



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**Facultad de Ciencias Exactas**  
**Departamento de Ciencias Biológicas**



Biblioteca Central  
Fac. Cs. Exactas  
U.N.L.P.

**ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y DINÁMICA DE LAS COMUNIDADES  
MICROBIANAS DEL SUELO DURANTE UN PROCESO DE  
BIORREMEDIACIÓN.**

**Efecto de la concentración de contaminante aplicado.**

**María Teresa Del Panno**

**Trabajo de Tesis**

**Año 2003**

*TESIS  
No. 1048*

<p>(043.2) TESIS 01048</p>	<p>Universidad Nacional de La Plata Facultad de Ciencias Exactas Biblioteca 50 y 115 1° subsuelo biblioteca@exactas.unlp.edu.ar Tel 0221 422-6977/79 int. 129</p>  <p>DEX-57154</p>
------------------------------------	--

*B-09-04*

*57154*

**Lugar de Trabajo:**

**LABORATORIO DE BIODEGRADACIÓN MICROBIOLÓGICA DE  
HIDROCARBUROS – LBMH**

**Facultad de Ciencias Exactas – UNLP**

TESIS  
No 1048

**Directora de Tesis:**

**Dra. María Teresa Panceira**

DONACION .....

Fecha 13-09-04

Inv. S.....

S7154

*A mis padres,  
A Rober, Marti y Carito  
A Mary*

## **Agradecimientos**

A la Facultad de Ciencias Exactas por la posibilidad que me brindó.

A la UNLP por haberme otorgado una beca de Formación Superior, que posibilitó la realización de una parte experimental de este trabajo.

A la Dra. María Teresa Paineira por su apoyo permanente, muy especialmente en esta última etapa.

A la Dra. Morelli, Irma, compañera desde los inicios y en los más diversos desafíos por los que ha pasado y pasará el LBMH. Por su constante aliento en mi trabajo y el optimismo y empuje de cada día.

A Moni, por su cariño de tantos años y a Oscar por los momentos compartidos.

A la Dra. Graciela Vecchioli, por su guía en mi formación científica.

A Pablo, por sus dedicadas charlas sobre el crecimiento de los microorganismos y demás yerbas.

A Marisa, Jessica y Ayelén por su colaboración en las determinaciones realizadas durante este trabajo.

A Pato, por su constante predisposición a solucionar inconvenientes.

A Lilly, por la lectura crítica de este manuscrito.

Al Dr. Bert Engelen, por su colaboración en la realización de la técnica de PCR-DGGE.

A la Dra. De Antoni y mis compañeros de la Cátedra por haberme permitido tomarme el tiempo para la escritura final de este trabajo.

A la Dra. Alicia Califano del CIDCA y a la Lic. María Inés Urrutia del CESPI, por el asesoramiento en el análisis estadístico de los resultados.

A Graciela Valle del CINDECA, por la realización de las determinaciones en el espectrómetro Infra-rojo. A Norma y Mauricia del LASEISIC, por la realización de las determinaciones cromatográficas.

A SECYT (Argentina) y BMBF (Alemania) por haber financiado los intercambios que me permitieron realizar algunas de las metodologías aplicadas en este trabajo.

A mis padres, que siempre confiaron en mí.

A Rober, Marti y Carito que cada día al cerrar la compu me dijeron vamos má, *un esfuerzo más y terminamos la tesis*. Creo que ahora tendrán que cambiar el mensaje en mi computadora.

A Mary Abi Cecotti, que estuvo siempre al frente con todo. Mil Gracias Mary !!!

**INDICE**

<b>I</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>4</b>
<b>I.1</b>	<b>LA CONTAMINACIÓN DEL SUELO CON HIDROCARBUROS</b>	<b>4</b>
<b>I.2</b>	<b>LA BIORREMEDIACIÓN DE RESIDUOS Y SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS.</b>	<b>6</b>
	El rol de la comunidad microbiana en la biorremediación.	9
<b>I.3</b>	<b>EL SUELO</b>	<b>11</b>
I.3.1	Las comunidades microbianas	14
I.3.2	Interacciones entre poblaciones microbianas de la comunidad	16
I.3.3	Diversidad y estabilidad de las comunidades microbianas	17
I.3.4	Selección de poblaciones dentro de la comunidad	19
<b>I.4</b>	<b>ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE LAS POBLACIONES EN EL ECOSISTEMA DE SUELO.</b>	<b>21</b>
<b>I.5</b>	<b>METODOLOGÍAS APLICADAS AL ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES DEL SUELO.</b>	<b>22</b>
I.5.1	Estrategia basada en el aislamiento y cultivo de microorganismos puros.	22
I.5.2	Estrategia basada en análisis directo de la comunidad microbiana.	24
<b>II</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>36</b>
	<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>36</b>
<b>III</b>	<b>MATERIALES Y METODOLOGIA</b>	<b>37</b>
<b>III.1</b>	<b>MATERIALES</b>	<b>37</b>
III.1.1	Tierra	37
III.1.2	Residuos	37
III.1.3	Residuo API	38
III.1.4	Residuo PAR	38
III.1.5	Medios de cultivo y soluciones	39
<b>III.2</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>42</b>
III.2.1	Preparación de los sistemas tierra-residuo.	42
III.2.2	Monitoreo de la evolución de los sistemas tierra-residuo.	42
III.2.3	Métodos analíticos	42
III.2.4	Métodos microbiológicos	44
III.2.5	Métodos moleculares	49
<b>IV</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN: ANÁLISIS DEL RESIDUO PETROQUIMICO</b>	<b>54</b>
<b>IV.1</b>	<b>DESCRIPCIÓN DEL RESIDUO: ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS</b>	<b>54</b>

<b>IV.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL RESIDUO</b>	<b>55</b>
IV.2.1 Determinación de las poblaciones microbianas en el residuo API.	56
IV.2.2 Análisis de la comunidad bacteriana del residuo API mediante el aislamiento e identificación de los cultivos predominantes.	58
IV.2.3 Caracterización de los cultivos dominantes de la población BH y BDHC.	58
IV.2.4 Determinación del espectro degradador de hidrocarburos de los cultivos aislados del residuo.	66
<b>V RESULTADOS Y DISCUSIÓN – DINAMICA DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN</b>	<b>71</b>
<b>V.1 ELIMINACIÓN DEL CONTAMINANTE Y SU RELACIÓN CON LA DINÁMICA DE LAS POBLACIONES DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN.</b>	<b>71</b>
V.1.2 Eliminación del contaminante durante el proceso de biorremediación.	71
V.1.2 Efecto de la concentración del residuo API sobre la dinámica de las poblaciones microbianas cultivables durante el proceso de biorremediación.	83
<b>V.2 ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS FUNCIONALES DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN.</b>	<b>99</b>
V.2.1 Efecto de la concentración del residuo API sobre la actividad enzimática de la comunidad durante el proceso de biorremediación.	99
V.2.2 Estimación del efecto tóxico producido por el residuo durante el tratamiento sobre la comunidad microbiana del suelo.	108
<b>V.3 DESCRIPCIÓN DE LA DINÁMICA DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS MEDIANTE EL AJUSTE A MODELOS MATEMÁTICOS.</b>	<b>116</b>
V.3.1 Aplicación del modelo de Gompertz	116
V.3.2 Influencia de la concentración inicial del residuo sobre la velocidad específica de crecimiento de las poblaciones bacterianas.	123
V.3.3 Influencia de la concentración inicial del contaminante sobre la cosecha máxima de las poblaciones bacterianas.	124
V.3.4 Influencia de la concentración inicial del contaminante sobre la velocidad de decrecimiento de las poblaciones bacterianas.	125
V.3.5 Aplicación del modelo logístico de Andrews	127
V.3.6 Aplicación del modelo de Monod	135
V.3.7 Estimación del efecto de inhibición del residuo sobre la velocidad específica de crecimiento.	139
V.3.8 Modelos que relacionan la eliminación de un sustrato con el crecimiento de las poblaciones.	140
V.3.9 Aplicación de los modelos que relacionan la cinética de eliminación de un sustrato con el crecimiento, en un sistema simple.	144
V.3.10 Evaluación de la posibilidad de extensión del marco de validez de los modelos en sistemas complejos.	149
<b>VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN: CAMBIO EN LA ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN.</b>	<b>155</b>

---

<b>VI.1 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL RESIDUO API SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN.</b>	<b>155</b>
VI.1.1 Estrategia basada en el aislamiento e identificación de los microorganismos predominantes.	156
VI.1.2 Estrategia basada en el análisis directo de la comunidad microbiana.	201
<b>VII CONCLUSIONES</b>	<b>211</b>
<b>VIII BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>218</b>

**CAPÍTULO I**

**INTRODUCCIÓN**

---

## **I INTRODUCCION**

### **I.1 LA CONTAMINACIÓN DEL SUELO CON HIDROCARBUROS**

La contaminación del habitat con hidrocarburos es principalmente originada por la industria del petróleo y aquellas que utilizan sus derivados, constituyendo más del 50% de la contaminación mundial (Schink, 1999).

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos que contiene desde metano (el gas natural) hasta moléculas de alto peso molecular y compuestos orgánicos azufrados y nitrogenados. La composición de petróleo varía según la región de origen (Bartha, 1983).

La producción, el transporte y el almacenamiento del petróleo inevitablemente involucran el riesgo de derrames accidentales que pueden ser minimizados, aunque no eliminados totalmente.

En especial, los derrames en superficies de agua son los accidentes que llaman más la atención de los medios de comunicación, debido a la dificultad de contenerlos y el consecuente espectacular impacto producido por las extendidas manchas de petróleo que causan graves daños en las playas, reservas naturales e industria pesquera.

En la mayoría de los casos, la contaminación por crudo y sus derivados en tierra se debe a defectos de diseño, mantenimiento y gestión. Generalmente, los derrames accidentales en tierra pueden ser ocasionados por pinchaduras de tuberías que transportan el producto, o bien por el vuelco de camiones o vagones de ferrocarril. Si el almacenamiento en tanques no es realizado con una adecuada contención, también constituye un foco de contaminación debido al percolado que puede producirse hacia las capas profundas del suelo.

En los ambientes terrestres la distribución lateral del derrame es relativamente controlable y en consecuencia el daño ecológico es localizado y limitado.

La contaminación comienza en la superficie del suelo donde parte es volatilizada contaminando el aire. Paralelamente, el contaminante dependiendo de su naturaleza química y concentración, puede interactuar con los constituyentes del suelo y/o percolar hacia las capas profundas alcanzando la napa de agua subterránea.

Según su densidad puede flotar en la superficie de la napa y así ser transportado más allá del punto de contaminación, mientras una fracción puede ser disuelta en mayor o menor grado en el agua y otra, semejante al alquitrán, puede precipitar o migrar lentamente (Bossert y Bartha, 1984).

Otra fuente importante de contaminación con hidrocarburos es la ocasionada por los residuos generados durante la extracción del petróleo, como aguas residuales y barros empetroados, que se almacenan en piletas próximas al sitio de extracción.

En las diferentes etapas de su industrialización, principalmente en el tratamiento de los efluentes de las refinerías, durante su almacenamiento en tanques, en las operaciones de limpieza en planta, o luego de un derrame accidental, se generan barros conteniendo una mezcla de hidrocarburos y derivados. Estos barros son generalmente acumulados dentro del predio industrial hasta decidir sobre su tratamiento o disposición final.

Frecuentemente, factores tecnológicos y económicos dificultan a las industrias el proceso de la reducción del contenido de hidrocarburos de los barros residuales, de acuerdo con lo exigido por los organismos de control.

A partir de la década de '70, los países más avanzados establecieron el marco regulatorio para la disposición de los residuos peligrosos y la limpieza de sitios contaminados por los compuestos químicos (Bartha y Bossert, 1984).

En nuestro país, a partir de la década del '90 comenzaron a tomar notoriedad los problemas causados por la generación de residuos.

En 1992 se promulga la Ley Nacional 24.051/92 de residuos peligrosos y su decreto Reglamentario 831/93. En ella se fijan los valores de contaminantes permitidos en tierra de uso agrícola, residencial e industrial.

El 3 de julio de 2002 se sanciona la Ley Nacional 25.612 de gestión de residuos industriales, cuyo decreto Reglamentario se encuentra en etapa de elaboración.

La nueva Ley Nacional 25.612 de gestión de residuos industriales define un amplio concepto de residuo industrial como: *"cualquier elemento, sustancia u objeto en estado sólido, semisólido, líquido o gas, resultado de un proceso industrial por la realización de actividades de servicio o por estar relacionado directa o indirectamente con la actividad, incluyendo eventuales emergencias o accidentes"*.

La composición de los barros generados por las industrias petroleras y petroquímicas es sumamente compleja, considerando la complejidad del petróleo o sus derivados utilizados en la producción.

Si se conocen las materias primas y el proceso por el cual se genera el residuo se puede obtener información inmediata que permite predecir cuales serán los constituyentes predominantes. De lo contrario existen guías para la caracterización de residuos industriales (Sims y col., 1990).

Los barros generados en una refinería pueden contener desde un 30-50% de hidrocarburos (barros de fondo de tanques de almacenamiento) hasta un 5-10% (barros de tratamientos biológicos). Los hidrocarburos presentes en estos barros son una mezcla de compuestos biodegradables y otros menos biodegradables (Bartha y Bossert, 1984).

Cuando el petróleo, sus derivados o los barros residuales entran en contacto con un sistema tan heterogéneo como es el suelo (en comparación con el ambiente acuático) pueden darse diferentes respuestas, dependiendo de la naturaleza del contaminante.

Generalmente, la biomasa microbiana del suelo puede degradar fácilmente los hidrocarburos menos complejos a través de los ciclos biogeoquímicos de la materia; mientras que los hidrocarburos sustituidos y los de alto peso molecular suelen ser difícil o lentamente biodegradables (Bartha y Bossert, 1984).

Los componentes minerales son considerablemente más abundantes en el suelo que en ambiente acuático, y la capacidad de adsorción de las arcillas y absorción de la materia orgánica mitigan los efectos tóxicos de los compuestos del petróleo.

Debido a la extrema heterogeneidad del sistema de suelo pueden darse situaciones problemáticas en el momento de evaluar la contaminación y en los esfuerzos realizados para lograr la decontaminación (Atlas y Bartha, 1998).

Un mejor entendimiento y eventual control de los procesos microbianos involucrados en la biodegradación de los contaminantes permitirá contribuir a la resolución de los diferentes problemas que genera la contaminación ambiental.

## **I.2 LA BIORREMEDIACIÓN DE RESIDUOS Y SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS.**

La biorremediación es una tecnología aplicable a la limpieza de ambientes contaminados, de relativo bajo costo y que ha ganado gran aceptación en los últimos tiempos en la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos (Margesin y Schinner, 2001).

La biorremediación se fundamenta en el aprovechamiento e incentivación de los procesos de biodegradación natural del suelo para transformar y degradar contaminantes orgánicos (Vecchioli, 1998).

El objetivo consiste en reducir el potencial tóxico de los contaminantes químicos en el ambiente mediante el uso de los microorganismos, plantas y animales para transformar, metabolizar, remover o inmovilizar tóxicos (Ritter y Scarborough, 1995).

Generalmente, los sistemas microbianos son los más ampliamente utilizados en los programas de biorremediación para el tratamiento de suelos y aguas contaminadas con compuestos orgánicos. Los microorganismos poseen una gran diversidad metabólica que los capacita para degradar una enorme variedad de compuestos orgánicos. A través de los ciclos biogeoquímicos de la materia, los microorganismos del suelo pueden detoxificar muchos de los

residuos industriales generados por la actividad de la sociedad humana, permitiendo el uso del suelo para el desarrollo de las tecnologías de biorremediación ( Rölíng y col., 2002).

En otras palabras, la biorremediación podría definirse como una biodegradación asistida y controlada que provee una solución definitiva. Así se diferencia de otras tecnologías que solo proveen una solución temporal mediante el aislamiento y la contención del contaminante (Crawford, 2002; [www.hawaii.edu/abrp/biotech.html](http://www.hawaii.edu/abrp/biotech.html)).

Una de las ventajas más atractivas de esta tecnología es la posibilidad de tratar el contaminante *in situ*, es decir en su lugar original. De esta forma la biorremediación *in situ* permite remediar un sitio contaminado sin transportar el contaminante y produciendo una mínima alteración en el lugar.

Los microorganismos ofrecen la posibilidad de que el contaminante orgánico pueda ser completamente mineralizado a materiales inorgánicos ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ). De esta manera la biorremediación logra idealmente la mineralización del contaminante (Zeyer and col., 1995). En los ambientes naturales sin embargo, la biotransformación de compuestos orgánicos es el proceso que ocurre más frecuentemente. Dicho proceso implica la alteración química de la molécula, pudiendo afectar su toxicidad y movilidad (Cerniglia, 1992).

En términos generales, el enfoque de la biorremediación consiste en una modificación ambiental que incentiva la capacidad degradadora intrínseca de los microorganismos del suelo. Se han desarrollado diferentes estrategias que incentivan la capacidad degradadora natural del suelo. Una de ellas consiste en modificar las condiciones ambientales de forma tal que se favorezca el metabolismo degradativo de la comunidad indígena del sitio. Esta estrategia es denominada Bioestimulación.

Generalmente suele ser crítico el aporte de oxígeno que se logra a través del arado, asegurando las condiciones aeróbicas. Esta condición es particularmente importante en el caso de la degradación de los hidrocarburos del petróleo, que solo son rápidamente degradados en condiciones aeróbicas, mientras que los derivados halogenados (PCBs) requieren condiciones secuenciales de anaerobiosis y aerobiosis para lograr la máxima biodegradación (Mc Cue y Randall, 2003).

Además de una adecuada aireación, también suele ser necesario el aporte de nutrientes minerales como nitrógeno y fósforo para lograr el adecuado desarrollo de los microorganismos a partir de la fuente de carbono que constituye el contaminante (Margesin y Schinner, 2001).

En situaciones donde la comunidad microbiana indígena del suelo no es capaz de degradar el contaminante aún en condiciones ambientalmente favorables, es posible agregar microorganismos con capacidades metabólicas específicas.

La estrategia que utiliza la inoculación de microorganismos para aumentar la eficacia de la biorremediación se denomina Bioaumento y la finalidad es incrementar la velocidad de

degradación o bien la velocidad y el espectro de degradación de los diferentes sustratos presentes en la mezcla compleja contaminante (Kästner y col., 1998).

La fitorremediación es otra estrategia de reciente aplicación en la decontaminación de suelos. Utiliza plantas y/o la rizosfera asociada a la planta para mejorar la velocidad de degradación de hidrocarburos.

La mayor eficacia lograda en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) ha sido atribuida al efecto estimulante de la rizosfera sobre la disipación del contaminante. Durante el proceso, la planta induce la movilización del contaminante en suelo, llevando a su acumulación (bajo una forma más biodisponible) en zonas próximas a las raíces y a la seudosolubilización de hidrocarburos policíclicos aromáticos por los compuestos orgánicos derivados de la planta. De esta manera permitiría la formación de habitats favorables para la actividad de los microorganismos degradadores (Ortega-Calvo y col., 2003).

Generalmente, la biorremediación se aplica con la intención de reducir la concentración de hidrocarburos a niveles aceptables por la legislación vigente o valores estándares de limpieza de suelo. De esta forma, el impacto provocado por el contaminante a corto o largo plazo y el producido por la estrategia de biorremediación aplicada, son de especial interés tanto para las industrias generadoras de la contaminación como para los organismos legislativos (Saterbak y col., 2000).

Numerosos trabajos afirman que la biorremediación ha sido satisfactoriamente aplicada en el tratamiento de sitios contaminados con creosota (sustancia utilizada como preservante de la madera), petróleo y otros combustibles (Song y col. 1990; Mueller y col., 1991; Saterbak y col. 2000; Margesin y Schinner, 2001).

En los últimos años ha adquirido importancia en el manejo de residuos peligrosos como los bifenilos policlorados (PCB) (Frederick y col., 2001), compuestos halogenados (Travis y Rosenberg, 1997; Mitchell y Fox, 2002), BTEX (Deeb y col., 2000) y los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) (Vecchioli y col, 2000).

En nuestro país existen varias plantas habilitadas para el tratamiento de residuos industriales, especialmente los generados por las industrias petroleras y petroquímicas.

Debido a que la biorremediación es una tecnología de reciente aplicación y que su eficiencia depende de numerosos factores de cuya interacción se conoce muy poco, debe reconocerse que a diferencia de otras tecnologías todavía no cuenta con procedimientos estandarizados para su aplicación / implementación / seguimiento y cierre.

Aunque son posibles diferentes mecanismos de eliminación de los hidrocarburos, el proceso debe operarse de forma tal que el mecanismo predominante sea la biodegradación.

Considerando que toda contaminación con hidrocarburos se caracteriza por la presencia de mezclas complejas de diferentes compuestos (algunos fácilmente degradables, mientras que

otros son recalcitrantes), la biorremediación presenta el desafío de tener que diseñar estrategias que permitan no solo hacer que la biodegradación sea el proceso de eliminación predominante, sino también acelerar la biodegradación de los compuestos más recalcitrantes (Vecchioli y col., 2000).

Un ejemplo de hidrocarburos de difícil degradación (degradabilidad intermedia) son los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH). Los PAH constituyen un grupo de contaminantes considerados prioritarios debido a sus propiedades tóxicas, mutagénicas y cancerígenas y a su persistencia en los ecosistemas (Brandt y col. 2002, Wattiau, 2002; Brautbar y Williams 2002 ).

### **EL ROL DE LA COMUNIDAD MICROBIANA EN LA BIORREMEDIACIÓN.**

Si bien los microorganismos juegan un rol esencial en los ciclos biogeoquímicos de la materia y son los primariamente estimulados en la biorremediación de un contaminante ambiental, el conocimiento actual de los cambios en las comunidades microbianas durante la biorremediación es limitado, y en consecuencia todavía la comunidad del suelo sigue siendo tratada como una "caja negra" (Head y col., 1997; Watanabe y Baker, 2000; Iwamoto y Nasu, 2001; Insam 2001).

Un aspecto práctico de esta concepción es expresar el potencial de biodegradación del sitio contaminado debido al consorcio microbiano, sin haber identificado las poblaciones involucradas en la degradación *in situ* durante el proceso de biorremediación (Bragg y col., 1994; Vecchioli y col., 2000;).

No obstante, la degradación microbiológica de los hidrocarburos es un proceso ampliamente estudiado. Actualmente existe una significativa base de conocimientos sobre las numerosas rutas y mecanismos para la degradación de compuestos orgánicos (Cerniglia, 1992; Knackmus, 1996; Chung y King, 2001; Dutka y Harayama, 2001).

Estos estudios generalmente se fundamentan en procesos bioquímicos y mecanismos moleculares involucrados en el catabolismo de un número relativamente bajo aunque intensivamente estudiado de compuestos, por un relativamente pequeño grupo de microorganismos que responden a las condiciones de cultivo establecidas en el laboratorio.

Existe un consenso general en que estos microorganismos cultivables representan una pequeña fracción, 1-10%, de las especies presentes en la naturaleza que responden favorablemente a una condición artificial de laboratorio (Torsvik y col., 1990; Amann y col., 1995). Aún hoy es todavía pequeña la fracción de la diversidad microbiana del suelo que ha sido identificada y todavía es menor la fracción que ha sido estudiada desde el punto de vista de su potencial degradativo (Convention on Biological Diversity, 2001).

Esta evidencia ha conducido a dos preguntas esenciales relacionadas a la implementación y evaluación de los resultados del proceso de biorremediación (Iwamoto y Nasu, 2001):

¿Cómo es posible establecer la contribución biológica a la efectividad de la biorremediación? y

¿Cómo es posible evaluar el impacto ambiental de la biorremediación?

Los estudios que habrían de implementarse con la intención de estimar la contribución biológica al proceso y el impacto generado en el suelo se enfrentarían con la dificultad del análisis de la estructura y la función de las comunidades directamente relacionadas con la degradación del contaminante en el ambiente.

Considerando que una comunidad microbiana es una unidad funcional caracterizada por las propiedades metabólicas de las poblaciones bacterianas que la conforman, entonces la actividad degradadora potencial de un suelo sería el resultado de la composición cualitativa (biodiversidad) y cuantitativa (abundancia de cada población) de su comunidad microbiana (Wünsche y col., 1995).

Dependiendo de la medida en que puedan ser abordados estos estudios, los resultados permitirán identificar la causa y medidas a seguir en el caso de una biorremediación fallida desde el punto de vista microbiológico. También permitirán evaluar la efectividad de la biorremediación y aportarán en mayor o menor medida datos necesarios para determinar el punto final del tratamiento (White y col., 1998).

Una forma de analizar la eficacia del proceso es mediante la descripción de la eliminación del contaminante en suelo aplicando modelos matemáticos (Song y Bartha, 1990; Loher y col., 1992).

En la biorremediación de mezclas complejas de hidrocarburos son aplicables modelos cinéticos en dos etapas, que describen la eliminación de la fracción degradable seguida de la lenta eliminación de la fracción difícilmente degradable (Vecchioli, 1998).

Con la intención de evaluar la contribución biológica al proceso, podrían ser aplicados modelos matemáticos que tengan en cuenta diversos factores como la evolución de la actividad biológica y/o de la densidad de población microbiana, la eliminación de hidrocarburos y/o concentraciones de hidrocarburos residuales.

A partir de su análisis, aplicado bajo las diferentes estrategias, se lograría una evaluación con mayor grado de acercamiento al proceso de biorremediación y posterior selección de aquellas que resulten más efectivas para alcanzar el punto final del tratamiento.

Generalmente, cuando se evalúa el impacto que los contaminantes pueden provocar en el medio ambiente, se consideran los efectos identificables sobre el espectro de animales y plantas. De esta forma se estarían ignorando los procesos ecológicos identificables que están bajo el control de las actividades metabólicas microbianas (Babich y col., 1981).

Los microorganismos se encuentran dinámicamente involucrados en los ciclos geoquímicos de la materia como en otras actividades homeostáticas para el mantenimiento de la calidad ambiental. Como otros segmentos de la biota, son sensibles a la contaminación y en

consecuencia la inhibición de la actividad microbiana trae aparejada la reducción de los procesos ecológicos bajo su control.

Los efectos deletéreos de los contaminantes sobre los microorganismos y sus actividades pueden ser considerados como una "injuria invisible" ya que posiblemente, los daños a este componente de la biosfera hayan permanecido ignorados por décadas (Babich y col., 1981; CBD, 2001).

A diferencia de la Ley Nacional 24.051/92 de residuos peligrosos, la nueva Ley Nacional introduce el criterio de preservación del medio ambiente, garantizando la protección de los recursos naturales, la calidad de vida de la población, la conservación de la biodiversidad y el equilibrio de los ecosistemas.

