl tertiary butyl ether (MTBE). *Environmental Health Perspectives* 113 (3), 317–322. DOI: 10.1289/ehp.6939.
- Speight, J.G. (2002): Handbook of petroleum product analysis. New York: Wiley-Interscience.
- Speight, J.G. (2014): The chemistry and technology of petroleum. 5 ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & francis Group (Chemical industries, a series of reference books and textbooks, 137).
- Stackebrandt, E.; Schumann, P.; Cui, X.L. (2004): Reclassification of *Cellulosimicrobium variabile* as *Isoptericola variabilis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 54 (Pt 3), 685–688. DOI: 10.1099/ijs.0.02878-0.
- Stanier RY. (1950): The bacterial oxidation of aromatic compounds. IV. Studies on the mechanism of enzymatic degradation of protocatechuic acid. *Journal of Bacteriology*, 59(4), 527–532.
- Straube, W. L.; Nestler, C. C.; Hansen, L. D.; Ringleberg, D.; Pritchard, P. H.; Jones-Meehan, J. (2003): Remediation of Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) through Landfarming with Biostimulation and Bioaugmentation. En: *Acta Biotechnol.* 23 (23), 179–196. DOI: 10.1002/abio.200390025.
- Strawinski R J.; Stone RW. (1954): Biological oxidation of naphthalene. *Canadian Journal of Microbiology*, 1 (3), 206–210.

- Stroud, J.L.; Paton, G.I.; Semple, K.T. (2007): Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: Implications for biodegradation and bioremediation. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1239–1253.
- Surendra S.V.; Mahalingam B.L.; Perumalsamy R.; Manickam V. (2017): Degradation of total petroleum hydrocarbon (TPH) in contaminated soil using *Bacillus pumilus* MVSV3. *Biocontrol Science*, 22 (1), 17-23.
- Syldatk, C.; Lang, S.; Wagner, F.; Wray, V.; Witte, L. (1985): Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas spec. DSM 2874* grown on n-alkanes. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C, Biosciences*, 40 (1-2), 51–60.
- Tauler, M.; Vila, J.; Nieto, J.M.; Grifoll, M. (2016): Key high molecular weight PAH-degrading bacteria in a soil consortium enriched using a sand-in-liquid microcosm system. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 100, 3321–3336.
- Thavasi, R.; Jayalakshmi, S.; Banat, I.M. (2011): Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource Technology*, 102 (2), 772–778. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.08.099.
- Thomas, J.M.; Ward, C. H. (1992): Subsurface microbial ecology and bioremediation. *Journal of Hazardous Materials*, 32 (2-3), 179–194. DOI: 10.1016/0304-3894(92)85091-E.
- Thomas, J.M.; Yordy, J.R.; Amador, J.A.; Alexander, M. (1986): Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds. *Applied & Environmental Microbiology* 52 (2), 290–296.
- Tirado-Torres, D.; Acevedo-Sandoval, O.; Rodríguez-Pastrana, B.R.; Gayosso-Canales, M. (2017): Phylogeny and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation potential of bacteria isolated from crude oil-contaminated site. *Journal of Environmental Science & Health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 52 (9), 897–904. DOI: 10.1080/10934529.2017.1316170.
- Tsao, C.W.; Song, H.G.; Bartha, R. (1998): Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil. *Applied Environmental Microbiology*, 64 (12), 4924–4929.
- Tyagi, M.; da Fonseca, M.R.; Carvalho, C. (2011): Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22 (2), 231–241. DOI: 10.1007/s10532-010-9394-4.
- Ulrich, A.C.; Edwards, E.A. (2003): Physiological and molecular characterization of anaerobic benzene-degrading mixed cultures. En: *Environ Microbiol* 5 (2), 92–102. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2003.00390.x.
- USEPA (1999): Use of monitored natural attenuation at Superfund, RCRA corrective action, and underground storage tank sites. *US. Environmental Protection Agency OSWER Directive 9200*, 4–17.