En este marco podría considerarse implícita la intención de conservar la diversidad microbiana del ambiente como un avance en tema de la evaluación del impacto sobre los efectos ecológicos microbianos identificables. De lo contrario, las agencias de regulación en el establecimiento de sus políticas ambientales estarían ignorando una vez más los daños que la contaminación produce a este componente de la biosfera.

Por todo lo anterior, la apertura de la "caja negra" de las comunidades del suelo resultaría un valioso aporte al entendimiento de la capacidad del suelo en mantener la barrera "buffer biológica" contra la polución y proveería las herramientas para el diseño de tratamientos que logren la decontaminación ambiental.

### **I.3 EL SUELO**

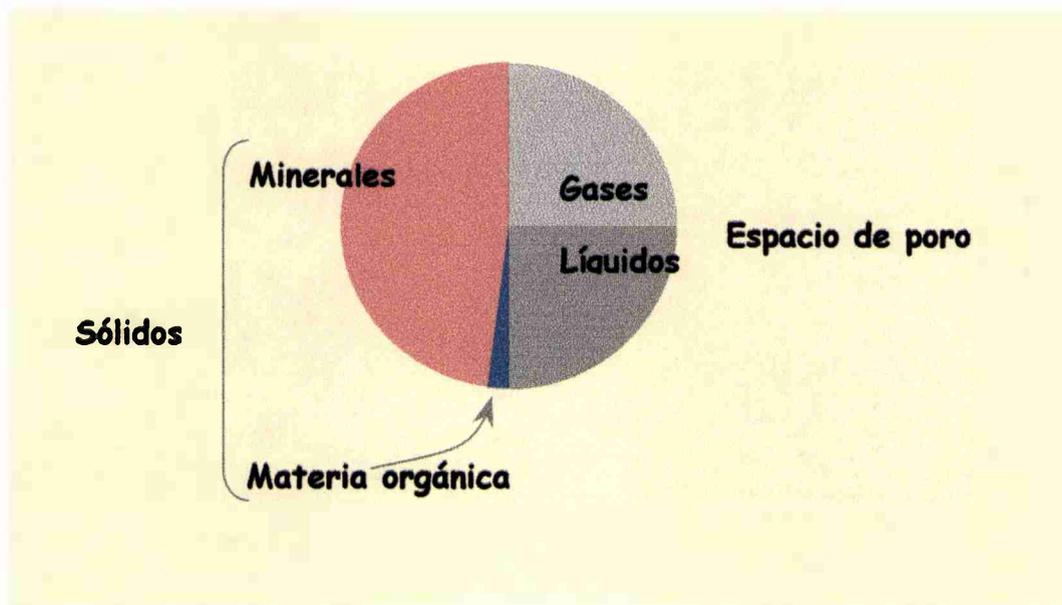
En agronomía se define suelo como la mezcla compleja de minerales, gases, líquidos, materia orgánica y organismos vivos que sustentan el crecimiento vegetal (Valencia y Peña, 2001).

En un suelo fértil "ideal" aproximadamente el 50% del espacio es poroso, la mitad está ocupada por gases y la otra mitad por líquidos, Figura I-1. Entre un 40-50% corresponde a sólidos minerales y un 0,5-5% es materia orgánica. (Valencia y Peña, 2001).

Los constituyentes minerales del suelo derivan generalmente de las rocas que se descomponen por la aclimatación y actividad biológica, como la penetración de las hifas fúngicas, raíces de las plantas y las excreciones ácidas.

Los principales constituyentes minerales son arena, limo y arcilla (definidos según el tamaño de sus partículas, de mayor a menor dimensión). La proporción de cada uno de ellos determinan la textura del suelo, siendo esta una propiedad importante para la ecología de los microorganismos debido a que describe la superficie disponible como habitat para el desarrollo

microbiano donde se adsorbe el agua y los nutrientes y se llevan a cabo las reacciones químicas para la vida del suelo (Valencia y Peña, 2001).



**Figura I-1:** Principales componentes de un suelo (Valencia y Peña, 2001).

Los constituyentes orgánicos del suelo son aportados por la descomposición de las plantas y tejidos de animales y microorganismos. Este material es lentamente convertido en una sustancia marrón oscura constituyendo el humus.

El material húmico del suelo se encuentra en un estado de equilibrio dinámico, su síntesis es compensada por la gradual mineralización del material existente (Schink, 1999).

El humus es producido primariamente por la actividad microbiana que degrada los polímeros orgánicos del suelo a compuestos monoméricos como fenoles, quinonas, aminoácidos y azúcares. La subsecuente polimerización de estas sustancias mediante reacciones químicas espontáneas, autooxidación y oxidaciones catalizadas por enzimas microbianas como lacasas, polifenoloxidasas y peroxidasas rinden polímeros de alto peso molecular conteniendo anillos aromáticos en sus moléculas. A estos anillos aromáticos pueden unirse covalentemente moléculas de hidratos de carbono y aminoácidos. Mediante adsorción, los compuestos alifáticos y aromáticos también pueden contribuir sustancialmente al material húmico, (Schink, 1999).

El predominio de grupos funcionales aniónicos respecto de los catiónicos le confiere excelentes propiedades como intercambiador catiónico.

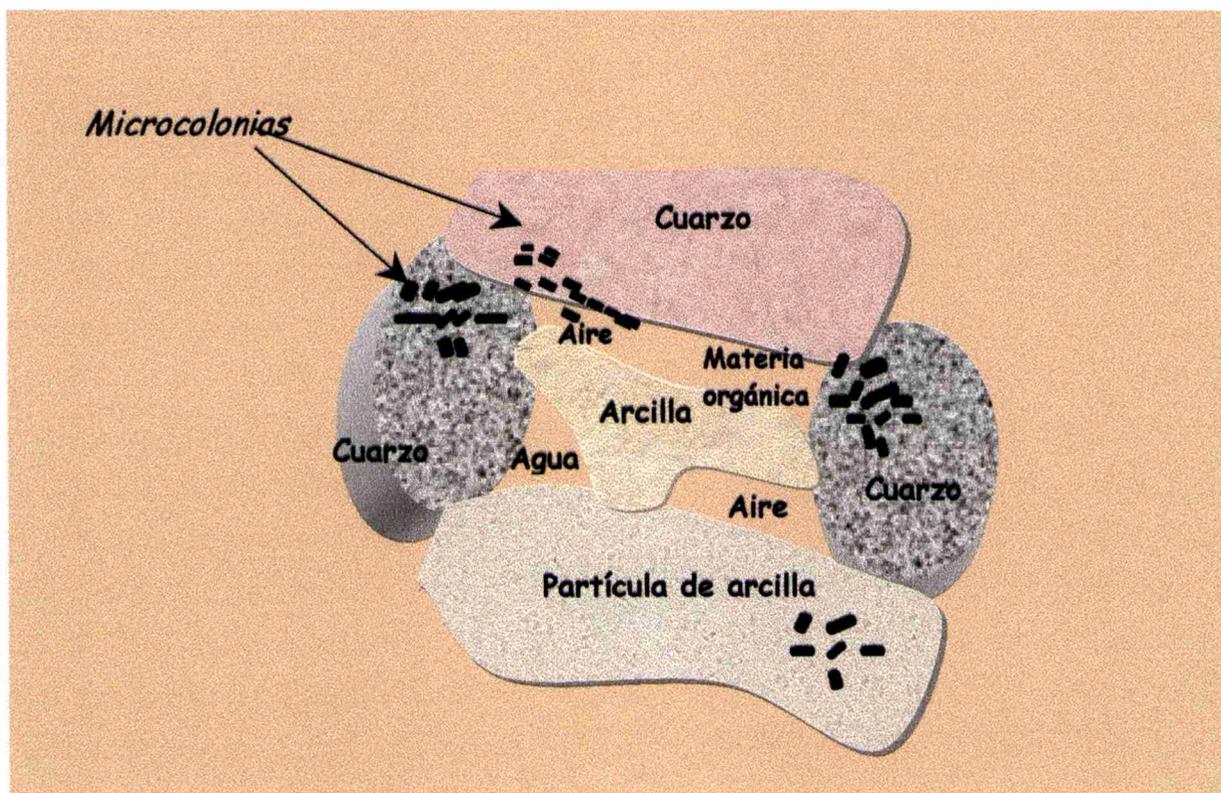
El material orgánico también contiene biomasa microbiana viva, extensas hifas de hongos y bacterias.

En un suelo de calidad agrícola los microorganismos representan el 80% de la biomasa viva, con una proporción semejante de bacterias- actinomicetes y hongos- algas.

La Figura I-2 muestra de manera esquemática la organización de los diferentes constituyentes de un suelo tipo.

Las interfases sólido-líquido y líquido-gas son los sitios donde preferentemente viven los microorganismos. En estas interfases pueden formarse gradientes de nutrientes, gases y pH ya sea en el interior de los microporos colonizados o entre microporos contiguos (Brock y Madigan, 1998).

De esta manera se forman innumerables microambientes que ofrecen distintos nichos ecológicos.



**Figura I-2:** Interfaces sólido-líquido y líquido-gas en un agregado de suelo (Brock y Madigan, 1998).

Los suelos son el producto de las interacciones de procesos abióticos, incluyendo la aclimatación física y química, regímenes de temperatura, hidrología y de procesos bióticos como son la producción de materia orgánica mediante fotosíntesis, retención de agua y nutrientes por las plantas y el eventual retorno de esta materia orgánica al suelo a través de la descomposición.

La biota del suelo es muy importante en la regulación de la captura de nutrientes por las plantas y la liberación de la materia orgánica durante el proceso de descomposición.

Al ser una biomasa viva, responde mucho más rápido a las condiciones cambiantes del suelo, particularmente al descenso o aumento del contenido en residuos vegetal o animal, que la materia orgánica como un todo (Brookes, 2001).

La microbiota, especialmente, es un importante contribuyente en la formación de los agregados estables del suelo mientras que los miembros de mayor tamaño (lombrices, termitas y hormigas) cumplen un importante rol en la porosidad del suelo y la infiltración del agua.

Tanto en los sistemas acuáticos como terrestres, los microorganismos organizados en comunidades desempeñan un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos de la materia y otras actividades homeostáticas fundamentales para el mantenimiento de la calidad ambiental (Lovley, 1991; Siciliano y col., 2000).

De esta manera las funciones de las comunidades microbianas del suelo están dirigidas hacia los procesos de descomposición y ciclo de los nutrientes, afectando el crecimiento de plantas y la productividad así como el comportamiento de los contaminantes en el ambiente.

Además, las comunidades microbianas también intervienen en los procesos de reducción o eliminación de constituyentes ambientalmente peligrosos, resultantes de la acumulación de compuestos químicos tóxicos y otros compuestos peligrosos generados por la actividad antropogénica.

### **1.3.1 LAS COMUNIDADES MICROBIANAS**

La comunidad es la mayor unidad biológica en una jerarquía ecológica conformada por individuos y poblaciones (Atlas y Bartha, 1998).

Una comunidad microbiana es un conjunto integrado de poblaciones microbianas que están presentes e interactúan dentro de un determinado lugar llamado hábitat (Hurst, 2002).

Un término sinónimo de comunidad microbiana pero no tan comúnmente utilizado es biocenosis (Hurst, 2002).

El término *consorcio* se aplica a un conjunto de microorganismos más directamente relacionados, es decir que tienen una relación funcional común. Los miembros de esta asociación comparten sus recursos, por ejemplo contribuyendo cada uno con sus enzimas para completar una ruta metabólica (Schink, 1999).

Cada población, como miembro de la comunidad, cumple un rol funcional específico denominado *nicho*. Esta palabra describe de algún modo la interacción y adaptación de la población indígena a las condiciones bióticas y abióticas encontradas en el sitio.

Dentro de una comunidad, las poblaciones compiten para ocupar los nichos disponibles, logrando de esta manera su establecimiento.

En algunas situaciones, los primeros organismos que colonizan un área tienen una ventaja selectiva y pueden retener un nicho frente a los competidores, dentro de la comunidad. En otros casos existe una sucesión de poblaciones donde las mejores adaptadas desplazan a las que originalmente ocuparon el nicho (Hurst, 2002).

Las poblaciones indígenas que conforman la comunidad regulan la densidad o biomasa de las especies componentes, evitando el establecimiento de las especies invasoras.

El concepto de comunidad estable no implica condiciones estáticas. Por ejemplo, un nicho metabólico puede estar ocupado por una población mesófila durante la estación del verano y al llegar el invierno ese nicho puede ser ocupado por una población psicrófila, pero la función metabólica, que puede ser vital para el ecosistema, se realiza en ambas situaciones (Atlas, 1998).

Desde el punto de vista ambiental, la selección natural opera mediante un conjunto de propiedades particulares que fundamentan el proceso ecológico, conduciendo al establecimiento de la comunidad dominante.

Estas propiedades pueden ser bioquímicas, fisiológicas o morfológicas y son las determinantes del habitat y el nicho de las poblaciones que integran la comunidad.

Las interacciones bióticas determinan en gran parte la estabilidad de las comunidades microbianas, reflejando la homeostasis del sistema.

Desde el punto de vista de la ecología, la homeostasis es la capacidad de la comunidad microbiana de mantener su estabilidad e integridad en un ambiente sujeto a modificaciones bióticas y abióticas (Atlas y Bartha, 1998).

Los mecanismos de la homeostasis operan constantemente y no son apreciablemente alterados a menos que ocurra una gran perturbación en el sistema (Hurst, 2002).

Ocasionalmente, severos cambios ambientales como la presencia de contaminantes en un ecosistema acuático o terrestre, la aplicación de fungicidas en el suelo y plantas entre otros disturbios, pueden perturbar los controles homeostáticos del ecosistema desestabilizando severamente la comunidad existente, debiendo iniciarse un nuevo proceso sucesional (Atlas y Bartha, 1998).

Un caso particular que desafía las fuerzas de la homeostasis es la estrategia del Bioaumentación que introduce, por ejemplo, inoculantes bacterianos activamente degradadores de hidrocarburos con la intención de mejorar la biodegradación de un sitio contaminado.

Esta estrategia asume que las especies introducidas podrían integrarse y lograr, a través del establecimiento de una nueva comunidad, una mayor efectividad en la eliminación del contaminante (Alexander, 1994).

Sin embargo, la dinámica del sistema, conducida por las fuerzas de la homeostasis, evoluciona hacia el restablecimiento de la comunidad original. Estos microorganismos alóctonos son miembros transitorios de la comunidad indígena y en un determinado momento, mediante

interacciones antagonistas, serían removidos restaurándose la composición original de la comunidad del sistema (van Veen y col., 1997).

### ***1.3.2 INTERACCIONES ENTRE POBLACIONES MICROBIANAS DE LA COMUNIDAD***

Las poblaciones microbianas pueden interactuar de diferentes maneras en el ambiente. Estas interacciones pueden ser clasificadas como positivas o negativas, aunque en muchos casos es difícil categorizar sin ambigüedad las relaciones entre poblaciones de una comunidad (Atlas y Bartha, 1998).

Si la comunidad se encuentra antiguamente establecida probablemente las interacciones positivas entre los microorganismos autóctonos o indígenas sean las más desarrolladas, en comparación con las existentes en una comunidad recientemente establecida. Estas interacciones se basan en la combinación de capacidades físicas y metabólicas que mejoran el crecimiento y/o la sobrevivencia de las poblaciones, a través del consumo más eficiente de los recursos disponibles. De esta forma logran ocupar habitats que de otra manera no podrían ser habitados (Atlas y Bartha, 1998).

Las interacciones positivas se refieren al comensalismo, sinergismo y mutualismo mientras que las negativas se refieren a la competencia y al antagonismo. Así mismo en una relación puede darse una interacción que resulte positiva para un miembro pero negativa para el otro, como en la predación y en el parasitismo.

En las comunidades microbianas naturales complejas pueden darse todas estas interacciones entre las diferentes poblaciones que la integran.

Las relaciones entre los diferentes microorganismos pueden diferir en su extensión. Por ejemplo, el comensalismo se aplica a los casos de mínima cooperación entre miembros de la relación. Tal es el caso de bacterias aeróbicas y anaeróbicas que viven en un mismo habitat. El desarrollo de las bacterias aeróbicas produce el consumo de oxígeno creando las condiciones para el desarrollo de las anaeróbicas. De esta forma la población anaeróbica vive a expensas de la actividad de la población aeróbica, pero esta última no obtiene beneficios ni desventajas de la relación (Schink, 1999).

Una relación de sinergismo entre dos poblaciones indica que ambas se benefician, pero a diferencia del mutualismo, la asociación no es obligatoria. Es decir, ambas son capaces de sobrevivir en su ambiente natural.

En contraste con las interacciones positivas, la competencia representa una interacción negativa entre dos poblaciones. En este caso ambas poblaciones pueden desarrollar un tamaño máximo de población o una velocidad de crecimiento, menor al que desarrollarían en forma aislada (Caldwell y col., 2002).

La competencia ocurre cuando dos poblaciones utilizan el mismo recurso que es factor limitante del crecimiento. Por ejemplo, las fuentes de carbono, nitrógeno, fosfato, oxígeno, factores de crecimiento, etc. son recursos por los que las poblaciones microbianas pueden competir.

La competencia se fundamenta en la mayor velocidad de crecimiento que permite el desarrollo de una de las poblaciones bajo las condiciones ambientales del sitio (Stanier, 1996).

En condiciones donde no es posible el desarrollo, la competencia puede fundamentarse en la tolerancia y capacidad de sobrevivir en determinado ambiente (Atlas y Bartha, 1998).

Si las condiciones ambientales son constantes, la competencia lleva al establecimiento de la población dominante y a la exclusión del segundo competidor.

En la interacción antagónica una población produce un impacto negativo sobre la otra, por ejemplo modificando el hábitat al producir sustancias tóxicas como compuestos orgánicos de bajo peso molecular (alcoholes, ácidos grasos), antibióticos o alterando la concentración ambiental de compuestos inorgánicos ( $O_2$ ,  $NH_3$ ,  $SH_2$ ) (Atlas y Bartha, 1998).

Las interacciones negativas actúan como un mecanismo de autorregulación que limita la densidad de las poblaciones.

### **1.3.3 DIVERSIDAD Y ESTABILIDAD DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS**

No es factible describir todas las especies de invertebrados y microorganismos presentes en el suelo, simplemente son muchísimos.

La diversidad de las especies tiende a ser baja en ecosistemas controlados por factores físicos debido a que la adaptación al stress fisicoquímico es predominante y deja poco margen para la evolución de las interacciones entre las especies.

En situaciones donde el ambiente es influenciado por un fuerte factor unidireccional, dispondrá de una menor flexibilidad para mantener su estabilidad. En estos casos, las poblaciones adaptadas tienden a ser altamente especializadas (stenotolerantes) y las comunidades son dominadas por unas pocas poblaciones (baja diversidad de especies) (Atlas y Bartha, 1998).

Los desiertos en la Antártida son ejemplos de hábitats físicamente controlados donde la diversidad de especies es muy baja (Mac Cormack, 1999).

La diversidad de especies tiende a ser mayor en ecosistemas biológicamente controlados, donde la importancia de las interacciones entre poblaciones predomina sobre el stress abiótico. En estas comunidades, el ambiente fisicoquímico permite mayor adaptación entre especies, resultando una mayor riqueza de asociaciones.

Un ejemplo de estos hábitats es el suelo, donde la diversidad es normalmente alta. Contrariamente bajo condiciones de stress o disturbio, como podrían ser las provocadas por la presencia de un contaminante, la diversidad tiende a disminuir (Macnaughton y col, 1999).

Generalmente la *alta diversidad* de un sistema se asocia al término *estabilidad*, a pesar de no haber sido establecida una relación de causa-efecto entre diversidad y estabilidad.

Las definiciones que explican la estabilidad de un ecosistema no son muy precisas y en muchos casos se hace referencia a la medida de los parámetros que describen la función del sistema completo o bien la composición de la comunidad (Fernández y col., 1999).

En una comunidad con alta diversidad, es probable que ninguna población en particular sea completamente imprescindible, es decir que si dicha población es eliminada la estructura de la comunidad no se vería significativamente alterada. Es probable que ante la supresión de un microorganismo determinado en el ecosistema, otro pueda ocupar su lugar cumpliendo la misma función, en otras palabras, el mismo nicho ecológico. La redundancia de una función en particular es la que permite esta secuencia de reemplazos (Kirkby, 1999).

La estabilidad funcional que puede desarrollar la comunidad de un ecosistema no implica el establecimiento de una estructura de comunidad estable, sino que la estabilidad en la función puede ser consecuencia del desarrollo de una comunidad extremadamente dinámica (Fernández y col., 1999; Di Mattia y col., 2001)

En un caso extremo, un disturbio ambiental podría hacer desaparecer un nicho ecológico en particular, eliminando una especie clave para conservar el proceso.

Por lo tanto, sería crítico conocer cual es el límite de reducción de la diversidad que podría tolerar el ecosistema ante los cambios ambientales (Lawton y col., 1996; Atlas y Bartha, 1998).

Tanto desde el punto de vista de la redundancia como de las especies claves, todavía queda mucho por conocer y estudiar sobre la importancia de la biodiversidad en el mantenimiento de las numerosas y complejas interacciones entre los microorganismos del suelo y sus contribuciones a los ciclos biogeoquímicos (O'Donnell y Görres, 1999; Hurst, 2002)

Los argumentos ecológicos para la protección de la diversidad del suelo, de alguna manera también pueden considerarse argumentos "utilitarios", ya que requieren de la función general de la biota en la naturaleza (Kirkby, 1999).

Definir el adecuado nivel de protección de la biodiversidad que debería lograrse es una difícil cuestión científica (Atlas y Bartha, 1998). El desarrollo humano lleva en mayor o menor grado a la pérdida de la biodiversidad y al disturbio de los procesos ecológicos.

En países desarrollados como Australia en 1993, se inició un programa multidisciplinario con el objetivo de constituir un marco nacional para la conservación de la biodiversidad biológica y maximizar sus beneficios económicos, integrando a todas las agencias nacionales competentes. Algunos de los proyectos que se desarrollaron abarcaron el estudio de métodos

para el muestreo, caracterización y cuantificación de la biodiversidad en suelo y residuos orgánicos y el efecto de las prácticas de uso de la tierra sobre la biodiversidad de los grupos funcionales de los organismos del suelo.

En 1994 fue realizada la Rio-Convention sobre la *Biodiversidad de los Suelos*, con el objetivo de analizar la pérdida global de la biodiversidad en el planeta, "un problema ambiental olvidado" (Hägvar, 1998).

En noviembre de 2001, se desarrolla la Convención sobre la Diversidad Biológica en (Convention on Biological Diversity) que se fundamenta en la conservación de la biodiversidad del suelo como un recurso sustentable para la agricultura. En el desarrollo del documento se expresan los beneficios de un mejor manejo de la biota del suelo.

Particularmente se detalla la Biorremediación como un área clave de atención, respecto del uso de la biota del suelo en tratamientos ambientalmente aceptables para la decontaminación de los suelos.

La protección de la biodiversidad significa asegurar la conservación de las especies, ecosistemas y pools de genes de manera que los procesos ecológicos esenciales sean mantenidos para las generaciones futuras, principalmente que sea logrado el desarrollo ecológicamente sustentable del suelo (Palleroni, 1999).

### ***1.3.4 SELECCIÓN DE POBLACIONES DENTRO DE LA COMUNIDAD***

Los microorganismos, como las plantas superiores y los animales han desarrollado estrategias que les permiten sobrevivir en comunidad.

Una forma de visualizar estas estrategias es clasificar a los organismos, según un esquema artificial, en estrategias *r* y estrategias *K*.

Los términos *r* y *K* derivan de la ecuación de crecimiento de una población (Andrews, 1991):

$$\frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} = r - \left( \frac{r}{K} \cdot X \right)$$

$$\frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} = \text{velocidad específica de crecimiento de la población.}$$

*r* = velocidad de crecimiento de la población, per capita.

*K* = capacidad de intercambio del ambiente.

*N* = densidad de población (número o biomasa)

La ecuación describe el crecimiento de una población en condiciones limitantes del ambiente. Cuando  $N$  es baja, la velocidad de crecimiento está dominada por  $r$  y cuando  $N$  es alta, la velocidad queda limitada por la capacidad de intercambio del ambiente,  $K$ .

El mayor incremento en la densidad de la población sucede a niveles bajos de densidad de población. El mínimo incremento en el tamaño de la población ocurre a niveles altos de densidad poblacional.

El esquema  $r$ - $K$  describe las estrategias de los organismos dentro de un gradiente continuo, donde la evolución favorecerá desde la adaptación mediante el desarrollo de altas velocidades de división (estrategas  $r$ ) en un extremo, hasta la optimización del uso de los recursos (estrategas  $K$ ) en el otro.

El "dogma" de la ecología es que los organismos optimicen ya sea su capacidad reproductiva o bien la conservación de los recursos, pero no ambas (Andrews y Hall, 1986).

Desde el punto de vista de la microbiología del suelo, el grupo de microorganismos zimógenos (oportunistas o alóctonos) se correspondería con el concepto de estrategias  $r$  y los autóctonos (indígenas, degradadores del humus) lo harían con el concepto de estrategias  $K$ .

Los microorganismos que colonizan inicialmente un hábitat desarrollando una alta velocidad de crecimiento, serían los estrategias  $r$ .

Este comportamiento favorece la división celular a niveles bajos de densidad de población, donde la competencia es baja.

Estos microorganismos acceden al sistema con las precipitaciones, restos de tejidos, abono animal, aguas cloacales. Pueden persistir por algún tiempo en forma de células dormantes (resting cells) y también desarrollar por cortos períodos de tiempo pero nunca contribuyen de manera relevante a las transformaciones o interacciones ecológicamente significativas. Su selección ocurriría en ambientes sujetos a impredecibles y transitorios cambios. Destinan una gran parte de los nutrientes al proceso de división.

Cuando los recursos escasean o las condiciones se vuelven desfavorables, su densidad poblacional experimenta una rápida reducción. Son representantes de este grupo los géneros bacterianos, *Pseudomonas* y *Bacillus*.

La permanencia de los microorganismos estrategias  $K$  en la comunidad depende de la adaptación fisiológica a los recursos ambientales, o en otras palabras, de la capacidad de intercambio con el ambiente.

Estos microorganismos, que se reproducen más lentamente que los estrategias  $r$ , tienden a ser los predominantes en situaciones limitantes de nutrientes.

Las poblaciones de estrategias  $K$  son usualmente más estables dentro de la comunidad. Prevalecen bajo condiciones de alta densidad poblacional y destinan una pequeña porción de los recursos a los procesos de división. Pueden presentar estados de resistencia y permanecer por largos períodos sin realizar actividad metabólica, como también en determinados

momentos esta población nativa prolifera y participa en las funciones bioquímicas de la comunidad. Son representantes de este grupo los géneros *Agrobacterium*, *Corynebacterium* y las bacterias del suelo degradadoras de humus.

#### **I.4 ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE LAS POBLACIONES EN EL ECOSISTEMA DE SUELO.**

Las comunidades microbianas y su entorno abiótico componen el ecosistema donde las diferentes poblaciones llevan a cabo los ciclos biogeoquímicos de la materia.

Debido a la complejidad que ellos representan debería poder ser aplicado algún grado de simplificación y consideraciones teóricas para comprender las fuerzas y principios que gobiernan el funcionamiento de los ecosistemas (Schmidt, 1992; Atlas y Bartha, 1998).

Los modelos experimentales simplifican en gran medida las interacciones entre las poblaciones microbianas y entre las comunidades y el ambiente. Entonces cada modelo debe ser interpretado desde su marco de descripción del sistema real.

Los modelos de ecosistemas en el laboratorio se denominan microecosistemas o microcosmos y pueden involucrar desde el modelo más sencillo (cultivo puro en un medio estéril) hasta el más complejo (múltiples poblaciones definidas de micro y macro organismos).

Las interacciones entre las diferentes poblaciones y su entorno en un ecosistema pueden ser expresadas mediante relaciones matemáticas. Estas son particularmente útiles en la descripción del crecimiento de las poblaciones y las interacciones entre ellas (Schmidt, 1992; Atlas y Bartha, 1998).

Otras ecuaciones pueden ser utilizadas para describir cambios en la concentración de nutrientes en un ecosistema, velocidades de actividades enzimáticas, sucesión de poblaciones dentro de una comunidad, entre otras. Estas ecuaciones luego pueden generar gráficos de los resultados teóricamente esperados.

Algunas veces estas ecuaciones pueden reflejar exactamente las interacciones en el crecimiento de las poblaciones. En otros casos deben ser consideradas fuentes adicionales de variación para lograr un mayor acercamiento al comportamiento real observado en el sistema estudiado.

Aquellas ecuaciones matemáticas que logran describir las relaciones simples entre los componentes de un sistema pueden, luego, ser utilizadas en el desarrollo de modelos de ecosistemas más extensos con complejas interrelaciones entre poblaciones (Schmidt y Lipson, 2001).

## **I.5 METODOLOGÍAS APLICADAS AL ESTUDIO DE LAS COMUNIDADES DEL SUELO.**

De lo expuesto en secciones anteriores, puede interpretarse que el conocimiento de la estructura y función de la comunidad es un objetivo central en los estudios de la microbiología del suelo y en particular en el campo de la biodegradación y la biorremediación.

Existe una variedad de técnicas disponibles para el análisis de las comunidades microbianas (O'Gara y col., 1999). A pesar de ser el análisis de la composición, estructura y función de las comunidades uno de los aspectos más importantes de la microbiología ambiental, todavía sigue siendo un área que ofrece un gran desafío metodológico (Ogram y Sharma, 2002).

En particular, las comunidades microbianas de suelo son las comunidades microbianas naturales más complejas dada la heterogeneidad que representa la matriz del suelo y la inmensa variedad de especies microbianas presentes en los diversos microhábitats. (Kuske y col. 1997; Palleroni, 1999).

El estudio de las comunidades puede ser abordado desde dos puntos de vista, uno basado en las interacciones entre las diferentes poblaciones que integran la comunidad denominado sinecología y el otro contrapuesto, denominado autoecología, que examina los organismos de una población individual con relación a su ambiente (Atlas y Bartha, 1998). Este último enfoque se basa en el comportamiento de las poblaciones individuales como medio de adaptación a su ambiente; en cambio la sinecología estudia de manera integrada y directa el comportamiento de la comunidad en el ecosistema, incluyendo los efectos del sinergismo, parasitismo y predación.

Pueden proponerse diferentes estrategias para el estudio de las comunidades aplicando cada una diferentes metodologías que proveerán, de todos modos, una visión parcializada de la gran complejidad del suelo. Ninguna técnica por sí sola podría abarcar el total de microorganismos de la comunidad y la abundancia relativa de individuos dentro de cada tipo. De modo que una adecuada selección de diferentes técnicas sería crítica en el momento de encarar el estudio de las comunidades en un dado ecosistema, estableciendo de antemano el marco desde donde serán inferidas las conclusiones.

### ***I.5.1 ESTRATEGIA BASADA EN EL AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS PUROS.***

Una estrategia comúnmente aplicada en el estudio de comunidades se basa en el aislamiento de colonias individuales sobre medios sólidos, observación y descripción de sus características macro y microscópicas seguido de la caracterización / identificación de los diferentes grupos de microorganismos. Esto último puede realizarse a través de la determinación de los perfiles de

utilización de sustratos, presencia de actividad de determinadas enzimas, perfiles lipídicos, de proteínas ó de ácidos nucleicos, entre otros. Finalmente a partir del análisis de las propiedades del conjunto de cultivos se infieren las características o propiedades de la comunidad.

Esta estrategia clásica aplica el enfoque de la autoecología al pretender identificar o caracterizar los cultivos puros.

También es reconocida como uno de los métodos más sensibles al determinar el tamaño de una población, o caracterizar un grupo específico siempre que se disponga del medio de cultivo adecuado para su desarrollo y que permita poner en evidencia sus características diferenciales (Ellis y col., 2001).

En los estudios donde interesa determinar las especies más abundantes en el suelo se utiliza como criterio de selección de poblaciones el aspecto macroscópico de las colonias aisladas, eligiendo aquellas que son diferentes.

En cambio si el objetivo es determinar la diversidad de especies (riqueza y abundancia), generalmente se toma al azar un número representativo del conjunto de colonias desarrolladas en los medios de cultivo (Wünsche y col., 1995)

Evidentemente, debido a la gran variedad de microorganismos existentes en la comunidad de suelo, no es sencillo lograr una detallada descripción de todos los cultivos aislados.

Algunas de las características más discriminantes utilizadas en una primera selección son el aspecto y forma de las colonias (color, borde, elevación, nivel de mucosidad).

Basándose en estas propiedades macroscópicas más las observaciones microscópicas (en fresco o previa coloración aplicando técnicas diferenciales como la coloración de Gram) se suelen agrupar los aislamientos para su posterior estudio. Luego, al analizar aquellos representantes característicos de cada grupo, se logra reducir de algún modo la complejidad que presenta la comunidad del sistema de suelo (Ogram y Sharma, 2002).

Claramente esta estrategia es muy laboriosa y la información aportada sería parcial debido a la imposibilidad de cultivar todos los microorganismos del ambiente.

#### ⊕ **Consideraciones generales sobre los métodos basados en el cultivo de microorganismos.**

La mayor limitación de los métodos basados en cultivo de los microorganismos es que no todas las especies ambientales pueden desarrollar en los medios de cultivo hasta ahora diseñados. Consecuentemente, muchos microorganismos de interés podrían pasar inadvertidos.

De acuerdo con los datos publicados en bibliografía se estima que entre el 1 y el 10% de los microorganismos presentes en los ambientes naturales son realmente capaces de desarrollar en los medios de cultivo de laboratorio (Torsvik y col., 1990; Amman y col., 1995; Hughes y col. 2001). Sin embargo, este porcentaje podría aumentar gracias al avance logrado en el diseño de

nuevos medios sólidos y métodos de cultivo para las bacterias del suelo (Roane y Pepper, 2000; Janssen y col., 2002). No obstante, aún si todas las especies pudieran cultivarse, su estudio no sería factible debido a las limitaciones de tiempo.

Por otra parte, recientes estudios han aportado argumentos que reivindican la aplicación de los métodos de cultivo en los estudios ambientales, demostrando que las bacterias cultivables representan la porción ecológicamente relevante de la comunidad bacteriana del suelo (Ellis y col. 2003).

### ***1.5.2 ESTRATEGIA BASADA EN ANÁLISIS DIRECTO DE LA COMUNIDAD MICROBIANA.***

La estrategia de inferir el comportamiento de una comunidad a través del cultivo de sus poblaciones predominantes aporta una información parcial del sistema, dependiente de la relevancia de las diferentes poblaciones cultivables seleccionadas como representativas de la comunidad. Así mismo, no son muchos los procesos que ocurren como resultado de unas pocas poblaciones aisladas.

Una forma de ampliar el concepto del estudio de comunidades microbianas es aplicar el enfoque de la sinecología, es decir considerar a la comunidad como una unidad ecológica básica que responde a las interacciones bióticas y abióticas del ambiente.

En este marco, existen diferentes metodologías que abordan el análisis, determinando la función y/o la estructura de la comunidad y el grado de correlación que existe entre ambas propiedades.

El desarrollo de una variedad de técnicas aplicadas al estudio de comunidades basadas en las características bioquímicas, fisiológicas y moleculares han ampliado el espectro de los métodos dependientes del cultivo. Cada una tiene sus ventajas y limitaciones, por lo que individualmente solo pueden proveer una parcial información que responda a las diferentes cuestiones específicas.

#### **1.5.2.a. Análisis funcional de la comunidad**

El análisis de la función implica determinar la actividad al nivel de la comunidad. Es decir, lo que se determina es la actividad resultante de las reacciones producidas por las poblaciones integrantes de la comunidad en los diferentes microhabitats, como consecuencia del sinergismo y antagonismo y su interacción con la matriz del sistema.

### ***1.5.2.a.1 Determinación de la actividad enzimática de la comunidad.***

Las actividades metabólicas del suelo están mediadas por sistemas enzimáticos específicos, la mayoría de los cuales son producidos por la microbiota del suelo. Consecuentemente, medir la actividad enzimática es una forma alternativa de determinar la actividad metabólica (Morra, 2002). Las actividades enzimáticas de deshidrogenasas, amilasas, fosfatasas, arilsulfatasas y celulasas son todas indicativas de los principales procesos productivos del suelo (Atlas y Bartha, 1998).

Puede utilizarse una gran variedad de ensayos enzimáticos para medir la actividad metabólica de los microorganismos autóctonos del suelo (Song y Bartha, 1990; Fontvieille y col., 1992; Heilmann y col., 1995; Acosta-Martinez y Tabatabai, 2000).

Algunos, como la medida de actividad de deshidrogenasas, esterasas y fosfatasas evalúan la actividad de una proporción relativamente grande de la comunidad microbiana. Otros, como las medidas de actividad de celulosa, quitinasa, nitrogenasa y actividad denitrificante evalúan las funciones metabólicas de un pequeño pero importante segmento de la comunidad microbiana. (Atlas 1998).

En la evaluación de la *actividad* enzimática se utilizan ensayos de laboratorio estandarizados debido a las múltiples variables que pueden afectar la actividad enzimática de la muestra de suelo: temperatura, humedad, pH, agitación durante la medición, heterogeneidad del sustrato, entre otras (Morra, 2002).

Aún así, es difícil extrapolar los datos de laboratorio a la predicción de la real actividad *in situ*, debido a que pequeñas variaciones pueden modificar la velocidad enzimática del sistema.

Los datos obtenidos finalmente representan un valor promedio del sistema y no la verdadera actividad enzimática que existe al nivel de microhábitat.

### ***1.5.2.a.2 Determinación del espectro de asimilación de sustratos de la comunidad.***

Garland y Mills, 1991, proponen el concepto de perfil fisiológico al nivel de comunidad, (Community Level Physiological Profile, CLPP) como un método rápido y relativamente económico, que aporta una gran información respecto del total de microorganismos, siendo de gran utilidad en la diferenciación de comunidades microbianas.

En un comienzo se utilizó el sistema de identificación microbiana basado en la actividad metabólica sobre una variedad de sustratos utilizados como única fuente de carbono y energía (microplacas de titulación de 96 pocillos con diferentes sustratos, BIOLOG Inc.). Posteriormente, el espectro de sustratos fue reducido a aquellos ecológicamente más relevantes que permitieran la discriminación entre diferentes comunidades de suelo. Entonces,

BIOLOG Inc. diseña el Ecoplate que reduce el número original de 92 sustratos a 31, incluyendo la realización de triplicados.

El método consiste en inocular un volumen de suspensión de la muestra en cada pocillo de una microplaca de titulación Ecoplate (que contiene un medio base suplementado con el sustrato fuente de carbono y energía y un indicador de redox). Luego de unos días de incubación el desarrollo microbiano produce el viraje del indicador a un compuesto coloreado.

El perfil de sustratos asimilados permite la discriminación entre las comunidades analizadas (Wünsche y col., 1995).

Una de las limitaciones de este método es la necesidad del desarrollo de la muestra en los pocillos para poder inferir la función ecológica de la comunidad. De esta forma la interpretación del resultado podría implicar la función potencial a través del desarrollo de aquellos microorganismos capaces de adaptarse a las condiciones de cultivo.

Si bien se fundamenta en respuestas fenotípicas sujetas a las condiciones de cultivo, los perfiles de asimilación de sustratos de las comunidades reflejan las diferencias estructurales entre las comunidades de manera similar a la realizada por las técnicas moleculares (Kerkhof y col., 2000).

#### ***1.5.2.a.3 Determinación de la respuesta respiratoria inducida por el sustrato (SIR).***

El método consiste en la determinación de la respuesta respiratoria inicial de la comunidad microbiana ante el agregado de un sustrato. Es decir, el incremento inicial estable en la velocidad de respiración debido a la mineralización del sustrato agregado, por ejemplo glucosa, por la comunidad microbiana del suelo.

La respuesta inducida por el sustrato es determinada en sistemas denominados respirómetros. Estos consisten de un erlenmeyer con un tubo lateral adosado, donde se coloca una solución de KOH de normalidad conocida, que actúa como trampa para captar el CO<sub>2</sub> producido por la muestra (Pramer y Bartha, 1972). Periódicamente el líquido de la trampa es retirado, reemplazado por una solución nueva de KOH y titulado con un ácido de normalidad conocida. Actualmente, los respirómetros pueden medir el CO<sub>2</sub> producido cada hora, mediante un cromatógrafo gaseoso (Witter y col., 2000).

Utilizando estos sistemas, es posible evaluar la capacidad catabólica de la comunidad microbiana incubando porciones del suelo con diferente sustratos y midiendo la respuesta SIR en cada caso.

### ***1.5.2.b. Análisis de la estructura de la comunidad***

Una forma de evitar las limitaciones de los métodos de cultivo en el estudio de las comunidades consiste en analizar la estructura de la comunidad a través de indicadores moleculares extraídos directamente de las muestras ambientales. Los indicadores más comúnmente utilizados son DNA, RNA y lípidos.

Si bien estos métodos no presentan las limitaciones de los cultivables, el análisis de estas moléculas indicadoras aporta una información relativamente más escasa respecto de la función de los microorganismos en estudio. En otras palabras, es poca la información que puede ser inferida acerca del comportamiento fisiológico de los organismos en el ambiente a partir de la secuencia de algunos de sus genes o de la presencia de un determinado lípido.

Sin embargo, esta alternativa permite analizar la estructura de la comunidad completa del suelo. De esta manera es posible evaluar directamente la influencia de los cambios ambientales (bióticos y abióticos) a través de los cambios en la estructura global de la comunidad, aproximándose al enfoque de la sinecología.

A continuación se describen los métodos cultivo-independientes generalmente aplicados al estudio de comunidades microbianas de suelo.

#### ***1.5.2.b.1. Determinación del contenido de ácidos grasos de la comunidad***

Los ácidos grasos totales extraídos de una muestra ambiental han sido utilizados para el estudio de la estructura de las comunidades microbianas en el ambiente y para la detección de los cambios producidos en las poblaciones microbianas (Morgun y Winstanley, 1997).

Las diferentes poblaciones microbianas se caracterizan por poseer determinados ácidos grasos. Por ejemplo, ácidos grasos saturados, de cadena larga y ramificados se asocian a bacterias Gram positivas. Mientras que las Gram negativas se caracterizan por contener mayor concentración de ácidos grasos monoinsaturados de cadena más corta. Los eucariotas se caracterizan por la presencia de esteroides (Zelle y Bai, 1994).

El método frecuentemente utilizado para detectar especies bacterianas y eucariotas a partir de muestras ambientales consiste en el análisis de la fracción lipídica de la membrana citoplasmática bajo la forma de metil-éster de ácidos grasos (FAME).

El proceso consiste en la esterificación de los lípidos y la inyección, separación, identificación y cuantificación de los metil ésteres de ácidos grasos por cromatografía gaseosa (Eder, 1995).

Los metil ésteres son identificados por comparación de sus tiempos de retención con los metil-ésteres de ácidos grasos de referencia. Pueden ser cuantificados mediante la calibración de las áreas de sus picos.

El análisis de los fosfolípidos unidos a ácidos grasos (PLFA) también ha sido utilizado en la descripción de comunidades bacterianas. El análisis de estos perfiles provee información no solo de la composición y abundancia relativa de cada población de la comunidad sino también del estado fisiológico de las poblaciones (Peterson y Klug, 1994)

Esta metodología posee una serie de limitaciones. Por ejemplo, en la comparación de los perfiles lipídicos entre muestras pueden pasar desapercibidos ciertos cambios en determinados grupos específicos ya que muchas especies pueden presentar el mismo patrón de lípidos.

Otra limitación es que, si bien la concentración relativa de los diferentes tipos de lípidos polares en cada membrana es característica de cada especie microbiana, los componentes ácidos grasos de las diferentes membranas lipídicas no son constantes y pueden variar con el estado nutricional y las condiciones ambientales para mantener la fluidez de la membrana.

Esta serie de limitaciones hace que este análisis no sea indicado para la evaluación de una estructura detallada de las comunidades microbianas del suelo (Coutinho y col., 1999).

#### ***1.5.2.b.2. Determinación del perfil de ácidos nucleicos de la comunidad.***

El desarrollo de las técnicas moleculares permiten evaluar la diversidad microbiana al nivel genético. Los microorganismos son detectados, identificados y cuantificados a través del análisis de sus genes.

En principio cualquier gen podría ser empleado, los más ampliamente utilizados son el 16S rRNA y el 23S rRNA, en los estudios filogenéticos.

Las moléculas de 16S rRNA y 23S rRNA son consideradas marcadores genéticos. Están presentes en todos los organismos; tienen secuencias altamente conservadas a través de la evolución y porciones que cambian relativamente a una mayor velocidad (regiones variables). Las zonas altamente conservadas son características de mayores grupos filogenéticos y las variables de grupos más pequeños. De este modo el análisis de la secuencia de estas moléculas permite hacer inferencia filogenética. Además están presentes en numerosas copias por célula, lo que facilita su detección (Amann, 1995).

En ciertos casos la molécula de rRNA no ofrece variación suficiente para hacer diferenciaciones intraespecíficas, entonces se utilizan primers (oligonucleótidos iniciadores de la polimerización en cadena) específicos de la región espaciadora entre 16S rRNA y 23S rRNA que posee un mayor grado de variación en secuencia y tamaño en comparación con el 16S rDNA (Gütler y Stanisich, 1996).

Las técnicas moleculares vienen siendo muy utilizadas para determinar la diversidad genética de las comunidades microbianas (Muyzer y col., 1993; Kuske y col., 1997).

Una de las estrategias se basa en la separación física de fragmentos de ácidos nucleicos a través de un soporte sólido que puede ser de agarosa o acrilamida.

El perfil de bandas obtenido es considerado una "huella digital" representativa de la muestra analizada y permite hacer comparaciones entre diferentes comunidades a través del análisis comparativo entre los perfiles.

Inicialmente es necesario extraer los ácidos nucleicos de la muestra ambiental. Este paso usualmente consiste en una exhaustiva purificación para eliminar proteínas, ácidos húmicos, y otros compuestos que pudieran interferir con el posterior análisis de los ácidos nucleicos.

Se utilizan generalmente dos procedimientos para la recuperación del RNA o el DNA de la muestra: a) la extracción de las células microbianas seguida de la lisis celular y purificación de los ácidos nucleicos; y b) la lisis directa de las células en la matriz ambiental seguida de la purificación de los ácidos nucleicos (Bruns y Buckley, 2002).

A partir del material purificado pueden aplicarse diferentes técnicas que permiten generar un perfil de ácidos nucleicos (huella digital) generalmente representado por un patrón de bandas de fragmentos de ácidos nucleicos separados mediante una electroforesis en gel.

Dependiendo de la técnica utilizada para obtener los fragmentos de estas moléculas (enzimas de restricción; amplificación; separación de los fragmentos en geles de electroforesis) se generan perfiles de diferente complejidad.

Entre las técnicas más utilizadas están ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) (Fernández y col., 1999); T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) (Blackwood y col., 2003) y DGGE/TGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Röling y col., 2002).

**ARDRA** (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis). Se basa en la digestión mediante enzimas de restricción de fragmentos de rDNA amplificados con PCR (Reacción de polimerización en cadena) y posterior separación de los fragmentos en gel de agarosa.

Este método utiliza un par de primers universales (oligonucleótidos iniciadores de la polimerización en cadena) para la amplificación con PCR de genes 16S rDNA o de la región espaciadora entre el 16S rDNA y el 23S rDNA. En general, cuando se realiza ARDRA con primers del 16S rDNA se generan patrones de bandas más simples que cuando se utilizan primers de la región espaciadora.

En el análisis de comunidades microbianas con una alta afinidad filogenética habitualmente se sugiere el uso de primers correspondientes a las zonas espaciadoras para lograr una mayor resolución de bandas. En cambio, si el grupo microbiano presenta una mayor heterogeneidad filogenética el fragmento a amplificar debería ser el 16S rDNA.

No obstante, en comunidades con alta diversidad, ambas estrategias pueden generar un patrón de bandas muy complejo o con muy baja resolución entre bandas (Fernández y col., 1999).

Las ventajas de este método son la rapidez y capacidad de evaluar diferencias entre grupos filogenéticos dominantes en una comunidad.

**T-RFLP** (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism). El DNA directamente extraído de la muestra se amplifica mediante la PCR en presencia de un primer marcado (fluorescente), dirigido hacia la región la 16S rDNA. Seguidamente, los productos de PCR son digeridos con enzimas de restricción y los fragmentos marcados en su extremo son detectados mediante un secuenciador de DNA automatizado.

El perfil de bandas generado a partir de una muestra ambiental puede reflejar la estructura de poblaciones aportando información sobre la diversidad de la comunidad (cada fragmento terminal es un ribotipo) y una estimación semicuantitativa de la abundancia relativa (área de pico).

Este método puede también evaluar la actividad relativa de poblaciones. La cantidad de ribosomas por célula es una medida de actividad celular y la relación rRNA/rDNA generalmente aumenta cuando se incrementa la velocidad de crecimiento (actividad). Entonces mediante la comparación del patrón de bandas T-RFLP de rDNA con el generado a partir de rRNA de la muestra ambiental puede estimarse que poblaciones detectadas a nivel del rDNA son metabólicamente activas.

#### **DGGE – TGGE** (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

El procedimiento se basa en la electroforesis de los fragmentos de 16S-rRNA amplificados por PCR en geles de poliacrilamida conteniendo un gradiente desnaturizante linealmente incrementado. Durante la electroforesis del gel desnaturizante pueden ser separados los fragmentos de DNA de la misma longitud pero con diferente secuencia de pares de bases.

La separación en el gel se basa en la movilidad electroforética de las moléculas de DNA parcialmente desnaturizadas en geles de poliacrilamida, que va disminuyendo respecto de la molécula doble hélice del DNA.

La desnaturización de los fragmentos ocurre en determinados puntos de la molécula llamados *dominios de desnaturización* definidos como una longitud de pares de bases con idéntica temperatura de desnaturización.

Una vez que un *dominio de desnaturización* con la menor temperatura de desnaturización alcanza dicha temperatura en una determinada posición en el gel de DGGE, ocurre una transición en la conformación de la molécula desde doble hélice a parcialmente desnaturizada, deteniendo la migración.

La variación de la secuencia dentro de cada dominio causa la diferencia en las temperaturas de desnaturización. Los fragmentos con diferentes secuencias frenarán su migración en diferentes posiciones del gradiente desnaturizante y así podrán ser separados efectivamente por DGGE (Muyzer y col., 1993).

Este método permite obtener el perfil de las poblaciones dominantes de la comunidad (Muyzer, 1993; Head y col., 1997) y estudiar la dinámica de estas poblaciones en función de variaciones ambientales o bajo las condiciones operativas de un sistema.

Otra aplicación que permite obtener una mayor información es la hibridización del gel obtenido por DGGE con sondas de oligonucleótidos taxón-específicas.

Así mismo, cada banda puede ser cortada del gel, nuevamente amplificada y posteriormente secuenciada permitiendo la filiación genética.

Estos métodos pueden ser utilizados para realizar un rápido análisis de la presencia de genes que provean información filogenética o bien una evaluación funcional de las poblaciones presentes en la muestra ambiental mediante la utilización de sondas específicas de función.

La información que puede ser obtenida a través del análisis de estos perfiles está sujeta a las limitaciones generales de los métodos moleculares, como la eficiencia de la extracción del DNA, que puede ser más o menos eficiente dependiendo de la lisis de cada grupo microbiano; del grado de especificidad de los primers o sondas genéticas; del procedimiento de amplificación usando PCR que puede exhibir amplificación diferencial de algunas secuencias y la formación de artefactos generados por la técnica (moléculas quimeras).

Una limitación común de las técnicas que generan perfiles de bandas a partir de ácidos nucleicos de muestras ambientales, es la imprecisión en el asignar una banda particular a un grupo específico de microorganismos, especialmente cuando aparecen múltiples bandas en el gel. Debido a la heterogeneidad de la secuencia de operones del rRNA es posible detectar dos o más bandas para un grupo bacteriano específico (Head y col. 1997; Nübel y col, 1997).

Entonces, tanto en el caso de cultivos puros como en el estudio de comunidades, la obtención de patrones de bandas iguales no puede ser interpretada como identidad entre grupos filogenéticos ya que grupos filogenéticos diferentes, medianamente relacionados, pueden presentar el mismo patrón de bandas.

La Tabla-1 describe en forma comparativa algunos de los métodos más comúnmente aplicados en el estudio de comunidades en muestras ambientales.