- USEPA (2001): A citizen's guide to monitored natural attenuation. *US Environmental Protection Agency*.
- Van Beilen, J.B.; Li, Z.; Duetz, W.A.; Smits, T.H.M.; Witholt, B. (2003): Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Science & Technology - Rev. IFP* 58 (4), 427–440. DOI: 10.2516/ogst:2003026.
- Van Beilen, J.B.; Wubbolts, M.G.; Witholt, B. (1994): Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation*, 5 (3-4), 161–174.
- Van Dyke, M.I.; Couture, P.; Brauer, M.; Lee, H.; Trevors, J.T. (1993): *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants. Structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 39 (11), 1071–1078. DOI: 10.1139/m93-162.
- Van Hamme, J.D.; Singh, A.; Ward, O.P. (2003): Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 67 (4), 503–549. DOI: 10.1128/MMBR.67.4.503-549.2003.
- Van Veen, J.A.; van Overbeek, L.S.; van Elsas, J.D. (1997): Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 61 (2), 121–135.
- Varjani, S.J. (2017): Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277–286.
- Varjani, S.J.; Upasani, V.N. (2016): Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource Technology*, 222, 195–201. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.10.006.
- Vidali, M. (2001): Bioremediation an overview. *Pure & Applied Chemistry*, 73 (7), 1163–1172.
- Vila, J.; Tauler, M.; Grifoll, M. (2015): Bacterial PAH degradation in marine and terrestrial habitats. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 95–102.
- Walter, V.; Syldatk, C.; Hausmann, R. (2010): Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 672, 1–13.
- Wang, Z.; Stout, S. (2010): Oil spill environmental forensics. Fingerprinting and source identification. Burlington, Ann Arbor, Michigan: Elsevier Science; ProQuest.
- Wells, P.G. (2001): Oil and seabirds--the imperative for preventing and reducing the continued illegal oiling of the seas by ships. *Marine Pollution Bulletin*, 42 (4), 251–252.
- Wiese, F.; Robertson, G. (2004). Assessing seabird mortality from chronic oil discharges at sea. *The Journal of Wildlife Management*, 68(3), 627-638. www.jstor.org/stable/3803396
- Whitfield, J. (2003): Oil spills. How to clean a beach. *Nature* 422 (6931), 464–466. DOI: 10.1038/422464a.

- Whittaker, M.; Pollard, S.J.; Ridsen, G. (1999): The fate of heavy oil wastes in soil microcosms. II. A performance assessment of source correlation indices. *The Science of the Total Environment*, 226 (1), 23–34.
- Whittinghill, D.C. (1998): A note on the robustness of Box-Behnken designs to the unavailability of data. *Metrika* 48 (1), 49–52. DOI: 10.1007/PL00003971.
- Whyte, L.G.; Bourbonnière, L.; Greer, C.W. (1997): Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. *Applied & Environmental Microbiology*, 63 (9), 3719–3723.
- Widdel, F.; Rabus, R. (2001): Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 12 (3), 259–276.
- Williams, P.; Cámara, M. (2009): Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*. A tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 12 (2), 182–191. DOI: 10.1016/j.mib.2009.01.005.
- Wolicka, D.; Suszek, A.; Borkowski, A.; Bielecka, A. (2009): Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. *Bioresource Technology*, 100 (13), 3221–3227. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.02.020.
- Wolf, D.C.; Gan, J. (2018) Influence of rhamnolipid biosurfactant and Brij-35 synthetic surfactant on ¹⁴C-Pyrene mineralization in soil. *Environmental Pollution*, 243, 1846–1853.
- Wu, M.; Chen, L.; Tian, Y.; Ding, Y.; Dick, W.A. (2013): Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. *Environmental Pollution*, 178, 152–158. DOI: 10.1016/j.envpol.2013.03.004.
- www.bacterio.net/ochrobactrum.html: LPSN, List of Prokaryotic names with standing in nomenclature.
- www.eucast.org/: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
- www.opsur.org.ar: Petróleo y medioambiente, el caso de Argentina.
- www.petroleomagdalena.com.
- www.support.minitab.com: Minitab: data analysis, statistical & process improvement tools.
- Xie, F.; Ma, H.; Quan, S.; Liu, D.; Chen, G.; Chao, Y.; Qian, S. (2014): *Pseudomonas kunmingensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from a phosphate mine. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* 64 (Pt 2), 559–564. DOI: 10.1099/ijss.0.055632-0.
- Youssef, N.H.; Duncan, K.E.; Nagle, D.P.; Savage, K.N.; Knapp, R.; McInerney, M.J. (2004): Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 56 (3), 339–347. DOI: 10.1016/j.mimet.2003.11.001.