**Tabla I-1 : Métodos moleculares para la obtención de perfiles de bandas a partir de ácidos nucleicos obtenidos de muestras ambientales. Modificado sobre original de Liu y Sthal, 2002. En Manual of Environmental Microbiology.**

<i>Métodos</i>	<i>Descripción</i>	<i>Marcador genético</i>	<i>Diversidad de resolución</i>	<i>Unidad de población</i>	<i>Identificación de la composición de poblaciones</i>	<i>Método de detección del DNA</i>
ARDRA	Amplificación con PCR; enzimas de restricción; separación por tamaño en gel agarosa.	rDNA; espacios intergénicos 16S-23S.	Por sitio de restricción o por longitud.	Fragmento	Purificación de bandas y secuenciamiento.	Bromuro de etidio
T-RFLP	DNA amplificado con PCR; enzimas de restricción; separación por tamaño de fragmentos terminales y separación por electroforesis capilar.	rRNA; rDNA: genes funcionales conservados.	Por sitio de restricción o por longitud.	Fragmento restringido terminal.	Inferida por comparación de longitudes con base de datos.	Colorante fluorescente
DGGE y TGGE	DNA amplificado con PCR; electroforesis en gel poliacrilamida con gradiente concentración desnaturizante o temperatura.	rRNA; rDNA: genes funcionales conservados.	Por diferencia en 1pb.	Banda desnaturizada.	Purificación de bandas y secuenciamiento.	Bromuro de etidio

### **1.5.2.b.3. El método de Hibridización *in situ*.**

La hibridización *in situ* sobre la célula entera permite obtener información sobre el número de células específicas, la morfología y espacial distribución de los microorganismos, así como también sobre su actividad fisiológica directamente en la muestra ambiental.

Las células son fijadas en paraformaldehído sobre portaobjetos y deshidratadas. Luego el preparado es incubado con una sonda de oligonucleótido dirigida al rRNA, marcada con un colorante fluorescente y observadas en microscopio de epifluorescencia (Amann, 1995).

Las sondas de oligonucleótidos pueden ser diseñadas mediante la información obtenida del secuenciamiento de bandas en los análisis de los perfiles de ácidos nucleicos por DGGE o T-RFLP. Un aspecto importante al considerar este método es que solo pueden ser estudiadas aquellas bacterias para las cuales existen sondas.

Las dificultades propias de este método son la especificidad de la sonda, penetración efectiva de las sondas al sitio blanco, la intensidad de la respuesta, la fluorescencia de fondo debido a partículas inorgánicas y la autofluorescencia en el caso de microorganismos fototróficos (Bruns y Berthe-Corti, 1998)

Por otro lado, también pueden influenciar el análisis las características morfológicas y fisiológicas de los microorganismos, por ejemplo la presencia de pequeñas formas aisladas, formas filamentosas o la posibilidad de desarrollar un estado dormante o inactivo como en el caso de las formas esporuladas. Particularmente, estas últimas características podrían ser la principal causa de limitación de la técnica debido al bajo número de ribosomas por célula (característico de las células metabólicamente inactivas) y al difícil acceso de la sonda al rRNA (Amann, 1995).

#### **⊕ Consideraciones generales sobre los métodos basados en el análisis de ácidos nucleicos.**

Las técnicas de la biología molecular ofrecen nuevas oportunidades para el análisis de la estructura y composición de especies de las comunidades microbianas.

Particularmente, la variación de la secuencia del rRNA ha sido explotada para inferir relaciones filogenéticas entre los microorganismos y para diseñar sondas de oligonucleótidos y primers específicos para la detección de taxones microbianos individuales en habitats naturales (Head y col., 1998).

Estas técnicas también han sido aplicadas para determinar la diversidad genética de las comunidades microbianas e identificar aquellos miembros de las poblaciones microbianas que no ha sido posible recuperar en cultivo puro utilizando las técnicas microbiológicas convencionales (Amann, 1995; Giovannoni y col., 1988).

Sin embargo, tanto el diseño de sondas específicas como el de primers específicos es definido en función de secuencias provenientes de microorganismos aislados de ambiente que representan tan solo una pequeña fracción de la comunidad microbiana ambiental (Palleroni 1997; Coutinho y col., 1999).

Así mismo, durante el análisis filogenético se comparan las secuencias de rDNA desconocido proveniente de la muestra natural con las provenientes de microorganismos cultivables (base de datos) y a partir de dicho análisis se infieren las propiedades fenotípicas de los microorganismos desconocidos (Fernández y col., 1999). Es decir, que los métodos moleculares pueden proveer información sobre la función de poblaciones solo de una manera indirecta (Watanabe y Baker, 2000).

Una opinión crítica a esta tendencia es la desarrollada por el Prof. Palleroni en su publicación *Prokaryotic diversity and the importance of culturing*, 1997 y durante su conferencia en el Seminario sobre Biodiversidad realizada en 1999, en nuestro país, donde analiza la dificultad de suponer que la vasta diversidad catabólica del grupo *Pseudomonas* o la variedad morfológica y bioquímica de los actinomicetes pudieran ser reconstruidas sobre las bases de inferencias obtenidas mediante el uso de estas sondas moleculares.

En otras palabras, las propiedades filogenéticas no necesariamente correlacionan con las destacadas propiedades fisiológicas (Watanabe y col., 1999).

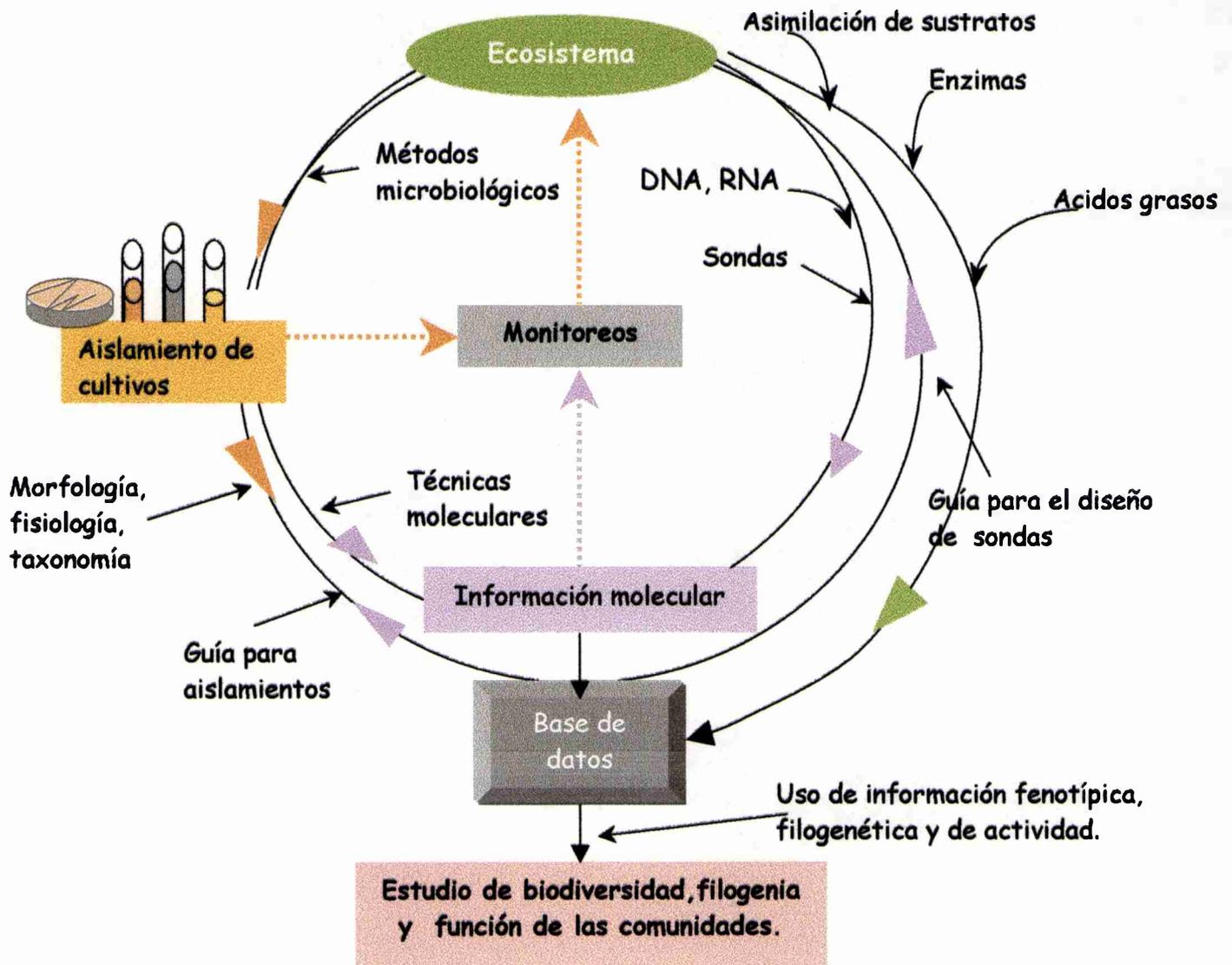
Así mismo, todavía existen cuestiones respecto de la representatividad del muestreo, la heterogeneidad espacial del suelo y la relevancia de las investigaciones realizadas sobre pequeñas cantidades de muestra (1g) en los procesos ecológicos a campo (O'Donnell y Görres, 1999).

Entonces, un análisis más representativo de la complejidad de las comunidades microbianas en el ambiente y particularmente en los sistemas de suelo podría lograrse a través de una metodología polifásica integrando las técnicas convencionales de cultivo y las moleculares. De esta manera, sería posible relacionar de una manera más directa la función de las poblaciones con la estructura de las comunidades ambientales (Palleroni 1997; Coutinho y col., 1999; Watanabe y Baker, 2000).

La Figura I-3 esquematiza la propuesta de integración de ambas metodologías (Palleroni, 1997). En ella se propone que en el monitoreo del ecosistema mediante técnicas de aislamiento e identificación de cultivos se obtenga la información necesaria para crear las condiciones más próximas como sea posible a aquellas que les permitan a los microorganismos expresar sus propiedades biológicas como miembros de la microbiota natural. Luego las macromoléculas de los procariotas aislados pueden ser identificadas por técnicas moleculares, de esta manera pueden servir de guía y fuente adicional de información para el reconocimiento de los microorganismos en el ambiente natural (diseño de sondas y primers).

De esta manera la información generada por las técnicas microbiológicas convencionales y moleculares sirven de guía para el cultivo de nuevas especies.

Estas dos fuentes de información pueden ser luego almacenadas en la base de datos, siendo así útil para el monitoreo de los cambios que puedan ocurrir en las comunidades microbianas del ecosistema debido a las alteraciones ambientales.



**Figura I-3:** Esquema para la evaluación de la diversidad de muestras ambientales, aplicando técnicas cultivo-dependiente y moleculares. Modificado a partir de *Prokaryotic diversity and the importance of culturing*, Palleroni 1997.

## **CAPÍTULO II**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVO**

---

## **II HIPÓTESIS**

- La comunidad microbiana de un suelo limpio cambia debido a la contaminación con una mezcla compleja de hidrocarburos.
- Dicho cambio esta relacionado con la carga inicial del contaminante.
- La comunidad microbiana de sistemas contaminados se modifica durante un proceso de biorremediación.
- La comunidad del suelo restablece sus condiciones originales al desaparecer el contaminante.

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los cambios producidos en la comunidad microbiana de un suelo limpio como consecuencia de la contaminación con un residuo petroquímico y durante el proceso de biorremediación. Evaluar la capacidad de biorestauración del suelo una vez finalizado el tratamiento.

#### **En forma particular, se plantearon los siguientes objetivos:**

- a) Analizar la composición microbiológica del residuo petroquímico API, con el fin de determinar si los grupos microbianos predominantes intervienen en el proceso de biorremediación del residuo en suelo.
- b) Determinar la cinética de eliminación de los hidrocarburos durante el proceso de biorremediación, su influencia sobre la dinámica de las poblaciones microbianas cultivables y sobre la actividad de la comunidad microbiana completa, en suelo limpio y sistemas contaminados con distintas concentraciones del residuo petroquímico.
- c) Analizar los cambios en la estructura de las comunidades microbianas mediante técnicas convencionales de aislamiento e identificación de los grupos dominantes en puntos seleccionados durante el tratamiento, y mediante técnicas cultivo independiente.
- d) Evaluar el grado de restauración alcanzado comparando la estructura y función de las comunidades establecidas al finalizar el proceso de biorremediación con la comunidad del suelo limpio.

**CAPÍTULO III**

**MATERIALES Y METODOLOGÍA**

---

### III MATERIALES Y METODOLOGIA

#### III.1 MATERIALES

##### III.1.1 TIERRA

Se utiliza tierra negra de jardín correspondiente al nivel A, sin agregado de fertilizantes ni otras mejoras. Se caracteriza por tener textura franco arcillo limosa, pH: 5,5 – 5,7 y contenido de materia orgánica 6,21%.

La Tabla 1 muestra los resultados de la caracterización de la tierra realizada por el Instituto de Suelos de la UNLP.

**Tabla 1:** Caracterización de la tierra utilizada en los ensayos

<i>Determinación</i>	<i>Método</i>	
Carbono orgánico	Walkley-Black	3.60 %
Materia orgánica	% Carbono orgánico x factor 1.724	6.21 %
Nitrógeno total	Método de Kjeldahl	0.296 %
Relación Carbono/ Nitrógeno		12.2
Fósforo asimilable	Método de Bray-Kurtz I	4.2 mg/kg
Capacidad de intercambio catiónico	Saturación con acetato de amonio, desplazamiento de éste con cloruro de sodio y cuantificación por volumetría.	23.7 meq/100g
Análisis granulométrico	Método de Bouyoucos	
	Arcilla (<2µm)	23.9 %
	Limo (2-50 µm)	56.1 %
Clase textural	Arena (50-2000 µm)	20.0 %
		Franco Limosa

El material es cernido a través de un tamiz de 4 mm para remover restos de plantas y luego por uno de 2 mm.

##### III.1.2 RESIDUOS

Se trabaja con barros residuales del sistema de tratamiento primario de efluentes de una industria petroquímica.

### III.1.3 RESIDUO API

El residuo API es un barro semisólido, de color marrón oscuro y olor penetrante que fue almacenado en playas de barros durante 10 años.

Este residuo ha sido ampliamente caracterizado desde el punto de vista químico. La Tabla 2 muestra el análisis fisicoquímico del residuo (Vecchioli, 1998).

**Tabla 2:** Características fisicoquímicas del residuo API.

Densidad (g/ml)	pH	Agua (%)	Cenizas 900°C (%)	Fracción extractable en éter (%)	Volátiles 105 °C (%)	Alifáticos (%)	Aromáticos (%)	Asfálticos (%)
1.013	10.41	72.66	3.81	11.63	10.88	17.70	55.70	16.60

- La concentración de hidrocarburos totales cromatografiables (HT-GC) del residuo API es de 91000 mg/kg.

### III.1.4 RESIDUO PAR

El residuo PAR es un barro semisólido, de aspecto homogéneo y color marrón oscuro, generado por una industria que procesa productos parafínicos. El residuo fue almacenado por años en playas de barros.

La Tabla 3 muestra las características fisico-químicas de este residuo.

**Tabla 3:** Características fisicoquímicas del residuo PAR.

Densidad (g/ml)	pH	Agua (%)	Cenizas 900°C (%)	Fracción extractable en éter (%)	Volátiles 105 °C (%)	Alifáticos (%)	Aromáticos (%)	Asfálticos (%)
0,972	6,5-7,0	9,64	0,81	81,5	12,89	61,7	18,6	1,3

- ⊕ La concentración de hidrocarburos totales cromatografiables (HT-GC) del residuo PAR es de 36.141mg/kg.
- ⊕ La concentración de hidrocarburos totales por espectrometría infrarroja (HT-IR) es de 70.000 mg/kg

### III.1.5 MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

#### ❖ Agar Plate Count (Merck).

Composición en g/l de agua destilada.

Peptona de caseína	5.0
Extracto de lavadura	2.5
D(+) Glucosa	1.0
Agar-agar	14.0

El pH se ajusta a 7,0 con una solución de NaOH ó HCl 10%, y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

#### ❖ Medio R2-Agar (Reasoner y Geldreich, 1985).

Composición en g/l de agua destilada.

Extracto de levadura	0.5
Proteosa peptona N°3	0.5
Casamino acids	0.5
Glucosa	0.5
Almidón soluble	0.5
Piruvato de sodio	0.3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.05
Agar (Difco)	15.0

El pH se ajusta a 7,2 con una solución de NaOH ó HCl 10%, y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

El medio es suplementado con 760 µg/l de cicloheximida como agente inhibidor del desarrollo fúngico.

#### ❖ Medio de subcultivo R3-Agar (Reasoner y Geldreich, 1985).

Composición en g/l de agua destilada.

Extracto de levadura	1.0
Proteosa peptona N°3	1.0
Casamino acids	1.0
Glucosa	1.0
Almidón soluble	1.0
Piruvato de sodio	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.10
Agar (Difco)	15.0

El pH se ajusta a 7,2 con una solución de NaOH ó HCl 10%, y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

❖ **Agar Cooke Rose Bengal, RB-Agar (Martin, 1950)**

Composición en g/l de agua destilada.

Bacto Soytone Difco	5.0
Bacto Dextrosa Mean	10.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5
Bacto agar Merck:	15
Rojo Bengala:	0.035

El pH se ajusta a 6,0 con una solución de HCl al 10%, y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

El medio es suplementado con 250 µg/l de sulfato de estreptomicina, como agente inhibidor del desarrollo bacteriano.

❖ **Postgate B (Widdel and Bok, 1992).**

Composición en g/l de agua bidestilada

CaSO <sub>4</sub>	1,0
NH <sub>4</sub> Cl	1,0
K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,0
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
Acido ascórbico	0,1
Tioglicolato de sodio	0,1
Extracto de levadura	1,0
Lactato de sodio	
(Solución al 50%)	5,5 ml

El pH se ajusta con una solución de NaOH saturada hasta aproximar a neutralidad, luego con NaOH 10% hasta ph 7,2. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

**❖ Medio Mineral Líquido (MML) (Vecchioli y col., 1990)**

Composición en g/l de agua bidestilada

NaCl	5.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2
KNO <sub>3</sub>	3.0

El pH se ajusta a 7,0 con una solución de NaOH ó HCl 10%, y luego es esterilizado por filtración a través de membrana de acetato de celulosa de 0.45µm de diámetro de poro.

**❖ Medio Mineral Líquido suplementado con resazurina y extracto del residuo (Song and Bartha, 1990).**

Al medio líquido se le incorpora una solución de resazurina al 1% concentración final.

Luego de la esterilización se agrega un extracto del residuo obtenido con una mezcla de n-Hexanos (Merck p.a.), como fuente de carbono y energía en una concentración final del 0.5%.

**❖ Extracto en n-hexanos (Comunicación personal Dr. U. Stottmeister, 1993).**

Se pesan aproximadamente 20 g del residuo en un tubo grueso de vidrio con tapa esmerilada y se incorporan 40 ml de n-Hexanos (Merck, p.a.). Se realiza la extracción por agitación en un agitador rotatorio a 700 rpm durante 30 minutos.

El extractivo se recupera en un cristizador y se deja evaporar bajo campana.

**❖ Mezcla de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) en pentano (Merck, p.a.).**

La mezcla contiene 10 g/l de fenantreno, 1g/l de fluoreno, 1g/l de dibenzotiofeno y 1g/l de pireno en pentano en una concentración final de 1,3 g%.

**❖ Soluciones de hidrocarburos alifáticos al 10% en pentano (Merck, p.a.).**

Se preparan soluciones de los siguientes hidrocarburos alifáticos lineales al 10% (p/v) en pentano: tetradecano, hexadecano, octadecano, eicosano y tetracosano.

## **III.2 METODOLOGÍA**

### ***III.2.1 Preparación de los sistemas tierra-residuo.***

Se dispone aproximadamente 800 g de tierra tamizada en 5 frascos de vidrio con tapa plástica. La cantidad de tierra en el frasco es tal que ocupa aproximadamente la mitad del recipiente.

Se contaminan 4 de ellos con 1,25%, 2,5%, 5,0% y 10% (P/P) de residuo API en tierra respectivamente.

Con la finalidad de obtener un sistema lo más homogéneo posible se realiza la incorporación del residuo siguiendo las indicaciones de Pramer y Bartha (1972). Para lo cual sobre una porción de tierra del sistema se incorpora la cantidad de residuo calculado. Luego se integra gradualmente y mezclando cuidadosamente cada vez, el resto de la tierra.

Se reserva un sistema de tierra sin contaminar que es utilizado como sistema Control.

Se determina el contenido de humedad de cada sistema y se calcula la cantidad de agua necesaria a agregar para obtener un porcentaje de humedad del 20% aproximadamente.

Los sistemas son mantenidos durante un año bajo condiciones controladas de laboratorio simulando un proceso de biorremediación. La temperatura de incubación es  $22 \pm 2$  °C y la humedad es mantenida en un 20%. Son removidos cada 15 días con la finalidad de permitir suficiente aireación.

### ***III.2.2 MONITOREO DE LA EVOLUCIÓN DE LOS SISTEMAS TIERRA-RESIDUO.***

Periódicamente los sistemas son monitoreados para determinar la evolución de las diferentes poblaciones microbianas, estructura y actividad de la comunidad total, hidrocarburos residuales, valor de pH y contenido de humedad del sistema.

### ***III.2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS***

#### **III.2.3.a Determinación del contenido de hidrocarburos**

##### ***III.2.3.a.1 Determinación de la fracción extractable en éter (FEE) por método gravimétrico.***

Se aplica la técnica de Dibble y Bartha, 1979. La tierra (o residuo) se mezcla con una cantidad igual de sulfato de sodio anhidro. Se coloca en un cartucho de extracción en un Soxhlet con éter etílico (Merck, p.a.) y se realiza la extracción durante 6 horas.

Luego se concentra la muestra por evaporación con Kuderna Danish hasta un volumen de 10 ml aproximadamente. El éter remanente se evapora a temperatura ambiente en un cristizador. El contenido de sustancia extractable en éter se calcula según:

$$\text{FEE (\%)} = (P_{\text{cris+m}} - P_{\text{cris}}) \times 100 / [(P_{\text{car+m}} - P_{\text{car}}) \times P_T / (P_{T+S})]$$

Donde,

FEE= fracción extractable en éter

$P_{\text{car}}$  = peso de cartucho

$P_{\text{car+m}}$  = peso cartucho más muestra

$P_T$  = peso de tierra

$P_{T+S}$  = peso de tierra más sulfato de sodio anhidro

$P_{\text{cris}}$  = peso del cristizador

$P_{\text{cris+m}}$  = peso del cristizador más muestra

### **III.2.3.a.2 Determinación del contenido de hidrocarburos totales cromatografiables (HTCG) (Vecchioli y col. 1997).**

La concentración de los hidrocarburos cromatografiables (HT-GC) se evalúa previa extracción durante 6 horas con n-hexano (Merck), adicionando n-hexadecano como estándar interno para la cuantificación. El extracto se evapora y se filtra por papel antes de la inyección.

Se utiliza un cromatógrafo Perkin-Elmer Autosystem, equipado con un detector de ionización de llama (FID). Columna capilar de fused silica con fase líquida permaphase PVMS/54 (50mx0,25mm D.I.). Se utiliza gas helio. El inyector se mantiene a 280°C, el detector a 300°C. La temperatura del horno se programa desde 50°C (tiempo inicial 4 min.) en un primer paso hasta 150°C (velocidad= 4°C/min.) y un segundo paso hasta 280°C (tiempo final 15 min.) a una velocidad de 8°C / min.

Se aplica una relación de split de 1:20. El manejo de datos se realiza con un integrador personal PE NELSON Modelo 1022. El equipo se obtuvo en el marco de un convenio de cooperación con Alemania.

La identificación de los constituyentes se realiza por comparación de tiempos de retención con los de una colección de estándares (Sigma, pureza > 99%, que incluye aromáticos y alifáticos).

La cuantificación se realiza por integración del área bajo los picos (total o individual), usando n-hexadecano como estándar interno (su concentración en el residuo es insignificante).

La determinación de la concentración es realizada por personal del LASEISIC-UNLP.

### **III.2.3.a.3 Determinación del contenido de hidrocarburos totales por espectrometría infrarroja (HT-IR).**

La concentración de hidrocarburos totales (HT) se evalúa previa extracción con  $\text{Cl}_4\text{C}$  (Merck, p.a.), mediante espectrometría infrarroja siguiendo la norma de la U.S. Environmental Protection Agency (EPA) método N° 418.1 modificada. La modificación consiste en la separación de la fracción polar por filtración a través de silica-gel activada.

La determinación de la concentración es realizada por personal del CINDECA-UNLP.

### **III.2.3.b Determinación del pH por método potenciométrico, (Dibble and Bartha, 1979).**

A partir de una suspensión residuo-agua destilada o mezcla tierra-residuo-agua destilada (1:1, P/V).

### **III.2.3.c Determinación del contenido de humedad.**

Mediante la determinación del peso constante luego del calentamiento de muestras de tierra a 105°C durante 24 hs, expresado como porcentaje de humedad.

## **III.2.4 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS**

### **III.2.4.a Recuento de microorganismos viables.**

#### **Preparación de las suspensiones microbianas.**

Se pesa una cantidad determinada de tierra del sistema tierra-residuo, equivalente a 10 g de tierra seca y se homogeneizan en 100 ml de solución fisiológica de NaCl (0.85%) estéril. Se lleva a un agitador rotatorio a 150 r.p.m. durante 30 min.

Luego de sedimentar las partículas groseras de la suspensión, aproximadamente 5-10 min., el sobrenadante obtenido se considera representante del total de la comunidad microbiana incluyendo las células absorbidas sobre las pequeñas partículas de la suspensión de tierra.

Se realizan diluciones seriadas (1/10) de la suspensión de tierra en solución fisiológica y a partir de las cuales se determinan el número de microorganismos viables de las diferentes poblaciones:

Número de bacterias heterótrofas cultivables (BH) en R2-Agar suplementado con cicloheximida.

Número más probable (NMP) de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDHC) en MML suplementado con resazurina y extracto del residuo.

Número más probable (NMP) de bacterias degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos (BDPHA), en MML suplementado con una mezcla de PAH.

Número de hongos en RB-Agar suplementado con estreptomicina.

Número de bacterias heterótrofas cultivables (BH) en R2-Agar suplementado con cicloheximida.

#### **III.2.4.a.1 Número de unidades formadores de colonias en superficie de medios sólidos (UFC/g tierra seca).**

Se siembra 0.1 ml de cada dilución en la superficie del medio de cultivo, por triplicado y se esparce con espátula de Drigalsky. Se deja incubar durante 10 días a  $22 \pm 2$  °C. El resultado se expresa como en número de UFC/ g de tierra seca.

#### **III.2.4.a.2 Número más probable (NMP) de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDHC) en MML suplementado con resazurina y extracto del residuo.**

Se implementa la técnica del Número Más Probable (NMP), para 5 tubos, utilizando el MML suplementado con resazurina (1mg/l). Cada set de 5 tubos conteniendo 5 ml del MML es inoculado con un volumen de una dilución apropiada.

Se utiliza la combinación de 5 tubos por cada una de 3 ó 4 diluciones por determinación.

Como fuente de carbono y energía se incorpora al 0.5% el extracto de hidrocarburos obtenido a partir del residuo mediante extracción con una mezcla de n-hexanos de Merck.

Se incuban a  $22 \pm 2$ °C durante 40 días. La lectura se realiza considerando el número de tubos inoculados en cada dilución, el número de tubos positivos y el volumen inoculado.

El color de los tubos positivos varía desde el violáceo al rosa, como resultado de la reducción de la resazurina por el consumo microbiano de oxígeno.

El valor del NMP/ml se calcula mediante un programa de computadora que acepta más combinaciones de replicados y diluciones que los publicados en tablas (Comunicación personal, Pérez, 1999). El resultado se expresa como el NMP de bacterias degradadoras de hidrocarburos totales/ g de tierra seca.

#### **III.2.4.a.3 Número más probable (NMP) de bacterias degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos (BDPHA), en MML suplementado con una mezcla de PAH (MIX).**

El NMP de bacterias degradadoras de PAH se determina en placas de microtitulación de 96 pocillos.

Se utiliza como sustrato la mezcla de PAHs en pentano que se incorpora a razón de 20 µl por pocillo. El pentano se evapora rápidamente, dejando una fina capa de los PHAs en el fondo de cada pocillo. Posteriormente se cargan los pocillos con 180 µl del MML y con 20 µl de las

diluciones de la suspensión del sistema de tierra. Se siembran las diluciones seriadas (1/10) por octuplicado.

Las placas son incubadas a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 21 días.

Luego del período de incubación se registran los pocillos positivos, donde se observa una coloración del amarillo, naranja al marrón debido a la acumulación de los productos parciales de la oxidación de los sustratos aromáticos.

El valor del NMP/g se calcula mediante un programa de computadora que acepta más combinaciones de replicados y diluciones que los publicados en tablas (Comunicación personal, Pérez, 1999). El resultado se expresa como el NMP de bacterias degradadoras de PAH/ g de tierra seca.

#### **III.2.4.a.4 Número de hongos en RB-Agar suplementado con estreptomycin.**

Se siembra 0.1 ml de cada dilución en superficie del medio RB-Agar esparciendo con la espátula de Drigalsky. Las determinaciones se realizan por triplicado.

Las placas se incuban a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 5 días. El resultado se expresa como en número de UFC/ g de tierra seca.

#### **III.2.4.a.5 Método de recuento por extinción en medio líquido (Widdel and Bok, 1992).**

Se siembra 1 ml de la muestra en un tubo con tapa a rosca conteniendo 9 ml del medio de cultivo. Se homogeneiza y luego se extrae asepticamente 1 ml del medio inoculado y se siembra en un segundo tubo con 9 ml del medio de cultivo. Y así, sucesivamente se siembran los siguientes tubos realizando diluciones seriadas 1:10.

Los tubos se incuban en jarra anaeróbica a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 21 días. Los resultados se expresan según el siguiente criterio:

	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 4
Nro. de bacterias/ml	1 - 10	10 - 100	100 - 1000	1000 - 10000

#### **III.2.4.b Aislamiento e identificación de cultivos puros.**

A partir de los recuentos de bacterias heterótrofas en R2-Agar son seleccionadas entre 20 y 30 colonias de cada placa de una misma dilución (diluciones más altas) con una adecuada cantidad de colonias. Como medio de subcultivo se utiliza R3-Agar.

Luego de sucesivos aislamientos la homogeneidad de los cultivos es controlada microscópica y macroscópicamente.

También son aislados los cultivos degradadores de hidrocarburos a partir de los tubos positivos correspondientes a las mayores diluciones del NMP y de los pocillos positivos de las placas de microtitulación en la determinación de las bacterias degradadoras de los PAHs.

En todos los casos de aislamiento de bacterias heterótrofas y degradadoras, los cultivos obtenidos son considerados predominantes de cada muestreo, en cada sistema.

Los cultivos son clasificados de acuerdo a la coloración de Gram, movilidad, morfología bacteriana, aspecto-color de la colonia en la superficie de R3-Agar, utilización oxidativa-fermentativa de la glucosa según Hugh y Leifson, actividad de catalasa y oxidasa.

Los cultivos correspondientes a bacilos Gram negativos y no fermentadores de glucosa son analizados mediante el sistema de identificación API-20ne bioMerieux (Francia).

Son 21 los tests que incluye esta batería: reducción de nitratos; formación de indol; fermentación de glucosa; arginina dihidrolasa; ureasa; hidrólisis de esculina; hidrólisis de gelatina;  $\beta$ -galactosidasa; citocromo oxidasa; asimilación de glucosa, arabinosa, manosa, manitol, N-acetil-glucosamina, maltosa, gluconato, caprato, adipato, malato, citrato y fenil-acetato.

Los cultivos Gram positivos son clasificados según sus características tintoreales, morfológicas, movilidad y mediante las siguientes determinaciones bioquímicas: hidrólisis de urea, esculina, gelatina, caseína y arginina; producción de indol; reducción de nitratos, actividad  $\beta$ -galactosidasa, citocromo oxidasa y catalasa.

#### **III.2.4.c Determinación del espectro degradador de hidrocarburos de los cultivos aislados.**

Los cultivos puros fueron sembrados en MML suplementados con el hidrocarburo seleccionado como única fuente de Carbono y energía.

Son probados dos grupos de hidrocarburos: grupo alifático y el grupo policíclico aromático.

- ⊕ Degradación de hidrocarburos alifáticos: En MML suplementado con 1% del hidrocarburo, como única fuente de carbono y energía. La capacidad degradadora se determina por la aparición de desarrollo visible (Bade y col. 1994).
- ⊕ Degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos: En MML suplementado con 0,1% del cada PAH: naftaleno, fenantreno, dibenzotiofeno, fluoreno y pireno. La capacidad degradadora se determina por la aparición de turbidez y/o color desarrollado por los productos de degradación (Bogardt et al. 1992 ).

#### **III.2.4.d Medida de la capacidad catalítica de la biocenosis completa.**

La actividad microbiana de la microflora autóctona en cada sistema es evaluado a través de la Actividad Hidrolasa y de la Actividad Deshidrogenasa.

##### ***III.2.4.d.1 Actividad microbiana de hidrolasas, mediante hidrólisis del Diacetato de Fluoresceína (FDA) (Schnürer y Rosswall ,1982).***

Todos los microorganismos contienen enzimas como lipasas, esterasas y proteasas que hidrolizan el diacetato de fluoresceína. La fluoresceína liberada es medida colorimétricamente. Procedimiento: se pesa una cantidad de tierra correspondiente a 1 g seco y se homogeneiza en un erlenmeyer de 125 ml de capacidad con 25 ml de buffer fosfato de sodio (60 mMol, pH 7,6) y el agregado de una solución de FDA (2 mg/7ml de acetona, conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$ ). La concentración final de FDA es 10  $\mu\text{g/ml}$ .

Se incuba a  $20^{\circ}\text{C}$  en agitador rotatorio durante un determinado tiempo a 150 rpm. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se frena la reacción agregando 25 ml de acetona (concentración final 50 v/v). La suspensión se centrifuga 10-15 minutos a 2000g.

La absorbancia (DO) del sobrenadante es medida a 490 nm utilizando como blanco una muestra sin el agregado de tierra). Los resultados son expresados como  $\text{DO}_{490\text{nm}}/\text{g}$  seco de tierra.

##### ***III.2.4.d.2 Actividad microbiana de deshidrogenasas, con Cloruro de Trifenil Tetrazolium (TTC) (Thalman, 1968).***

El método mide la actividad deshidrogenasa de las células intactas. El TTC (sustrato) es reducido a Trifenilformazán (TPF) que es detectado colorimétricamente a 546 nm.

En el procedimiento se pesan 5 g de tierra húmeda en frascos de 50 ml de capacidad y se le agregan 5 ml de una solución de TTC preparada al 1% en buffer Tris-HCl (100 mMol).

El pH del buffer utilizado varía según el pH de la muestra. Para suelos ácidos se utiliza buffer pH 7,7; para suelos neutros pH 7,6 y para suelos alcalinos pH 7,4.

La determinación se realiza por triplicado. Como blanco de la reacción se incuba la muestra con buffer sin el agregado de la solución de TTC.

Los frascos cerrados son incubados a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 24 Hs.

Luego de transcurrido el tiempo de incubación se frena la reacción con 40 ml de acetona.

Se dejan en la oscuridad durante 2 hs agitándolos cada 30 minutos. Posteriormente una porción del extracto de la muestra de tierra es filtrado y leída su absorbancia a 546 nm contra el extracto correspondiente al blanco.

Debido a la sensibilidad frente a la luz de las soluciones de TTC el procedimiento se realiza bajo la luz difusa.

Los resultados son expresados como  $\mu\text{g}$ . de TPF producido por gramo seco de tierra utilizando una curva de calibración.

#### **Realización de la curva de calibración**

Se prepara una solución standard de 50 mg de TPF disuelto en 100 ml de acetona.

A partir de esta solución se transfieren 0,5- 1,0- 2,0- 3,0- y 4,0 ml a los respectivos matraces de 50 ml de capacidad. Se le agrega a todos 8,3 ml de buffer pH 7,6 y se enrasan a volumen con acetona.

A continuación se mide la absorbancia (OD) de las soluciones a 546 nm, correspondiendo a 5, 10, 20, 30 y 40  $\mu\text{g}$  de TPF/ml respectivamente.

### **III.2.5 MÉTODOS MOLECULARES**

#### **III.2.5.a Recuento de microorganismos por hibridación in situ con sondas rDNA marcadas.**

La hibridación in situ se realiza de acuerdo al protocolo descrito por Bruns y Berthe-Corti, 1998.

Un volumen de 3  $\mu\text{l}$  de una suspensión de suelo de cada sistema es aplicado en pocillos formados sobre portaobjetos especialmente preparados.

Los portaobjetos son preparados de forma especial de la siguiente manera: son sumergidos en una solución de gelatina 0,1% y  $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$  0,01%, de manera que luego de secados se forma una fina capa de gelatina en la superficie de donde se recortan pequeños discos formándose los pocillos.

Luego de depositar las muestras en los pocillos, se realiza la deshidratación por inmersión del preparado durante 3 minutos cada vez en 50, 80 y 96% (v/v) de etanol.

A continuación se realiza la hibridación con 7  $\mu\text{l}$  del buffer de hibridación (3,5% de formamida, 0,9% NaCl, 10mM Tris/HCl, 0,01% SDS, pH: 7,4) más 0,75  $\mu\text{l}$  de la solución de la sonda del oligonucleótido (100  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) a 48°C durante 60 minutos (La sonda ALF1b se agrega al buffer de hibridación al doble del volumen indicado).

El procedimiento de hibridación se realiza en una cámara húmeda cerrada para evitar las pérdidas de la solución por evaporación.

Luego de la hibridación, los portaobjetos se lavan en un buffer 40mN de NaCl, 20mM Tris/HCl y 0,01% (p/v) SDS durante 20 minutos a 48°C, y finalmente con agua de calidad Millipore dejándolos secar al aire.

Una vez secos, cada pocillo del portaobjetos se cubren con 4µl de un medio que evita la pérdida gradual de la intensidad de la señal. Este medio esta formado por una mezcla de una solución de DAPI (1µg 4',6-diamino-2-fenil-indol /ml) y una solución de Dabco (25 mg 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano en 1ml de buffer fosfato y 9ml de glicerina).

Las preparaciones se examinan con un equipo Zeiss Axioskop equipado para la detección de fluorescencia con una lámpara de alta presión de mercurio de 50W y filtros 01 (excitación 365 nm, emisión 397 nm) y 15 (excitación 546 nm, emisión 590 nm).

### Sondas de oligonucleótidos

Se utilizan 6 sondas de rDNA marcadas con el colorante fluorescente Cy3 (Interactiva), Tabla . La sonda EUB338 se utiliza como control positivo para evaluar la eficiencia de la hibridación.

**Tabla :** Secuencias, posición en el sitio blanco y especificidad de las sondas oligonucleótido rDNA-marcada con colorante fluorescente utilizadas en la hibridación *in situ*. (Bruns y Berthe-Corti, 1998).

Sonda	Secuencia (5'-3') de la sonda	Posición en blanco (rRNA)	Especificidad
EUB338	GCT GCT TCC CGT AGG GAG T	16S, 338-355	Eubacterias
ALF1b	CGT TCG YTC TGA GCC AG	16S, 19-35	α-Proteobacteria, varios miembros de δ-Proteobacteria y mayoría de espiroquetas.
BET42a	GCC TTC CCA CTT CGT TT	23S, 1027-1043	β-Proteobacteria
GAM42a	GCC TTC CCA CAT CGT TT	23S, 1027-1043	γ-Proteobacteria
SRB385	CGG CGT CGC TGC GTC AGG	16S, 385-402	Mayoría de miembros δ-Proteobacteria.
CF319a	TGG TCC GTG TCT CAG TAG	16S, 319-336	Mayoría de los miembros del grupo Cytophaga/Flavobacterium (cluster del phylum CBF), pocas bacterias Gram-positivas.
GPHGC	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	23S, 1901-1918	Gram-positivas con alto contenido de (G+C) DNA.

### Recuento

Para la lectura cada pocillo del portaobjetos de 6mm de diámetro es subdividido en 9 campos. El número de células por campo se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Células/ml} = N_m \times 2,48 \times 10^5 \times \text{factor de dilución}$$

$N_m$  = valor promedio del número de células contadas en los 9 campos.

$2,48 \cdot 10^5$  = factor de conversión que considera el volumen aplicado en cada pocillo y la relación entre el área del pocillo y el área de un campo con un aumento de 1000x.

Para evitar los errores causados por las partículas autofluorescentes de suelo o del residuo, únicamente las células teñidas con los dos colorantes DAPI y el Cy3 son consideradas para el cálculo de la eficiencia de la hibridación.

De esta manera, cada célula es observada primero con el filtro 01 que lee las células teñidas con DAPI dando una señal de epifluorescencia azul y luego con el filtro 15 donde únicamente aquellas células hibridizadas con la sonda específica muestran una señal de epifluorescencia roja.

#### III.2.5.b Determinación de perfiles de 16S RDNA por el método de PCR-DGGE.

##### Extracción del DNA

La extracción del DNA total se realiza según la técnica de lisis directa en el suelo, sobre muestras de 2 g de tierra-residuo y tierra control después de 2, 30, 60, 180 y 375 días de tratamiento.

Se mezclan vigorosamente 2g de muestra con 5 ml de buffer TENS (50mM Tris [pH 8.0], 20mM EDTA disódico, 100mM NaCl, 1% [p/vol] dodecil sulfato de sodio), luego se incuba durante 1 hora en baño de agua a 70°C. Durante la incubación la muestra es mezclada a intervalos de 15 min. (Kuske y col., 1997).

Luego de la incubación, las muestras son centrifugadas a 6,000 x g durante 10 min. reservando el sobrenadante. El precipitado es resuspendido en 5ml de buffer TE (10mM Tris [pH 8.0], 1mM EDTA disódico) con el agregado de 3 g de perlas de vidrio ( $\varnothing$  710 - 1,180  $\mu$ m).

Para la ruptura de las células, las muestras se vortean 4 veces con intervalos de 1 minuto y luego se agitan vigorosamente a mano tres veces, con intervalos de un minuto (Kuske y col., 1997). Nuevamente, las muestras son centrifugadas a 6000 x g por 10 min. y el sobrenadante obtenido se mezcla con el original.

El DNA es extraído de la suspensión con la mezcla de cloroformo: isoamil alcohol (24:1) seguido de la precipitación con acetato de amonio 7.5 M-etanol. El material precipitado es resuspendido 100  $\mu$ l de buffer TE.

La presencia de DNA es analizada mediante una electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio.

Para el posterior análisis molecular, el DNA crudo es purificado de los ácidos húmicos y otros contaminantes utilizando Genomic-tips (20/G) de Quiagen (Quiagen Inc., Chatsworth, Calif.).

Luego de la purificación, se estima el rendimiento del DNA extraído aplicando 1  $\mu$ l de cada muestra, junto con varios estándares de DNA, en una placa de Petri conteniendo agarosa teñida con bromuro de etidio.

Una vez secas las muestras de DNA, se determina la concentración por comparación de las manchas originadas por las muestra con las originadas por los estándares en un transiluminador-UV.

### **Amplificación mediante PCR**

Se utilizan los primers 341f y 907r (Muyzer y col., 1998) para la amplificación del fragmento 626-pb del 16S-rDNA.

Para mejorar la separación de los fragmentos durante el subsiguiente análisis de DGGE, se agrega una secuencia rica en GC (GC-clamp) en el extremo 5'-del primer 341f.

La reacción de PCR contiene 1  $\mu$ l de la muestra de DNA, 1U de la enzima Taq-polimerasa, 200mM of BSA, 0,4 mM dNTPs y 20 pM de cada primer en un volumen total final de 50  $\mu$ l.

La amplificación es realizada en un Perkin Elmer Gene Amp System 9600. El programa incluye un paso inicial de desnaturalización de 4 min. a 95°C, un segundo paso de 30 seg. a 94°C, 45 seg. a 62°C, y 1 min. a 72°C (10 ciclos), seguido de un tercer paso de 30 seg. a 94°C, 40 seg. a 57°C, y 1 min. a 72°C (25 ciclos), más una extensión final de 10 min. a 72°C.

Los productos de PCR se analizan mediante una electroforesis en gel de agarosa y purifican con un kit comercial (Quiagen Inc., Chatsworth, Calif.).

### **DGGE**

La DGGE es realizada en un BioRad D GENE System (BioRad, Munich Germany).

Los productos purificados de PCR se aplican directamente sobre geles de poliacrilamida 6% (p/vol), preparados con una solución stock de acrilamide (acrylamide-N,N'-methylenebisacrylamide, 37,5:1). El gel contiene un gradiente lineal de 40 a 70% del agente desnaturalizante (100% desnaturalizante corresponde a la mezcla de urea 7M y formamida 40% (vol/vol)).

La electroforesis se realiza en buffer TAE 1x (20 mM Tris acetate [pH7.4], 10mM acetato de sodio, 0.5 mM EDTA disódico) a una temperatura de 60°C. Luego de una primera corrida a 50V por 30 min. se aplica un voltaje constante de 100V durante 16 hs para la corrida principal. Luego de la electroforesis, el gel se tiñe durante una hora con SYBR-gold (Molecular probes, Eugene, USA).

El gel es digitalizado en una cámara-CCD, guardado como archivo.tif y analizado utilizando un software de GelComparII (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Se determina la densidad óptica de las bandas y se transforman en un densitograma. Los perfiles generados sirven como base para el cálculo de la matriz de similitud utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (Pearson, 1926). El dendrograma es calculado mediante el método del promedio aritmético no ponderado (UPGMA) (Sokal y Michener, 1958).

**CAPÍTULO IV**

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Análisis del residuo petroquímico.**

## IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN: ANÁLISIS DEL RESIDUO PETROQUÍMICO

### IV.1 DESCRIPCIÓN DEL RESIDUO: ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

El material estudiado corresponde a un residuo de la industria del Polo Petroquímico Ensenada. Es un barro residual del sistema de tratamiento primario de efluentes.

Básicamente, al pasar el efluente por un separador gravitatorio (separador API) permite recuperar los hidrocarburos de menor densidad que pasan a un proceso de recuperación secundaria y un barro constituido por un sedimento mineral con cantidades apreciables de hidrocarburos adheridos (Bartha y Bossert, 1984).

El residuo ha sido generado durante los últimos 10 años y almacenado por la industria en playas de barros. Las características de estas playas cambian con las condiciones climáticas, presentando una superficie líquida en épocas de lluvia o una superficie de barros sólidos en verano. Debido a la gran heterogeneidad que presentan, las tomas de muestra se realizan a diferentes profundidades, se mezclan y conservan en recipientes de polipropileno con tapa a rosca, homogeneizando su contenido antes de cada uso (Vecchioli, 1998).

El barro así conservado es semisólido, de color marrón oscuro y de olor penetrante.

Este residuo ha sido ampliamente caracterizado desde el punto de vista químico y biológico por Vecchioli, 1998 y toxicológico por Morelli, 1999.

La Tabla IV-1 muestra las principales características fisicoquímicas del barro denominado residuo API-2 por Vecchioli. En este estudio el residuo se denominará simplemente API.

**Tabla IV-1:** Características fisicoquímicas del residuo API (Vecchioli, 1998)

Densidad (g/ml)	pH	Agua (%)	Cenizas a 900°C (%)	Fracción Extractable en éter (%)	Volátiles a 105 °C (%)	Hidrocarburos (%)		
						Alifáticos	Aromáticos	Asfálticos
1,013	10,41	72,66	3,81	11,63	10,88	17,70	55,70	26,60

Está constituido, mayoritariamente, por hidrocarburos aromáticos polinucleares (PAH) más otros hidrocarburos peligrosos como tolueno, etilbenceno y xilenos y por hidrocarburos alifáticos volátiles de bajo peso molecular (menor que  $C_{12}H_{26}$ ), hasta hidrocarburos de 24 átomos de carbono.

El contenido de hidrocarburos totales de 116,30 g/kg de barro, determinado gravimétricamente mediante la extracción en éter, corresponde a 91 g de hidrocarburos cromatografiados /kg de barro (Vecchioli y col., 1997).

El análisis toxicológico del residuo demuestra su genotoxicidad directa e indirecta mediante el test de Ames (Morelli, 1999).

## IV.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL RESIDUO

La presencia y abundancia de organismos en un ambiente están determinadas no solo por los nutrientes sino también por la naturaleza de la matriz que los contiene y factores fisicoquímicos como la temperatura, el potencial redox, el pH, entre otros.

En un ecosistema, un compuesto puede estar presente de una forma no disponible para los microorganismos. Los compuestos tóxicos, por ejemplo, pueden estar unidos a partículas de arcilla limitando la interacción con los microorganismos. De esta manera los microorganismos resultan protegidos de los efectos directos del tóxico y pueden tolerar altas concentraciones del material.

En cambio, si los compuestos adsorbidos a las partículas de arcilla fueran una fuente potencial de carbono y energía, estas condiciones reducirían la disponibilidad de nutrientes y podría impedir el desarrollo microbiano (Atlas y Bartha, 1998).

Las características físico-químicas y toxicológicas determinadas en el residuo API, hacen que este barro pueda considerarse un ambiente adverso para el desarrollo microbiano, sin embargo es posible que al tratarlo mediante un proceso de biorremediación en suelo, los microorganismos presentes en él puedan establecerse e integrarse a la comunidad del suelo.

A partir de varias muestras del residuo API ha sido determinado un número de bacterias cultivables en PC-Agar a 30°C durante 48hs, entre  $10^3 - 10^5$  /g (Vecchioli, 1998).

Las condiciones de cultivo aplicadas en la determinación anterior, favorecen el desarrollo de las poblaciones copiotróficas, que pueden haber llegado al barro desde ambientes vecinos y permanecer en éste, sin colonizar el hábitat.

Un mayor grado de acercamiento a las condiciones del ambiente adverso que constituye el residuo, podría obtenerse mediante la evaluación de poblaciones específicas (oligotróficas y degradadoras), que desarrollan a menor temperatura (23°C) y más lentamente.

De esta manera, con la intención de caracterizar el hábitat microbiano se determinan los tamaños de poblaciones bacterianas heterótrofas (BH), degradadoras de hidrocarburos (BDHC) y anaerobias estrictas sulfato-reductoras (BSR) capaces de desarrollar a 23°C en 10 días (BH y BSR) y 21 días (BDHC). También se determina el tamaño de la población fúngica en RB-agar a 23°C durante 10 días de incubación.

El medio de cultivo seleccionados para la determinación de las BH es el R2-agar. Un medio adecuado para el aislamiento de microorganismos oligotróficos caracterizados por la

capacidad de utilizar una gran variedad de sustratos escasamente disponibles (Reasoner y Geldreich, 1985).

Para determinar la población BDHC se utiliza la técnica del NMP en medio mineral líquido, suplementada con hidrocarburos (Song y Bartha, 1990), que permite la cuantificación de aquellos microorganismos capaces de desarrollar a expensas de los hidrocarburos del residuo como única fuente de carbono y energía.

Debido al aspecto heterogéneo de la muestra (presencia de flóculos) y a las características del almacenamiento en las playas (sedimentación en capas), se consideró interesante la determinación del número de bacterias anaerobias estrictas para completar la caracterización del ambiente microbiológico. Para ello se utiliza el medio Postgate B, un medio líquido que permite el desarrollo de las bacterias sulfato reductoras que asimilan acetato como única fuente de carbono y energía (Widdel and Bok, 1992).

Considerando que el residuo será dispuesto según la técnica de biorremediación en suelo y con el objetivo de evaluar si alguna población de la comunidad microbiana del residuo logra establecerse en el suelo durante el tratamiento aeróbico, se analiza la estructura de la comunidad bacteriana cultivable. Para tal fin se determinan los cultivos predominantes aislados directamente del residuo a partir de los recuentos de las poblaciones BH y BDHC. Finalmente, con el fin de correlacionar la composición química del residuo con las propiedades degradativas de los cultivos dominantes, se analiza el espectro degradador de hidrocarburos seleccionando aquellos representativos de su composición química. Dentro de la clase de hidrocarburos alifáticos, se seleccionan los de cadena media C14, C16, C18, C20 y C24 (en esta determinación no son probados los de cadena corta debido a sus propiedades tóxicas). Representando a los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), se seleccionan naftaleno, fenantreno, dibenzotiofeno, fluoreno y pireno.

#### ***IV.2.1 DETERMINACIÓN DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS EN EL RESIDUO API.***

La Tabla IV-2 muestra el número de bacterias heterótrofas cultivables en R2-agar (BH), el NMP de bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDHC), el número de bacterias sulfato-reductoras (BSR) en Postgate B y el número de hongos en RB-agar, determinados a partir del residuo.

**Tabla IV-2:** Tamaño de las poblaciones bacterianas aeróbicas BH, BDHC, anaeróbica sulfato-reductoras y población fúngica determinadas en el residuo API.

<i>Población</i>			
BH (Ufc/g)	BDHC (NMP/g)	BSR <sup>1</sup> (bacterias/g)	Fúngica (Ufc/g)
$11 \cdot 10^4 \pm 2,4 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^4 \pm 8 \cdot 10^3$	$10^4 - 10^5$	< 100

De acuerdo con los datos presentados en la Tabla IV-2, se observa que, la población anaeróbica estricta es tan abundante como la aerobia, mientras que la población fúngica es francamente minoritaria, ya que se encuentra por debajo del límite de detección del método empleado. El significativo número de BSR indica que, en la playa de barros se han dado las condiciones anaeróbicas suficiente para el establecimiento de esta población.