- Yuan, Y.; Hu, Y.; Chenxing, H.; Jiayi, L.; Honglei, C.; Xuesong, Z. (2015): Overexpression and characterization of a glycoside hydrolase family 1 enzyme from *Cellulosimicrobium cellulans* sp. 21 and its application for minor ginsenosides production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 120, 60–67. DOI: 10.1016/j.molcatb.2015.06.015.
- Zhang, Y.; Miller, R.M. (1994): Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Applied & Environmental Microbiology*, 60 (6), 2101–2106.
- Zobell C.E. (1946): Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriological Reviews* 10, 1–49.
- Zucchi, M.; Angiolini, L.; Borin, S.; Brusetti, L.; Dietrich, N.; Gigliotti, C. (2003): Response of bacterial community during bioremediation of an oil-polluted soil. *Journal of Applied Microbiology*, 94 (2), 248–257. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01826.x.

Los resultados presentados en esta tesis han dado lugar a los siguientes trabajos científicos:

– ***Publicaciones en revistas científicas***

Development of bioremediation strategies based on the improvement of biomass production from isolated strains in hydrocarbon contaminated soils and their application in bioremediation technologies. Conde Molina D., Liporace F., Quevedo C. Brazilian Journal of Development., v. 5, n. 7, p. 10708-10727, jul. 2019. ISSN. 2525-8761.

Isolation of microorganisms from areas contaminated with hydrocarbons close to urbanized areas, for the application of biorremediation strategies. Liporace F, Conde Molina D, Quevedo C, Odobez S. Brazilian Journal of Development. v. 5, n. 6, p. 4660-4674, jun. 2019. ISSN 2525-8761.

Estudio de cepa autóctona aislada de suelos contaminados con hidrocarburos para su utilización en tecnologías de biorremediación. Conde Molina D, Liporace F, Quevedo C. Boletín 219 de la Asociación Argentina de Microbiología. Pag. 23:26. Febrero 2018.

Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Liporace F, Conde Molina D, Quevedo C. Boletín 218 de la Asociación Argentina de Microbiología. Pag. 22:26. Noviembre 2017.

– ***Conferencias orales en Congresos Científicos***

Estudio de cepas autóctonas de áreas crónicamente contaminadas con hidrocarburos para su aplicación en biorremediación. Conde Molina D, Liporace F, Vázquez S, Quevedo C. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Noviembre de 2015. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

– ***Presentaciones de poster a Congresos Científicos como autor***

Biodegradación de hidrocarburos por la acción de *Pseudomonas sp. MT1A3*, aislada de suelos crónicamente contaminados. Conde Molina D, Liporace F, Giuletti A, Quevedo

C. XI Simposio Nacional de Biotecnología. Septiembre 2017. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

Bioremediation strategies based on a native strain isolated from sites contaminated with hydrocarbons. Conde Molina D, Liporace F, Vázquez S, Merini L, Giuletti A, Quevedo C. 52th Annual Meeting Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology. Noviembre 2016. Córdoba, Argentina. Biocell 40 (Suppl. 1) 2016, pag. 78.

Evaluation of a native strain isolated from chronically hydrocarbon-contaminated sites. Conde Molina D, Liporace F., Giullieti AM, Quevedo C. 5th International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering. ISBN-978-607-9023-45-4. Julio 2016. Universidad Nacional de General San Martín, Buenos Aires, Argentina.

– *Presentaciones de poster a Congresos Científicos como co-autor*

Aislamiento de microorganismos a partir de áreas crónicamente contaminadas con hidrocarburos cercanas a zonas urbanizadas, para la aplicación de estrategias de biorremediación. Liporace F, Conde Molina D, Quevedo C, Odobez S. Sustentabilidad Urbana. 14^o Jornada Urbanare e 2^o Jornada Cires. Diciembre 2018. Victoria, Brasil. ISBN: 978- 989-20-8422-0

Optimización de bioprocesos integrados a partir de cepas aisladas de áreas crónicamente contaminadas con hidrocarburos para la obtención de biosurfactantes. Liporace F, Conde Molina D, Giuletti A, Quevedo C. Congreso de Ingeniería de Procesos y Productos 2016. Abril 2016. Rosario, Santa Fe, Argentina

Estimation of biosurfactant production by *Pseudomonas sp.* growing on three different substrates. Liporace F, Conde Molina D, Vázquez S, Giuletti A, Quevedo C. Congreso Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular. Noviembre 2015. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Biocell 39 (Suppl. 2) 2015.

Biosurfactant production for bioremediation through bioaugmentation: a native strain culture optimization". Liporace F, Conde Molina D, Giuletti A, Quevedo C. Ebc-vi. 6th European Bioremediation Conference. Julio 2015. Chania, Creta, Grecia.