La población BDHC representa alrededor del 80% de la población BH cultivable en R2-agar, indicando que un alto porcentaje de la población heterótrofa es degradadora de hidrocarburos.

El recuento de BH determinado para esta muestra de residuo esta comprendido en el rango determinado para otras muestras del mismo residuo,  $10^3 - 10^5$  Ufc/g, pero utilizando PC-agar, incubado 48hs a 30°C (Vecchioli, 1998). Comparando los resultados de ambas determinaciones podría inferirse que la población copiotrófica determinada en PC-agar es la determinada en R2-agar como población oligotrófica.

Obviamente, una población puede competir satisfactoriamente en ambos ambientes, oligotróficos y copiotróficos, únicamente si puede cambiar y adaptar sus características fisiológicas apropiadamente.

La clasificación de los microorganismos en la categoría de típicamente oligotrófico o copiotrófico es arbitraria. La capacidad de utilizar nutrientes a altas o bajas concentraciones también depende de los compuestos utilizados como medios para la detección, indicando que oligotrófico o copiotrófico son conceptos vagamente definidos (Kovárová-Kovar y Egli, 1998).

#### IV.2.2 ANÁLISIS DE LA COMUNIDAD BACTERIANA DEL RESIDUO API MEDIANTE EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS CULTIVOS PREDOMINANTES.

A partir de los recuentos de la población BH realizados en superficie de R2-agar, se aíslan alrededor de 50 colonias (de la misma dilución) en R3-agar. Luego de sucesivos aislamientos, los cultivos puros son conservados en R3-agar a 4°C hasta su identificación. El mismo procedimiento se aplica a partir de los aislamientos realizados de los pocillos positivos (viraje del indicador resazurina a rosa) correspondientes a las mayores diluciones, en la técnica de recuento del NMP de la población BDHC. Se aíslan aproximadamente 30 cultivos degradadores.

#### IV.2.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS DOMINANTES DE LA POBLACIÓN BH Y BDHC.

Se aíslan hasta repique puro 74 cultivos, 46 representativos de la población BH y 28 de la población BDHC.

La Tabla IV-3 muestra una primera descripción basada en las características macro-microscópicas de los cultivos dominantes y el tipo de metabolismo según la reacción de Hugh y Leifson (Gerhard y col., 1981), suplementado con glucosa al 1%.

**Tabla IV-3:** Descripción macro-microscópica de los cultivos dominantes en el residuo pertenecientes a las poblaciones BH y BDHC.

<i>Población</i>	<i>Macro</i>	<i>Micro</i>	<i>Gram</i>	<i>Mov.</i>	<i>OF-glu</i>
BH-1	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-2	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-3	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-4	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-5	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-6	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-7	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-8	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-9	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-10 (t)	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-10 (b)	Blanq. extendida	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	O
BH-11	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-12	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F

BH-13	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	+	+	I
BH-14	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-15	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-16 (t)	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	O
BH-16 (a)	Amarilla grumosa	Pequeños cocoides de a pares	-	-	I
BH-17	Cremosa blanquecina	Bacilos regulares aislados y pares	-	-	F
BH-18	Cremosa blanquecina	Bacilos de apares esporulados	+	+	O
BH-19	Cremosa blanquecina	Bacilos regulares aislados y pares	-	-	F
BH-20	Cremosa blanquecina	Bacilos regulares aislados y pares	-	-	O
BH-21	Cremosa blanquecina	Bacilos regulares aislados y pares	-	-	O
BH-22	Cremosa blanquecina	Largos bacilos aislados	-	-	I
BH-23	Cremosa blanquecina	Bacilos regulares aislados y pares	-	-	O
BH-24	Cremosa blanquecina	Bacilos regulares aislados y pares	-	-	F
BH-25	Membranosa grisacea	Bacilos regulares aislados	-	+	O
BH-26	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	-	O
BH-27	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	-	O
BH-28	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	-	F
BH-29	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	-	O
BH-30 (b)	Cremosa blanquecina	Bacilos regulares aislados	-	+	F
BH-30 (t)	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	O
BH-31	Cremosa blanq. irregular	Bacilos en cadenas esporulados	+	-	I
BH-32	Cremosa blanquecina	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-33	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-34	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-35	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-36	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-37	Transp. extendida amarr.	Gruesos bacilos medianos	-	+	O
BH-38	Cremosa blanquecina	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-39	Cremosa blanquecina	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	O
BH-40	Cremosa blanquecina	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	O
BH-41	Membranosa gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	O
BH-43	Cremosa blanquecina	Bacilos regulares aislados y pares	-	-	O
BH-44	Cremosa blanquecina	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	O
BH-45	Cremosa blanquecina	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	O
BH-46	Transp. extendida gris	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	F
BH-47	Cremosa blanquecina	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	I

BH-48	Mucoide blanquecina	Bacilos regulares aislados y pares	-	+	O
BDHC-1	Blanq. extendida	Bacilos rectos aislados	-	+	F
BDHC-2	Blanq. extendida	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	F
BDHC-3	Blanca cremosa	Bacilos rectos largos aislados	-	-	F
BDHC-4	Blanca cremosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	F
BDHC-5	Blanca cremosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	F
BDHC-6	Blanca cremosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	F
BDHC-7	Transp. extendida blanq.	Bacilos rectos cortos de a pares	-	-	F
BDHC-8	Blanca cremosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	F
BDHC-9	Transp. extend. Verdosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	O
BDHC-10	Blanca cremosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	F
BDHC-11	Transp. extend. Verdosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	O
BDHC-12	Transp. extend. Verdosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	O
BDHC-13	Transp. extend. Verdosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	O
BDHC-14	Transp. extend. Verdosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	O
BDHC-15	Transp. extend. Verdosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	O
BDHC-16	Mucoide blanquecina	Bacilos pequeños aislados	-	+	O
BDHC-17	Transp. extend. verdosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	O
BDHC-18	Puntiforme grisácea	Bacilos finos aislados	-	+	O
BDHC-19	Transp. extend. Verdosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	O
BDHC-20	Blanca cremosa	Bacilos largos en cadena y cocoides	-	-	O <sub>lento</sub>
BDHC-21	Transp. extend. Verdosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	O
BDHC-22	Puntiforme blanca	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	O
BDHC-23	Blanca cremosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	F
BDHC-24	Transp. extendida gris	Bacilos largos y cocoides	-	+	F
BDHC-25	Blanca cremosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	F
BDHC-26	Blanca cremosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	F
BDHC-27	Transp. extend. Verdosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	O
BDHC-28	Blanca cremosa	Bacilos rectos cortos de a pares	-	+	F
BDHC-29	Transp. extendida gris	Bacilos cortos aislados	-	+	F
BDHC-30	Blanca cremosa	Bacilos cortos en masas	-	+	F

F: metabolismo fermentativo. O: metabolismo oxidativo. I: inerte frente a glucosa

#### IV.2.3.a Principales características de los microorganismos aislados directamente del residuo.

A partir de los resultados de la Tabla IV-3, puede observarse:

- Un franco predominio de cultivos Gram-negativos.
- El 52% de los cultivos dominantes de la población BH realizan un metabolismo del tipo fermentativo, el 38% un metabolismo oxidativo y un 10% es inerte frente a la glucosa.
- El 53% de los cultivos dominantes de la población BDHC realizan un metabolismo fermentativo y el 47% oxidativo.

#### IV.2.3.b Identificación de los cultivos Gram-negativos pertenecientes al Grupo fermentador de glucosa, dominantes de la población BH y BDHC.

Los cultivos Gram-negativos de ambas poblaciones, pertenecientes al grupo fermentador se sembraron según las siguientes pruebas: reacción en agar Triple-azúcar-hierro (TSI), caldo triptofano (producción de Indol), siembra en Caldo Clurk y Lubs (reacción del Rojo de Metilo y Voges Proskauer) y siembra en agar-Citrato de Simmons (Gerhard y col. 1981).

La Tabla IV-4 muestra los resultados de las pruebas bioquímicas y la clasificación en grupos.

**Tabla IV-4:** Clasificación de los cultivos Gram-negativos fermentadores de glucosa de la población BH y BDHC.

Población	Grupos	Agar-TSI	SH <sub>2</sub>	Indol	Rojo de Metilo	Voges-Proskauer	Asimilación de Citrato
BH	A (1)	H <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> , sin gas	-	+	(+)	-	+
	<b>B (20)</b>	<b>H<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, con gas</b>	-	-	-	-	+
	C (2)	H <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> , con gas	-	-	-	+	+
	D (1)	HO <sup>-</sup> /H <sup>+</sup>	-	-	-	+	(+)
BDHC	<b>E (10)</b>	<b>H<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, con gas</b>	-	-	-	<b>++</b>	<b>+</b>
	B (4)	H <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> , con gas	-	-	-	-	+

(+): reacción débil positiva. ++: reacción positiva intensa

En una primera caracterización de los cultivos fermentadores de ambas poblaciones se observa que excepto un cultivo (Grupo D), todos son fermentadores de glucosa y lactosa y asimilan citrato.

En la población BH se observa un grupo mayoritario de cultivos fermentadores donde no se detecta la capacidad de realizar la fermentación ácido-mixta ni la butilén-glicólica (marcado en rojo).

En la población BDHC se observa el predominio de cultivos "fermentadores neutros" productores de butilenglicol (marcado en rojo).

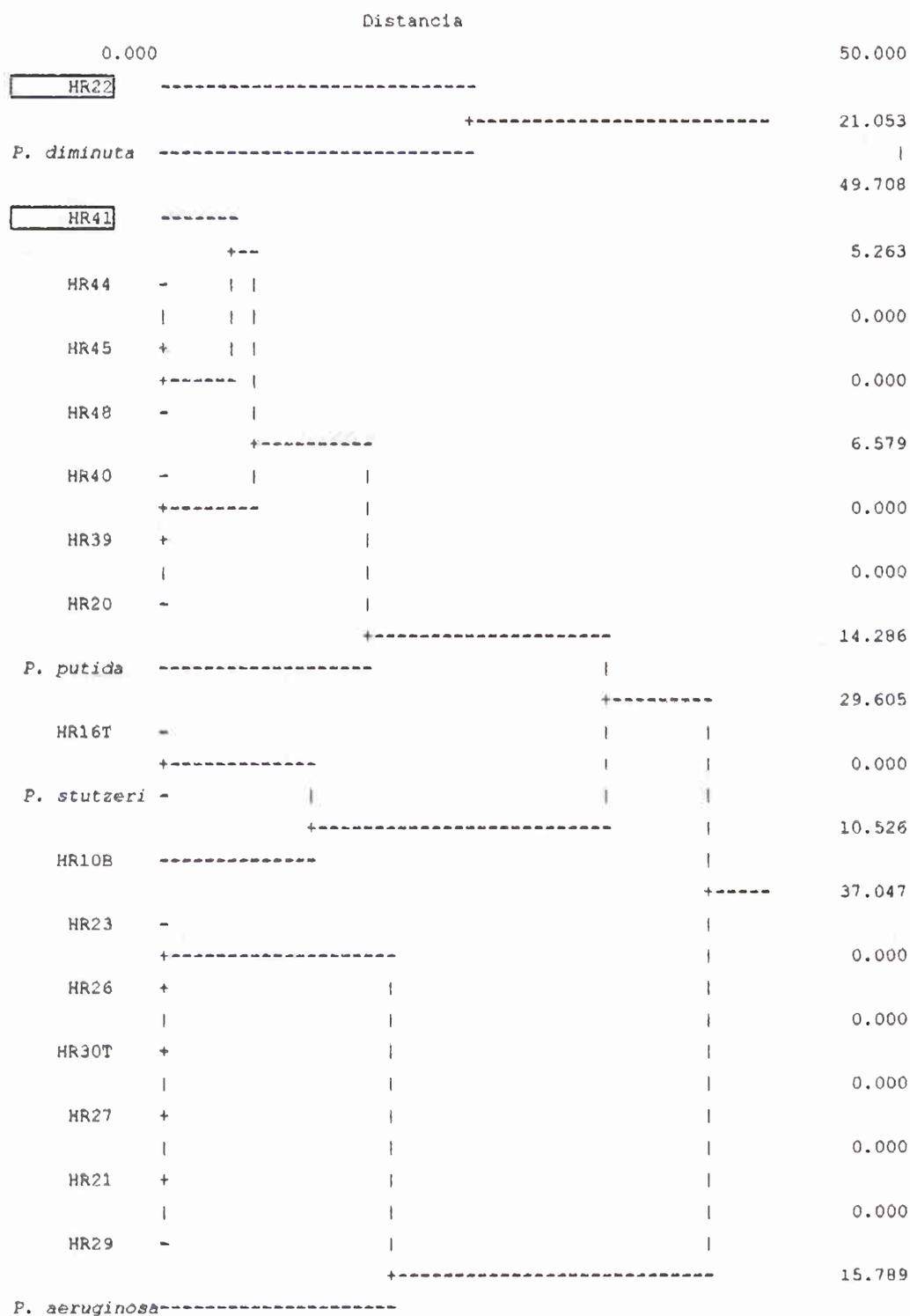
#### **IV.2.3.c Identificación de los cultivos Gram-negativos no fermentadores de glucosa en las poblaciones BH y BDHC, con el sistema de identificación API-20NE de bioMerieux**

Sobre un total de 30 cultivos fueron identificados con un nivel de identificación *aceptable* (Id%: 80%) 26 cultivos, representando un 87% de los aislados.

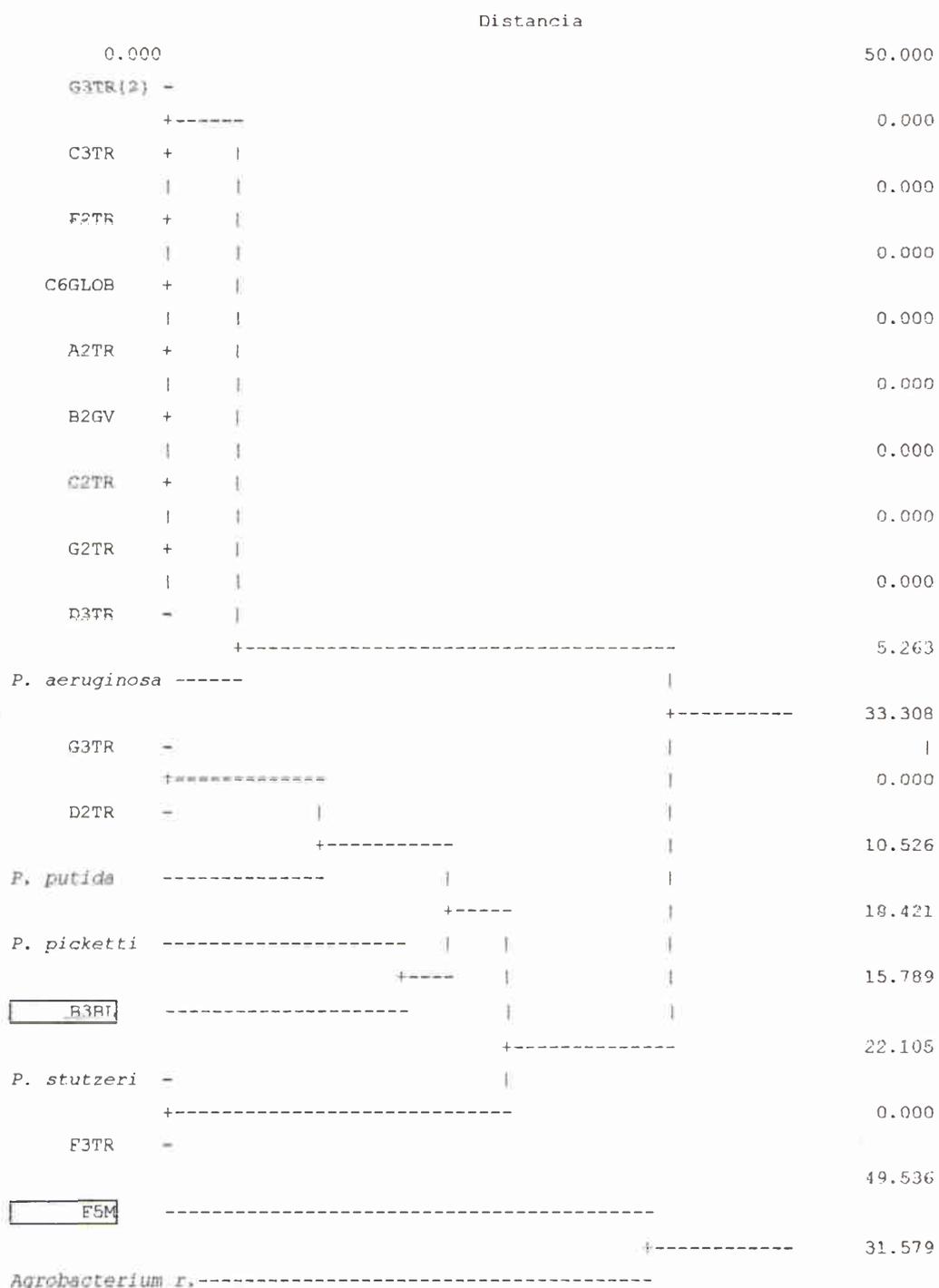
La identificación de los 4 cultivos restantes: HR-41, HR-22, DRB3bl y DRF5m fue estimada a través de coeficientes de Semejanza analizando los cultivos mediante un dendrograma con cepas de referencia.

Los cultivos Gram-negativos dominantes de la población BH se analizan en el Dendrograma-1 y los dominantes de la población BDHC en el Dendrograma-2.

Se incluyen en el análisis los perfiles de cepas de referencia de la base de datos del manual API de bioMerieux.



**Figura IV-1:** Dendrograma derivado del agrupamiento por ligamiento promedio no ponderado (UPGMA) de los coeficientes de similitud (Ssm) obtenidos mediante la comparación entre los 16 cultivos no fermentadores representativo de la Población BH aislados del residuo API, con las cepas de referencia. Distancia en porcentaje de disimilitud.



**Figura IV-2:** Dendrograma derivado del agrupamiento por ligamiento promedio no ponderado (UPGMA) de los coeficientes de similitud (Ssm) obtenidos mediante la comparación entre los 14 cultivos no fermentadores representativo de la Población BDHC aislados del residuo API con las cepas de referencia. Distancia en porcentaje de disimilitud.

La Tabla IV-5 muestra los resultados de la identificación de los cultivos Gram-negativos no-fermentadores de la glucosa, aislados de las poblaciones BH y BDHC.

**Tabla IV-5:** Abundancia de especies Gram-negativas no fermentadoras dominantes en las poblaciones BH y BDHC del residuo.

Especies	Cultivos en Población	Cultivos en Población
	BH (%)	BDHC (%)
<i>P. aeruginosa</i>	12	29
<i>P. diminuta</i>	2	-
<i>P. putida</i>	14	7
<i>P. stutzeri</i>	4	4
<i>P. picketi</i>	-	4
<i>Agrobacterium r.</i>	-	4

A partir de los datos de la Tabla IV-5 se aprecia que *P. aeruginosa* y *P. putida* son las especies Gram-negativas no fermentadoras dominantes de la población BH, mientras que *P. aeruginosa* es la predominante en la población BDHC.

Los resultados hasta aquí indican que, independientemente del método de recuento empleado, las condiciones ambientales generadas por el residuo permitirían una mejor adaptación de las poblaciones Gram-negativas que de las Gram-positivas.

Del análisis de las poblaciones se infiere que la comunidad estaría integrada por poblaciones que obtienen su energía mediante procesos fermentativos y mediante procesos oxidativos (respiración), y que su aparente estabilidad estaría dada por interacciones positivas. Probablemente en estas interacciones tome parte la población anaeróbica de bacterias sulfato-reductoras, dado el significativo recuento determinado.

Si bien la mayoría de las bacterias aerobias pueden realizar su metabolismo generador de energía sin alguna cooperación fundamental con otros microorganismos, numerosas bacterias degradan un sustrato solo parcialmente y excretan metabolitos intermediarios de la degradación. Otras bacterias pueden completar posteriormente el proceso de oxidación. Este tipo de cooperación se da facultativamente en la naturaleza, es decir que los miembros de la cooperación no dependen obligadamente uno de otro (Schink, 1999).

Considerando el aspecto heterogéneo del residuo dado por la presencia de flóculos y partículas en suspensión, es posible que en su interior se generen condiciones de anoxia, donde puedan prosperar los microorganismos anaeróbicos.

La formación y existencia de estos microhabitats puede explicarse a través de los procesos respiratorios de la microflora aeróbica que consumen la totalidad del oxígeno disponible.

A diferencia de la mayoría de las bacterias fermentativas, las BSR están más restringidas en sus posibilidades de utilizar compuestos orgánicos. Por ejemplo, las bacterias fermentativas

pueden usar polímeros como la celulosa o las proteínas; en cambio las BSR sólo utilizan compuestos de bajo peso molecular como son los productos de fermentación.

Si bajo estas condiciones de anoxia los sulfatos están presentes, los productos finales de los procesos fermentativos de la población aeróbica son usados por la población BSR; esta utiliza como aceptor de electrones al sulfato generando  $\text{SH}_2$ , aparte de la degradación de la sustancia orgánica.

Por lo tanto, en el residuo la integración de las BSR a la comunidad dependería de las bacterias que rompen y degradan fermentativamente las moléculas orgánicas complejas, para transformarlas en compuestos de bajo peso molecular, permitiendo su establecimiento través de relaciones de cooperación.

#### ***IV.2.4 DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DEGRADADOR DE HIDROCARBUROS DE LOS CULTIVOS AISLADOS DEL RESIDUO.***

Con el fin de estudiar la comunidad bacteriana cultivable del residuo y correlacionarla con su composición química, se determina la capacidad de degradar los hidrocarburos representativos del grupo alifático y del grupo aromático, a partir de sus cultivos predominantes.

Cada cultivo se siembra en MML suplementado con cada hidrocarburo al 1%, como única fuente de carbono y energía.

La capacidad degradadora de PAH se determina por la formación de productos coloreados derivados de su metabolismo, y en el caso de los hidrocarburos alifáticos, por la presencia de desarrollo (turbidez) en el medio líquido.

La capacidad degradadora de hidrocarburos, generalmente se asocia a la capacidad de producir surfactantes, es decir biosurfactantes.

Se ha comprobado que los microorganismos requieren en gran medida de la emulsificación del sustrato para su incorporación a la célula y que esta capacidad depende de la presencia de sustancias de naturaleza anfipática. que favorecen la interacción entre el hidrocarburo y la célula (Desai y Banat, 1997). Algunos biosurfactantes poseen propiedades citolíticas que pueden ponerse de manifiesto en agar sangre, produciendo halos de hemólisis total o parcial (Zajic y Mahomedy, 1984).

Con la intención de evaluar la incidencia de esta propiedad en los cultivos aislados del residuo y relacionarla con la actividad degradadora, se determina la capacidad biosurfactante a través de la formación de un halo de hemólisis en placas de agar-sangre.

Los resultados de las pruebas de crecimiento en los MML suplementado con los hidrocarburos seleccionados muestran que:

- de la población BH, el 57% (31 cultivos) degradan al menos un hidrocarburo alifático y el 15% (7 cultivos) degradan al menos un PAH, y que
- de la población BDHC, el 63% (20 cultivos) degradan al menos un hidrocarburo alifático, mientras que ninguno de los cultivos degrada algún PAH.

La Tabla IV-6 presenta el espectro degradador de hidrocarburos alifáticos, de los cultivos dominantes de la población BH y BDHC, donde puede apreciarse que:

en ambas poblaciones, no se observan diferencias en la abundancia de cultivos degradadores al aumentar el largo de la cadena del hidrocarburo alifático, y que existe una mayor incidencia de cultivos degradadores de hidrocarburos alifáticos en la población BDHC.

**Tabla IV-6:** Porcentaje de cultivos degradadores de hidrocarburos alifáticos representativos de la población BH y BDHC.

<i>Población</i>	<i>C14</i>	<i>C16</i>	<i>C18</i>	<i>C20</i>	<i>C24</i>
BH	40,74 %	37,04 %	35,19 %	44,44 %	37,04 %
BDHC	59,38 %	56,25 %	56,25 %	59,38 %	59,38 %

Teniendo en cuenta la composición química del residuo, predominantemente aromática, no se observa relación entre la composición química y la capacidad de degradar los hidrocarburos seleccionados.

La mayor abundancia de cultivos degradadores de hidrocarburos alifáticos en la población BDHC respecto de la BH y la ausencia de cultivos degradadores de PAH, pueden atribuirse a la técnica del NMP empleada para el recuento.

La siembra de las diluciones seriadas de la muestra en el MML suplementado con el extractivo del residuo e incubado por 21 días, produce la selección de aquellos microorganismos capaces de degradar los constituyentes más fácilmente asimilables de la mezcla, los hidrocarburos lineales. Este enriquecimiento previo, reduce la posibilidad de aislar cultivos degradadores de PAH.

Comparativamente, en determinaciones anteriores sobre el mismo residuo, habían sido detectados un 30% de cultivos degradadores de fenantreno (en medio mineral sólido) y no se habían detectado cultivos degradadores de hidrocarburos alifáticos (a partir de PC-agar, Vecchioli, 1998) en la población BH.

Esta diferencia en las características de los cultivos recuperados puede atribuirse a los diferentes métodos de recuento empleados.

El uso de R2-agar, diseñado para la cuantificación de poblaciones de ambientes oligotróficos (Reasoner y Geldreich, 1985), permite la recuperación de una población más diversa del residuo que el PC-agar.

El método de recuento en medio mineral sólido suplementado con fenantreno, utilizado en estudios anteriores, permite visualizar el halo de solubilización del PAH y eventualmente los productos de degradación coloreados. En estas condiciones, el cultivo podría recibir el aporte de las impurezas del agar como suplemento nutricional necesario para el desarrollo en el medio, permitiendo la degradación del PAH por cometabolismo.

En el presente trabajo, la selección producida por el método de recuento (enriquecimiento en degradadores de hidrocarburos fácilmente asimilables) y el posterior cultivo en un medio mineral líquido sintético, sin aportes de sustratos orgánicos alternativos, reducen la posibilidad de detectar algún degradador de PAH, como única fuente de carbono y energía.

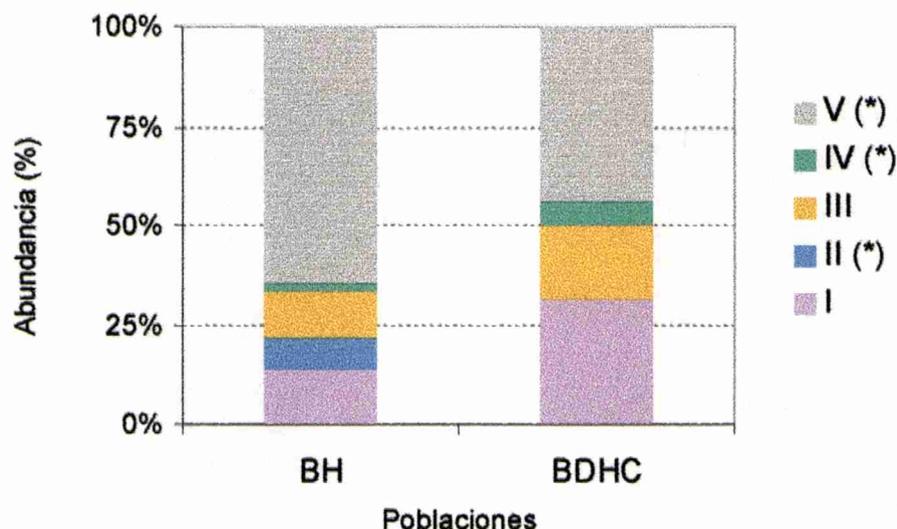
Respecto de la capacidad de producir hemolisinas se determina que el 28% de la población BH y el 33% de la población BDHC presentan actividad  $\beta$ -hemolítica.

Aparentemente no se observa una tendencia cierta que indique que esta propiedad se asocia más a una población que a otra. En estudios anteriores fue determinado un 30% de actividad hemolítica, aunque predominantemente  $\alpha$  hemólisis (parcial) en la población de PC-agar (Vecchioli, 1998).

La Figura IV-1 muestra la descripción de las poblaciones BH y BDHC según la capacidad de producir biosurfactantes, la capacidad degradadora de hidrocarburos alifáticos y el tipo de metabolismo.

En ella se aprecia que ambas poblaciones son diferentes. En la población BH predomina el grupo con menor capacidad degradadora de hidrocarburos alifáticos, sin embargo se detecta un grupo que puede emulsificar los hidrocarburos y degradarlos a través de rutas fermentativas u oxidativas (25% de los cultivos).

En la BDHC, la ausencia de capacidad degradadora representa menos del 50% y es predominante el grupo que tiene la posibilidad de emulsificar los hidrocarburos y metabolizarlos a través de rutas oxidativas.



**Figura IV-3 :** Descripción de las poblaciones BH y BDHC dominantes del residuo API en función de su metabolismo, capacidad hemolítica y capacidad degradadora de hidrocarburos.

Referencias: Grupo I: no-fermentadores;  $\beta$ -hemolíticos; degradan los 5 HC alifáticos

Grupo II: fermentadores;  $\beta$ -hemolíticos; degradan los 5 HC alifáticos (n=3)

Grupo III: no-fermentadores; no hemolíticos; degradan los 5 HC alifáticos

Grupo IV: fermentadores; no hemolíticos; degradan los 5 HC alifáticos (n=1)

Grupo V: fermentadores y no fermentadores que degradan menos de 5 HC alifáticos (n=3)

(n): número de cultivos degradadores de al menos un PAH en la población BH.

Independientemente de las técnicas de cultivo utilizadas, una causa probable de la baja recuperación de cultivos degradadores de PAH sea la baja disponibilidad de estos hidrocarburos en el residuo. Aparentemente la concentración relativamente alta de PAH (5,46%) estaría adsorbida a las partículas y flóculos del residuo, impidiendo el acceso a los microorganismos.

Esta último se comprueba en un experimento donde el residuo API es incubado en el MML al 10% (p/v), suplementado con una mezcla de PAH al 0,06% (p/v). La mezcla de PAH esta formada por fenantreno, antraceno, dibenzotiofeno, fluoreno y pireno.

Luego de cuatro transferencias a MML fresco, son aislados aproximadamente 90 cultivos donde el 50% es identificado como *P. aeruginosa*. El 80% de esta población es capaz de degradar al menos un PAH constituyente de la mezcla (Bolino y col., 2001).

De esta manera, por efecto de la dilución del residuo y ante la presencia de un sustrato biodisponible, representado por la mezcla de PAH, es posible enriquecer la población del

sistema en una clase de microorganismos que desarrollando a su máxima velocidad con un metabolismo del tipo oxidativo, se transforman en la población dominante del sistema.

**CAPÍTULO V**

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Dinámica del proceso de Biorremediación.**

## **V RESULTADOS Y DISCUSIÓN – DINAMICA DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN**

### **V.1 ELIMINACIÓN DEL CONTAMINANTE Y SU RELACIÓN CON LA DINÁMICA DE LAS POBLACIONES DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN.**

Los microorganismos del suelo son buenos indicadores de los efectos de los compuestos tóxicos en los diferentes ambientes de suelo debido a su ubicuidad, sensibilidad a los tóxicos y por estar críticamente involucrados en los ciclos de la materia y geoquímicos del suelo (Siciliano y col. 2000).

La biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos es un proceso complejo cuyos aspectos cuali-cuantitativos dependen de la naturaleza y concentración del contaminante, condiciones ambientales y de la composición de la comunidad microbiana autóctona. Esta estrategia explota la capacidad de los microorganismos de degradar y/o detoxificar la contaminación orgánica (Margesin 2001). A pesar de que ha sido ampliamente utilizada para remediar un amplio espectro de residuos con hidrocarburos, son pocos los estudios realizados de los efectos de la biorremediación sobre los microorganismos del suelo en tierras contaminadas con hidrocarburos (Saterbak y col., 2000).

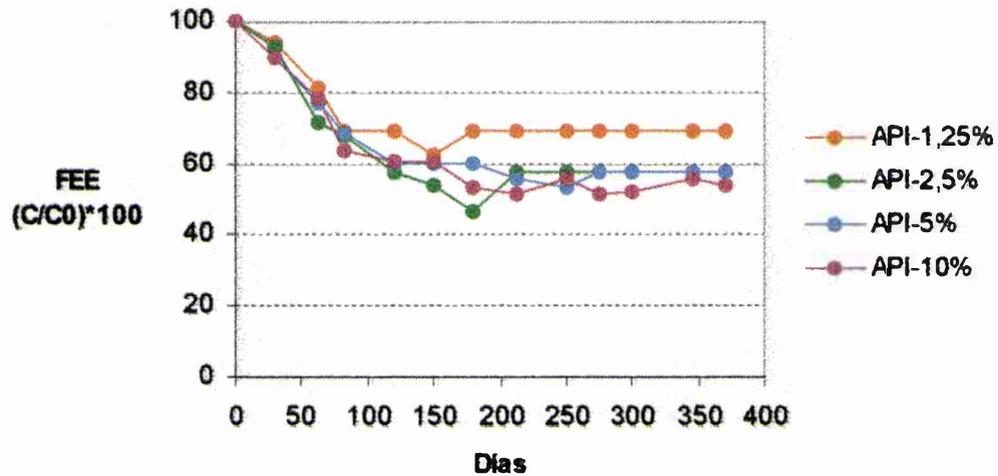
#### **V.1.2 ELIMINACIÓN DEL CONTAMINANTE DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN.**

Vecchioli (1998) demostró en ensayos de laboratorio y ensayos a campo, la factibilidad de usar la biorremediación tanto para tratar el residuo API-2 como suelos contaminados con este residuo.

Puso en evidencia que la eliminación de hidrocarburos se produce mediante un proceso de biológico, biodegradación. Comprobó que durante el proceso de biorremediación se produce una disminución de los compuestos extractables en éter (grasas y aceites), y la disminución o eliminación de los constituyentes peligrosos, observando que no alcanzan los niveles correspondientes a la categoría de suelo limpio en tiempos razonables.

En el presente trabajo se determina la cinética de eliminación del residuo API al 1,25%, 2,5%; 5% y 10% en tierra a través de la fracción extractable en éter (FEE) y de los hidrocarburos cromatografiables (HTCG).

Luego se determina la cinética de crecimiento de las poblaciones microbianas en respuesta a la concentración inicial de residuo aplicado y a los cambios producidos durante el tratamiento, como primer paso en el objetivo de relacionar la estructura y función de las comunidades microbianas del suelo con la concentración y clase de contaminante.



**Figura V-1:** Evolución de la fracción extractable en éter en los sistemas tierra- API, expresada como concentración relativa porcentual de extractables en éter.

La Figura V-1 muestra la evolución de la fracción extractable en éter de los sistemas de tierra contaminada durante el tratamiento expresada como concentración relativa porcentual remanente, es decir, relación porcentual entre la concentración al tiempo t y la concentración inicial.

En ella se observa que la velocidad de eliminación de la FEE es semejante en todos los sistemas hasta los 75 días del proceso.

El sistema API-1,25% se estabiliza luego de los 75 días registrando el menor porcentaje de eliminación, 30%.

El resto de los sistemas disminuyen lentamente su contenido de extractables en éter y se estabilizan alrededor de los 150 días. En estos sistemas el porcentaje de eliminación de la FEE es mayor, alrededor del 45%.

La Tabla V-1 muestra los valores de la FEE al comienzo del experimento y luego del año de tratamiento. Se observa que la concentración residual en los sistemas al año es directamente proporcional a la concentración de residuo aplicado.

**Tabla V-1:** Concentración de residuo determinada como FEE al inicio y al final del experimento de biorremediación del residuo API al 1,25%; 2,5%; 5% y 10% en tierra.

<b>Residuo aplicado</b> (g/100 g tierra)	<b>FEE inicial</b> (mg/kg tierra)	<b>FEE remanente (360 días)</b> (mg/kg tierra)
Control	200	200
1.25	1600	1100
2.5	2800	1600
5	4700	2700
10	10400	5600

### V.1.1.a Ajuste a modelos cinéticos

Segun Vecchioli (Trabajo de Tesis, 1998), la eliminación de FEE puede describirse utilizando un modelo cinético en dos etapas.

Esta clase de residuos está constituida por compuestos fácilmente degradables, compuestos de lenta degradación y compuestos recalcitrantes por lo que un modelo que implique una primera etapa de eliminación rápida seguida de una segunda etapa de eliminación lenta describiría este comportamiento.

Se aplica el modelo-3 propuesto por Vecchioli:

Modelo-3

$$C_t = a.e^{-k.t} + b$$

donde,

a = concentración inicial estimada de FEE más fácilmente degradable, expresada en g/100 g de tierra seca.

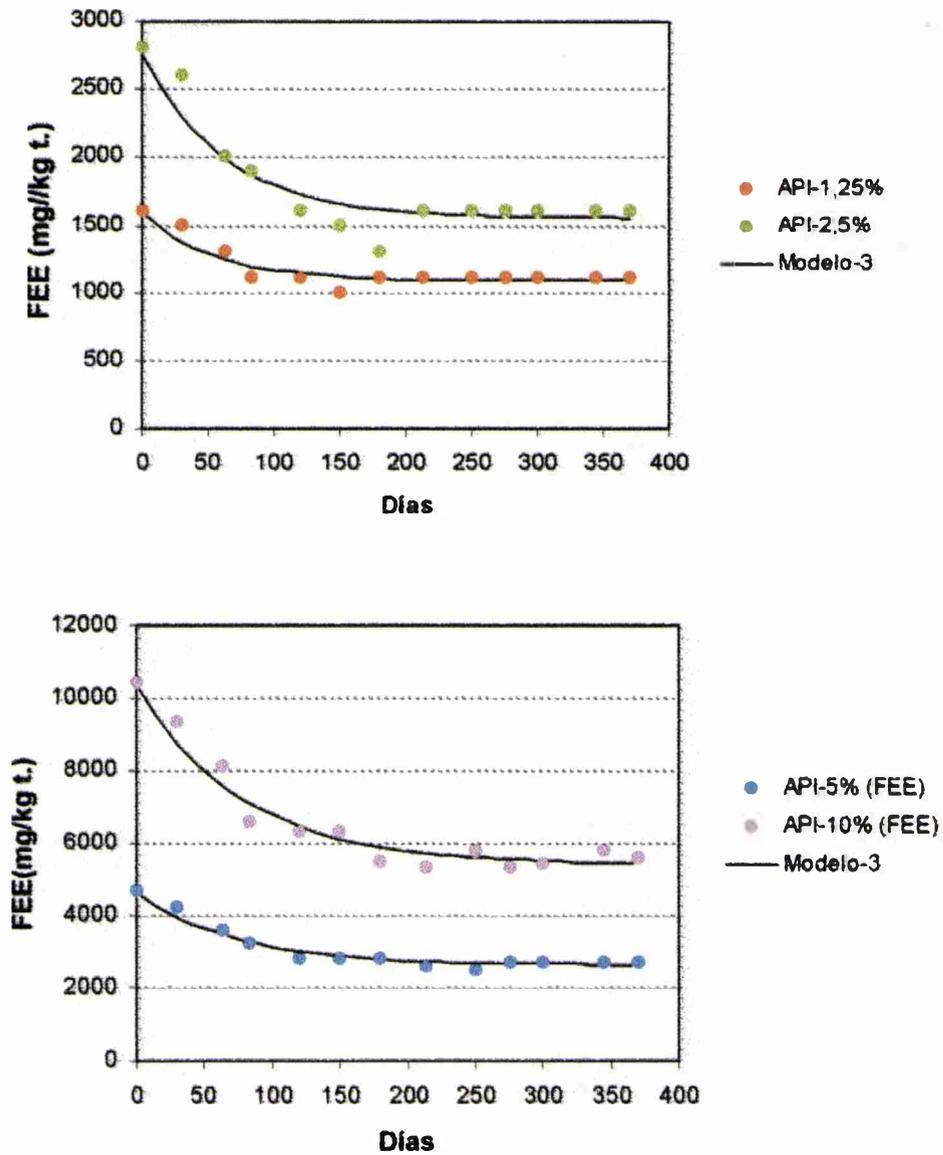
b = concentración inicial estimada de FEE más difícil de degradar, en g/100 g de tierra seca.

$C_t$  = concentración medida de FEE en g/100 g de tierra seca.

k = constante de velocidad de eliminación de primer orden de la fracción fácilmente degradable expresada en 1/días.

t = tiempo en días.

A continuación la Figura V-2 muestra la cinética de eliminación del contaminante como concentración de la FEE en los diferentes sistemas durante el tratamiento y la estimada mediante el Modelo-3. En todos los casos se encontró un buen ajuste (valores de  $r^2$  entre 0,87 y 0,96) con los datos experimentales.



**Figura V-2:** Cinética de eliminación de la FEE en los sistemas de tierra contaminada con el residuo API al 1,25%; 2,5%; 5% y 10%. Ajuste al Modelo-3.

**V.1.1.b Estimación de los parámetros que describen el comportamiento del residuo API en tierra medido a través de la FEE.**

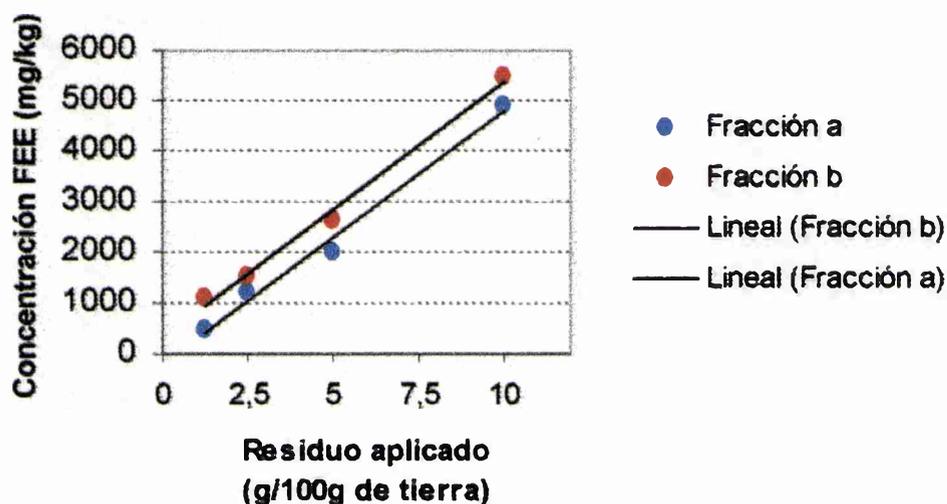
La Tabla V-2 presenta los valores de *a* y *b* estimados por el Modelo-3 y el tiempo de degradación de la fracción más fácilmente degradable, *t*.

**Tabla V-2:** Parámetros estimados a partir del Modelo-3 que describe la cinética de eliminación de la FEE.

<b>Residuo aplicado</b> (g/100 g tierra)	<b>FEE<sub>inicial</sub></b> (mg/kg tierra)	<b>a</b> (mg/kg tierra)	<b>K</b> (1/días)	<b>b</b> (mg/Kg tierra)	<b>tiempo</b> (días)
1.25	1600	490	0.019	1090	129
2.5	2800	1200	0.016	1550	174
5	4700	2000	0.014	2640	197
10	10400	4900	0.013	5450	220

Según puede apreciarse en la Tabla V-2, al aumentar la concentración de residuo aplicado aumentan proporcionalmente tanto la fracción degradable (a) como la fracción difícilmente degradable (b).

La Figura V-3 muestra que dicha proporcionalidad es lineal en ambos casos (con  $r^2 = 0,989$  y  $0,994$  para la fracción a y b, respectivamente).



**Figura V-3:** Relación de la fracción degradable (a) y la fracción difícilmente degradable (b) con la concentración de residuo aplicado.

También se observa que siempre es menor la concentración de fracción degradable (a) respecto de la no degradable (b) aportada en cada concentración de residuo.

La Figura V-4 muestra la relación porcentual de a y b en cada sistema de tierra-residuo.

En ella puede apreciarse que al aumentar la concentración de residuo no aumenta proporcionalmente la proporción de fracción degradadora. Esta menor proporción de compuestos degradados en los sistemas más contaminados, podría ser debida a un desbalance en los requerimientos nutricionales o bien a la presencia de un efecto tóxico del residuo sobre la comunidad microbiana del suelo a concentraciones mayores al 2,5% de residuo en tierra.

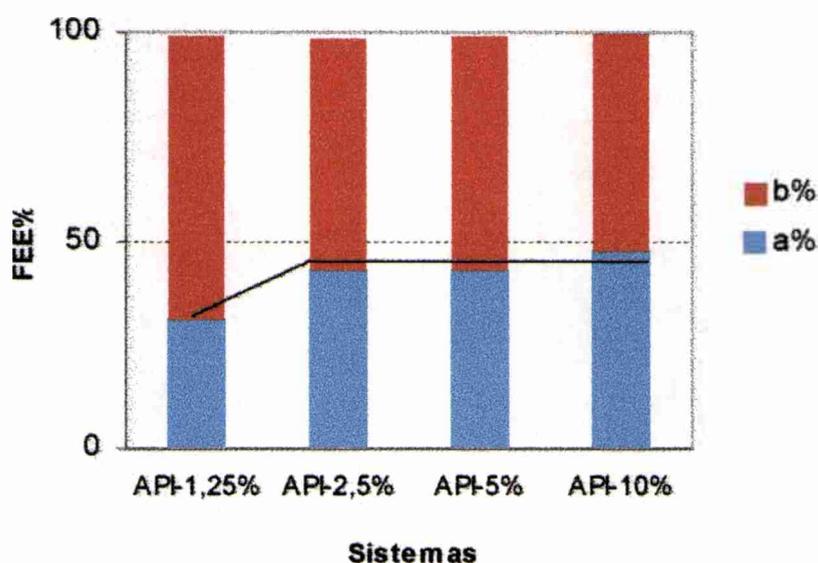


Figura V-4: Relación entre el porcentaje de la FEE degradable *a* y la FEE difícilmente degradable *b* en cada aplicación de residuo API.

#### V.1.1.c Determinación de la cinética de eliminación de la fracción de hidrocarburos durante el tratamiento, determinados por cromatografía gaseosa (HTCG).

Durante el proceso de biorremediación del residuo API en tierra, la FEE puede considerarse representativa de la fracción hidrocarburos solo cuando el contenido de asfálticos y productos de degradación en sistemas tierra-residuo son bajos, situación dada al inicio del tratamiento (Vecchioli, 1998).

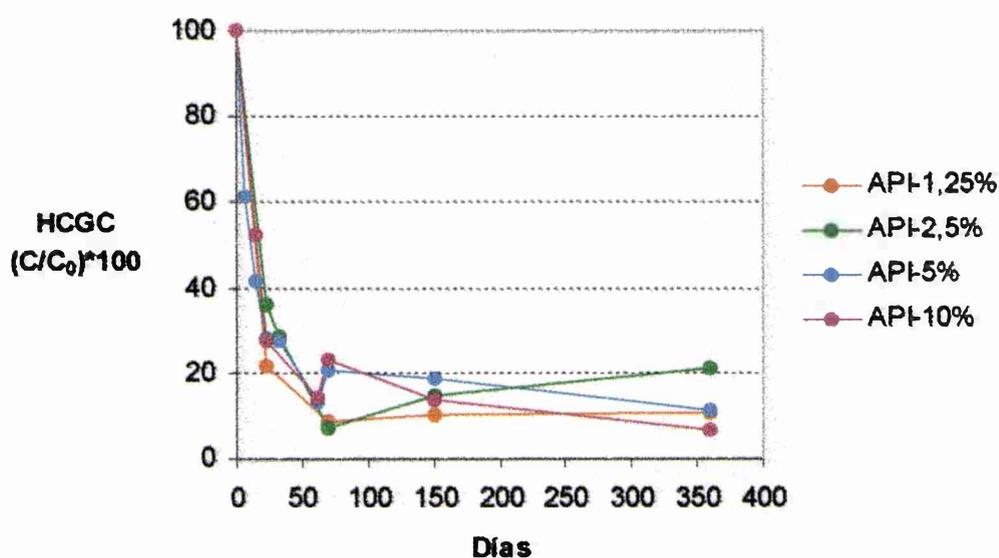
La definición del punto final del proceso de biorremediación, desde el aspecto químico, requiere la determinación específica de los hidrocarburos remanentes en tierra para comparar la concentración de hidrocarburos residuales con las normas locales o internacionales (Vecchioli y col, 1997).

Desde un punto de vista microbiológico, este trabajo intenta determinar la dinámica de las comunidades durante el tratamiento en función de la fracción de hidrocarburos residuales en

tierra con el fin de evaluar el grado de restauración y así contribuir a la definición del punto final alcanzado en el suelo al finalizar el proceso de biorremediación.

La Figura V-5 , muestra la cinética de eliminación de la fracción HTCG durante el tratamiento en los distintos sistemas del residuo API en tierra. Puede apreciarse que todos los sistemas se comportan de forma semejante, los hidrocarburos son eliminados con una velocidad que es independiente de la concentración de barro aplicada.

Todos los sistemas se estabilizan a partir de los 50 días de tratamiento, aproximadamente en el 10% de HTCG.



**Figura V-5:** Evolución de la concentración relativa porcentual de la fracción HTCG durante el tratamiento del residuo API al 1,25%; 2,5%; 5% y 10% en tierra.

A continuación la Figura V-6 muestra los resultados de la aplicación del Modelo-3 a la cinética de eliminación de la fracción HTCG en los sistemas de tierra.

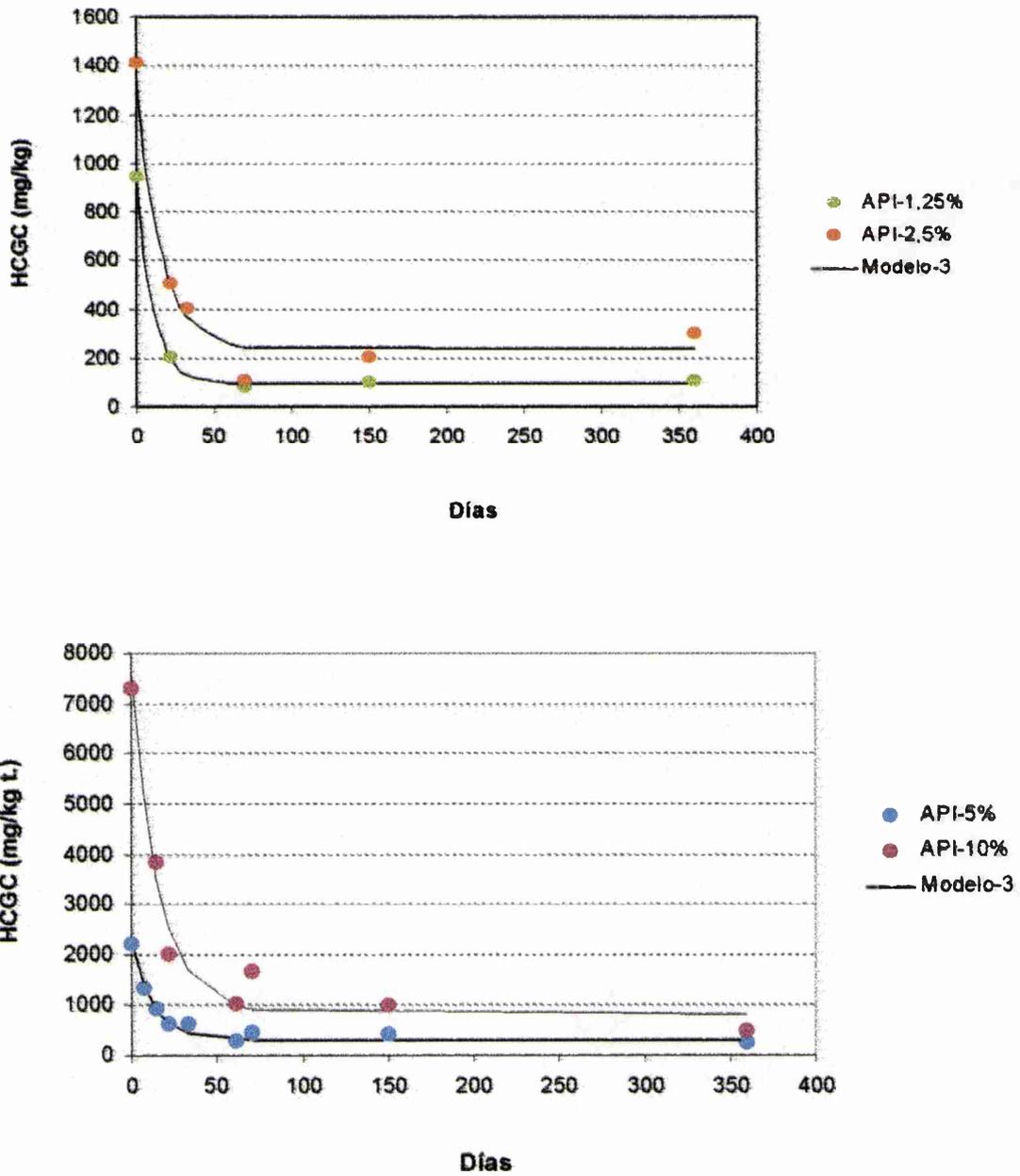


Figura V-6: Evolución de la fracción de HCGC durante el tratamiento del residuo API al 1,25%; 2,5%; 5% y 10% en tierra. Ajuste mediante el Modelo-3.

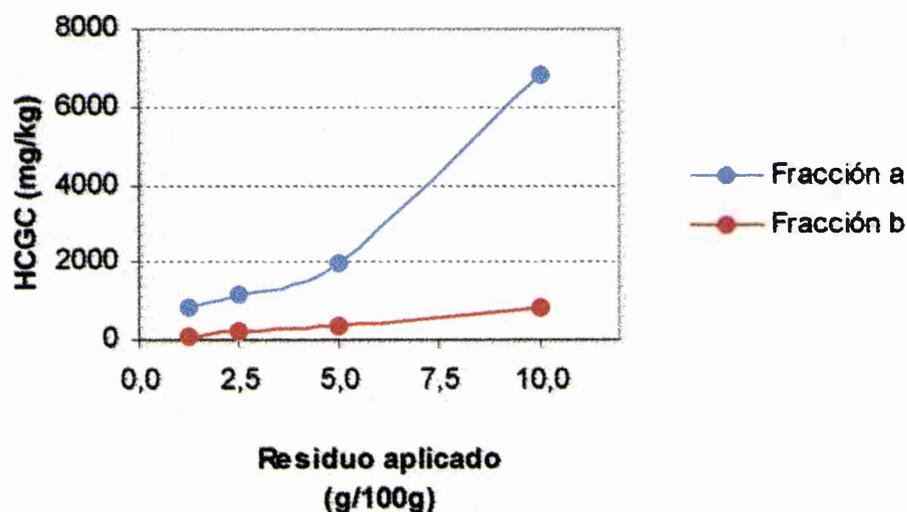
La siguiente Tabla muestra los parámetros estimados a través de la aplicación del Modelo-3.

**Tabla V-3:** Estimación de los parámetros que describen el comportamiento del residuo API en tierra, a partir de las determinaciones de hidrocarburos por CG.

<b>Residuo aplicado</b> (g/100 g tierra)	<b>HCCG inicial</b> (mg/kg tierra)	<b>a</b> (mg/kg tierra)	<b>K</b> (1/días)	<b>b</b> (mg/kg tierra)	<b>tiempo</b> (días)
1.25	933,11	840,00	0,085	93,11	41
2.5	1346,82	1117,72	0,078	229,10	43
5	2255,16	1934,96	0,081	311,20	42
10	7614,87	6802,97	0,074	811,90	47

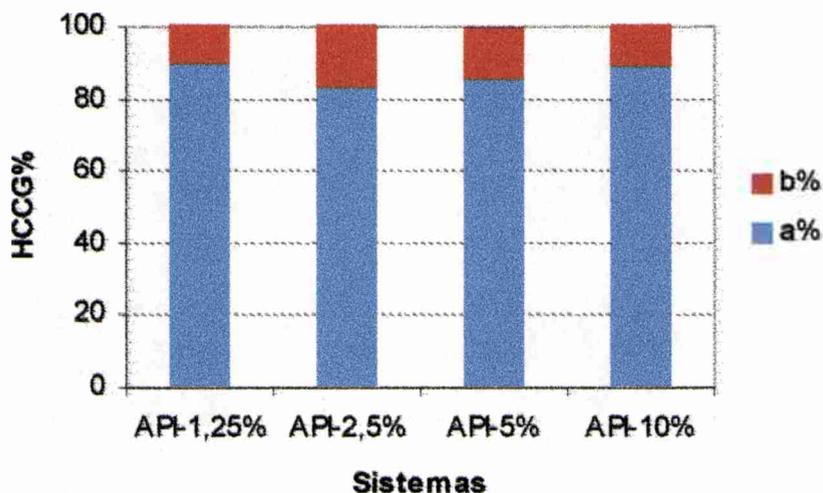
Como se observa en la Tabla V-3, la velocidad de eliminación de HCCG no depende de la concentración de residuo aplicada y la fracción de HCCG difícilmente degradable aumenta cuanto mayor es esta carga.

Según se aprecia en la Figura V-7 conforme aumenta la carga de residuo, mayor es la fracción que se degrada quedando una relativamente baja fracción de HCCG no degradable.



**Figura V-7:** Relación entre la fracción degradable (a) y la fracción residual (b) en cada aplicación de residuo.

Al analizar la relación porcentual de la fracción degradable a y la fracción remanente b en cada sistema, Figura V-8, se observa que aproximadamente en cada aplicación más del 80% de la fracción HCCG es degradada, en un tiempo promedio de 43 días.



**Figura V-8:** Relación entre el porcentaje de la fracción HTCG degradable *a* y la fracción difícilmente degradable *b* en cada aplicación de residuo API.

#### V.1.1.d Comparación de las cinéticas de eliminación de la FEE y la fracción HTCG durante el tratamiento.

Al analizar en forma comparativa las cinéticas de eliminación determinadas por cromatografía gaseosa y por extractables en éter se observa que la velocidad de eliminación de los HTCG es mayor que la velocidad de eliminación de la FEE, Figura V-9.

Este comportamiento se atribuye a la especificidad del método cromatográfico respecto del método gravimétrico.

En la biodegradación de hidrocarburos el primer paso ocurre a través de enzimas que requieren estrictamente la presencia del oxígeno molecular para producir la transformación del sustrato. En la degradación de alcanos el ataque inicial es realizado por monooxigenasas o dioxigenasas, que introducen un átomo de oxígeno rindiendo el alcohol o ambos átomos de oxígeno rindiendo el peróxido (intermediario lábil) respectivamente.

En la degradación de hidrocarburos alicíclicos se produce una hidroxilación por monooxigenasas dando el alcohol alicíclico. En el caso de la degradación de los hidrocarburos aromáticos, éstos son oxidados por dioxigenasas rindiendo dihidrodioles (intermediarios lábiles) que espontáneamente son convertidos en catecoles (Atlas y Bartha, 1998).

De esta manera, la primera etapa de biodegradación produce la modificación de la molécula inicialmente detectada por el método cromatográfico rindiendo un sustrato transformado que ya no es cuantificado por la técnica específica.

La técnica de determinación del contenido de extractables en éter es inespecífica ya que detecta todo sustrato soluble en éter etílico. Esto incluye a los hidrocarburos originalmente presentes en el residuo, más los productos de la transformación microbiana, los sustratos diferentes de hidrocarburos y una proporción de biomasa microbiana soluble en éter producida durante el tratamiento.

La cinética resultante de la eliminación de este pool de sustratos es más lenta y enmascara la eliminación más rápida de la fracción fácilmente degradable de los HTCG, que se completa alrededor de los 45 días.

Una vez superada la etapa de eliminación de los HTCG, la eliminación de sustratos asimilables más complejos continúa a una velocidad menor y según se observa en la Figura V-2, se completa alrededor de los 200 días.

Luego de producida la rápida eliminación de los HTCG, el descenso en la FEE es debido a la eliminación de los productos del metabolismo y a los hidrocarburos no detectables por cromatografía gaseosa.

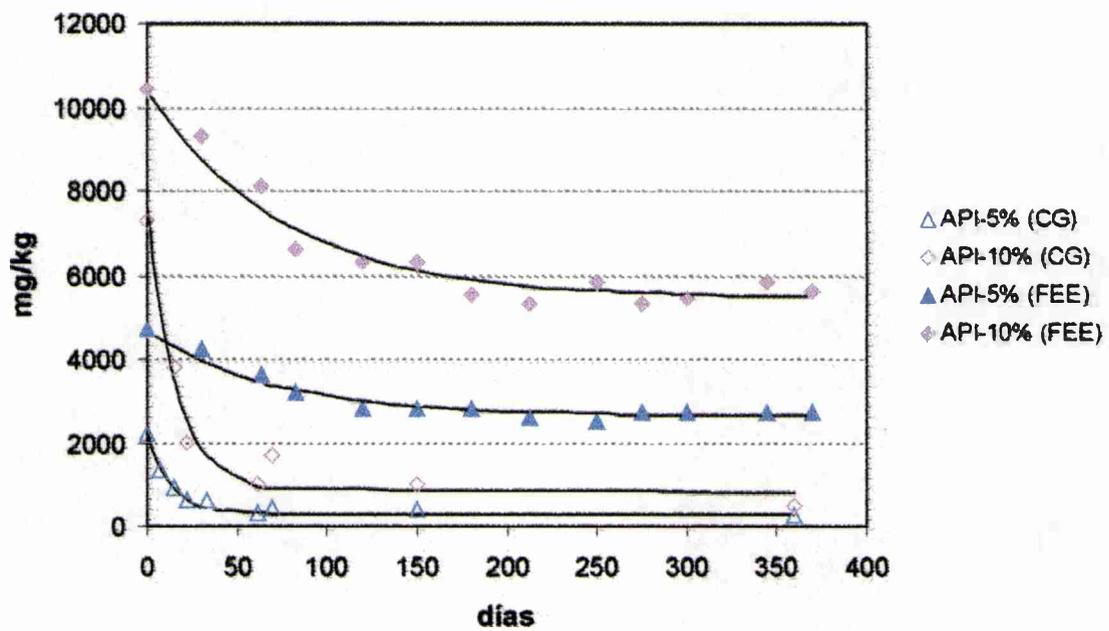
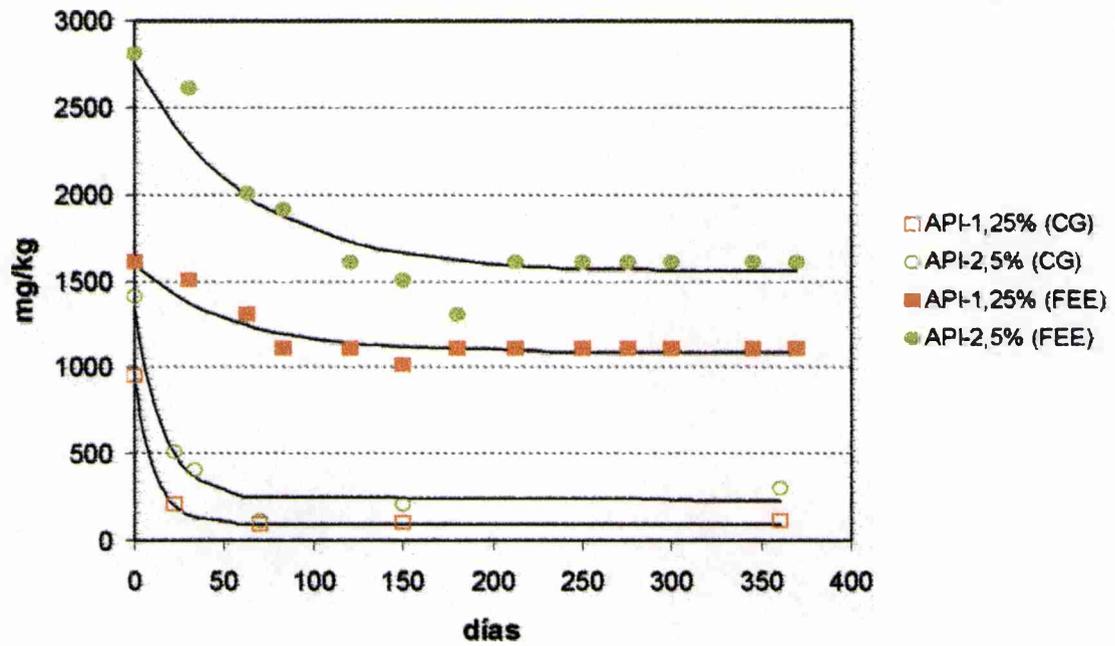


Figura V-9: Comparación de las cinéticas de eliminación de la FEE y los HTCG durante el tratamiento de biorremediación del residuo API al 1,25%; 2,5%; 5% y 10% en suelo.

### **V.1.2 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL RESIDUO API SOBRE LA DINÁMICA DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS CULTIVABLES DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN.**

Con el fin de determinar el efecto producido por el residuo sobre la comunidad del suelo se analizan los cambios en la densidad de las poblaciones bacteriana heterótrofa (BH), bacteriana degradadora de hidrocarburos (fracción extraída del residuo con n-hexano) (BDHC), bacteriana degradadora de hidrocarburos policíclicos aromáticos (BDPAH) y población fúngica (PF).

La evolución de las poblaciones bacterianas heterótrofas durante el tratamiento se realiza en el medio R2-Agar. En el monitoreo de las poblaciones degradadoras de hidrocarburos se aplica la técnica del Número Más Probable (NMP).

El empleo de estos medios de cultivo tiene como finalidad aumentar la capacidad de recuperación de la población cultivable de suelo y especialmente en el NMP seleccionar aquellas bacterias que pueden desarrollar a expensas de los hidrocarburos representativos del residuo estudiado. Particularmente, los medios líquidos favorecen el desarrollo de ciertas bacterias a expensas de los metabolitos generados por otras bacterias, comportamiento que se encuentra limitado en los medios sólidos por problemas de difusión. La disponibilidad de los productos metabólicos es necesario, en algunos casos, para la degradación de hidrocarburos).

En estudios anteriores sobre biorremediación del residuo API-2 (Vecchioli, Trabajo de Tesis 1998) se empleó el Plate Count Agar (PC-Agar) para el recuento de la población heterótrofa y el Medio Mineral Sólido (MMS+R) para el recuento de la población degradadora durante el tratamiento. En este último, la fuente de carbono es aportada a través de los compuestos volátiles del residuo colocado sobre un secante en la tapa de la placa de Petri invertida.

En el presente trabajo, mediante el cambio en los medios de cultivo utilizados, se intenta determinar una cinética de poblaciones más representativa de las tierras contaminadas durante el tratamiento.

El R2-Agar, diseñado originalmente para el monitoreo de poblaciones bacterianas heterótrofas de agua potable, ha sido ampliamente utilizado en el recuento de bacterias de ambientes oligotróficos asociadas a gránulos de carbón activado, efluentes, biofilms formados en cañerías de agua y suelo entre otros (Reasoner y Geldreich, 1985).

Este medio de cultivo posee una baja concentración de una variedad de fuentes de carbono y energía, seis sustratos con una concentración total de 2,8 g/l, adecuada para el desarrollo de microorganismos oligotróficos. En contraste con la composición del Plate Count Agar (PC-Agar), tres fuentes de carbono en una concentración total de 8,5g/l, tendiente a la recuperación de microorganismos copiotróficos.

El empleo de la técnica del NMP para los recuentos de la población degradadora, permite la cuantificación de aquellas bacterias específicamente degradadoras, es decir el extracto obtenido en n-hexano a partir del residuo constituye la fuente de carbono y energía que permite detectar una población específicamente degradadora de los hidrocarburos del residuo.

La técnica de recuento de bacterias degradadoras en placas de MMS+R aporta pequeñas concentraciones de fuentes de carbono y también micronutrientes (Cu, Zn, Mn, etc.) a través de las impurezas del agar (aún empleando ágares de mayor pureza) que permitirían el crecimiento de una población no específicamente degradadora de hidrocarburos.

Por otra parte, en la técnica del NMP podría existir una subestimación del número de microorganismos, debido a la incapacidad de una sola célula de iniciar un crecimiento visible ya que la interacción célula-hidrocarburo podría requerir más de una célula o un nivel mínimo de algún metabolito para lograr la degradación de algunos sustratos. Este fenómeno relacionado con la concentración bacteriana genera una indeterminación en cuanto al número inicial de células capaz de dar un resultado positivo y produciría un error por defecto en la estimación por NMP (Haines y col. 1996).

#### **V.1.2.a Efecto sobre la población bacteriana heterótrofa cultivable (BH)**

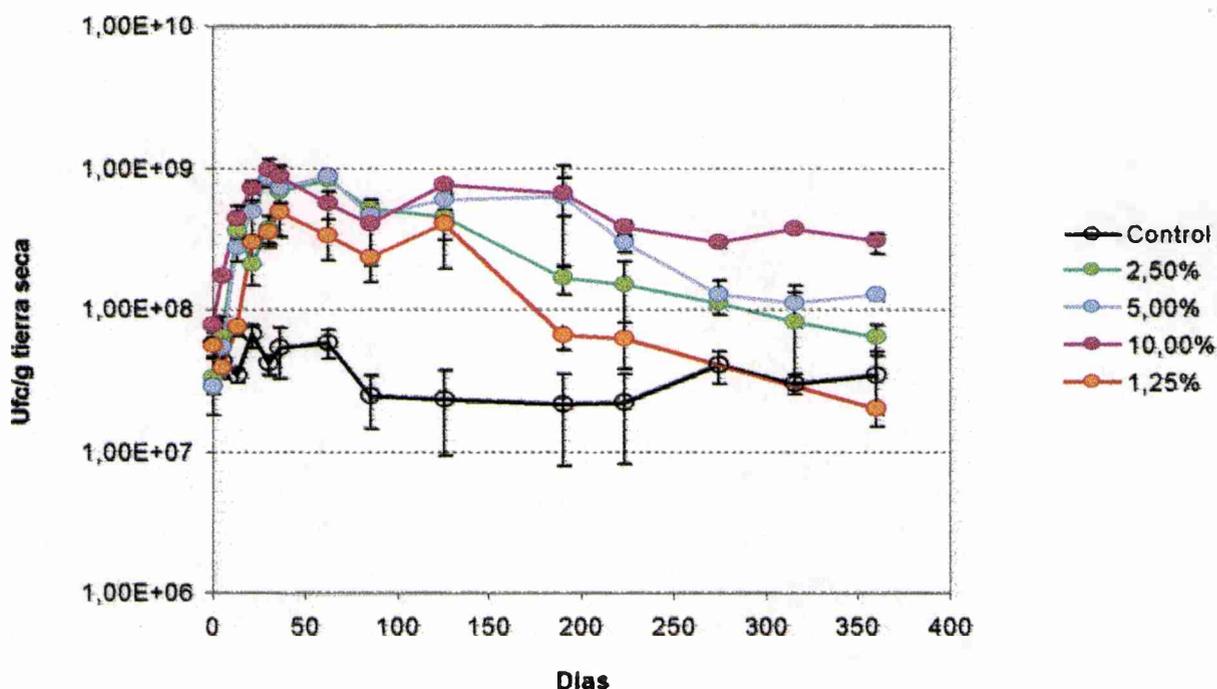
La Figura V-10 muestra los cambios detectados en la población de bacterias heterótrofas cultivables (BH).

Analizando en primer lugar el sistema control sin contaminar, se observa que el nivel de la población BH varía alrededor de  $5 \cdot 10^7$  Ufc/g durante todo el ensayo. Las fluctuaciones observadas durante la primera etapa de la incubación pueden atribuirse a los efectos del tamizado, aireado, condiciones óptimas de incubación (21°C y 20±2 % humedad) que incentivan la biodegradación de los sustratos del suelo (Degens y Harris, 1997).

Analizando los sistemas contaminados se observa que todas las concentraciones de barro aplicada producen un significativo aumento ( $p < 0,05$ ) respecto del sistema Control. Alcanzan el máximo alrededor de los 30 días, en todos los sistemas.

Luego del máximo de densidad, los recuentos descienden lentamente durante el año de tratamiento.

Al finalizar el experimento, en los sistemas API-1,25% y API-2,5% no se observan diferencias significativas respecto del Control ( $p > 0,05$ ). Los sistemas API-5% y API-10% mantienen los niveles de población heterótrofa significativamente superiores al Control ( $p < 0,05$ ).



**Figura V-10:** Evolución de la densidad de la población BH cultivable en los sistemas API y en el sistema Control, durante el proceso de biorremediación.

#### V.1.2.b Efecto sobre la población degradadora de hidrocarburos totales (BDHC)

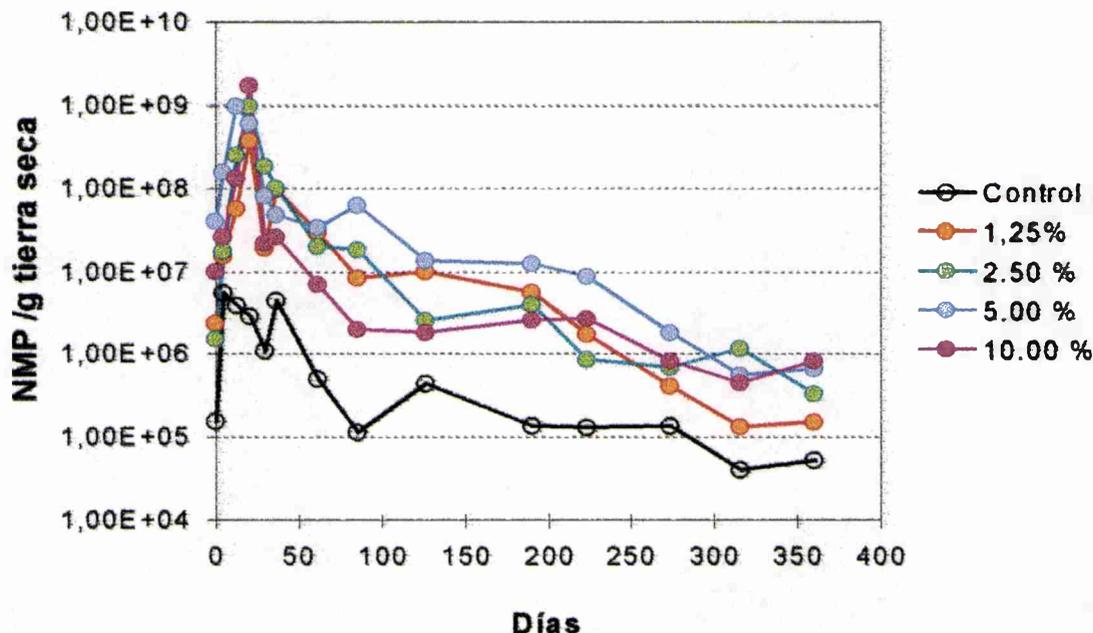
La Figura V-11 muestra la evolución de la población BDHC en los sistemas contaminados y el Control.

Se puede apreciar que en ausencia de contaminación, la población BDHC del suelo fluctúa en uno o dos órdenes de magnitud por debajo del nivel de la población BH.

Al igual que lo observado en la población BH del Control, las condiciones de incubación del sistema aumentan la disponibilidad de los sustratos del suelo poniendo en evidencia una población autóctona potencialmente degradadora de hidrocarburos. Aproximadamente en la tercera semana de tratamiento la población BDHC representa un máximo 2,2% de la BH.

La presencia del residuo, independientemente de la concentración inicial, produce un significativo aumento en la población BDHC, alcanzando un tamaño máximo del orden de  $1 \times 10^9$ /g aproximadamente a los 21 días de tratamiento.

Luego, durante el año, la población del sistema API-1,25% descienden a los valores del Control. Las poblaciones degradadoras de los sistemas API-2,5%; API-5% y API-10% permanecen aumentadas hasta el final del tratamiento.



**Figura V-11:** Evolución de la densidad de la población degradadora de hidrocarburos en los sistemas API y en el sistema Control, durante el proceso de biorremediación.

Los resultados obtenidos por Vecchioli (1998) en los ensayos de biodegradación del residuo API-2 trabajando con las mismas concentraciones, muestran que el incremento en las poblaciones BH en PC-Agar ocurre luego de un período de latencia de una semana aproximadamente. Este retraso no es observado al monitorear las poblaciones BH con R2-agar, detectándose rápidamente una población metabólicamente activa. Por ambas técnicas se alcanza aproximadamente la misma cosecha máxima de población BH.

Por otro lado, la evolución de la población BDHC utilizando el medio sólido MMS+R, observada en su trabajo, demuestra un crecimiento similar al detectado en este experimento mediante la técnica del NMP.

Durante el tratamiento, la población BDHC detectada en el medio sólido (MMS+R) mantiene altos valores de recuento durante los 60 días que dura el experimento, en cambio la detectada por el NMP descende significativamente luego de los 21 días. De acuerdo con la cinética de eliminación de HTCG, la fracción degradable se elimina a los 45 días aproximadamente en todos los sistemas.

Esta diferencia en la dinámica de los recuentos radica en la composición de los medios de cultivo utilizados, mientras que el MMS+R recupera una población inespecífica, el medio líquido

suplementado con los hidrocarburos del residuo detecta solo aquella población específicamente degradadora de hidrocarburos.

### **Relación entre las poblaciones bacterianas y el contaminante**

Desde un punto de vista ecológico, un ambiente puede ser caracterizado según el predominio de una condición- $r$  o  $-K$  (Andrews y Hall, 1986).

Una condición- $r$  ocurre cuando la relación entre la población y el ambiente es tal que sus miembros (estrategas- $r$ ) desarrollan a su máxima velocidad específica de crecimiento.

Por otro lado, una condición- $K$  se da cuando la relación entre la población y su ambiente es tal que la velocidad específica de crecimiento de las poblaciones (estrategas- $K$ ) se aproxima a cero.

Basado en este concepto una comunidad puede ser definida mediante la definición de su ambiente. Es decir, en un determinado habitat, una comunidad de microorganismos desarrollará como consecuencia de la presión ambiental.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la cinética de degradación de los HTCG (Figura V-6) la rápida eliminación de hidrocarburos observada en la primera etapa del tratamiento coincide con el establecimiento de la población BDHC en todos los sistemas contaminados. Este comportamiento indicaría que los HTCG son degradados en un proceso metabólico o cometabólico por la población BDHC, transformados finalmente en productos no detectables por CG. Proceso que ocurre principalmente durante los primeros 43 días de tratamiento, según el tiempo de degradación estimado por el modelo-3.

Posteriormente cuando la velocidad de eliminación se hace más lenta, esta población comienza a descender paulatinamente en todos los sistemas, Figura V-11.

La población BH sigue una dinámica inicialmente semejante a la descrita por la población BDHC. Avanzado el tratamiento, únicamente los sistemas contaminados con 5% y 10% de residuo mantienen los niveles de población BH significativamente superiores a los del Control hasta finalizar el tratamiento, Figura V-10.

Independientemente de la concentración de residuo aplicada, el aumento de ambas poblaciones sería el resultado del enriquecimiento de ciertos biotipos metabólicos, a expensas de los hidrocarburos. El comportamiento de estas poblaciones se asocia a la dinámica de los estrategas- $r$ , que crecen rápidamente ante la presencia de un sustrato temporalmente abundante.

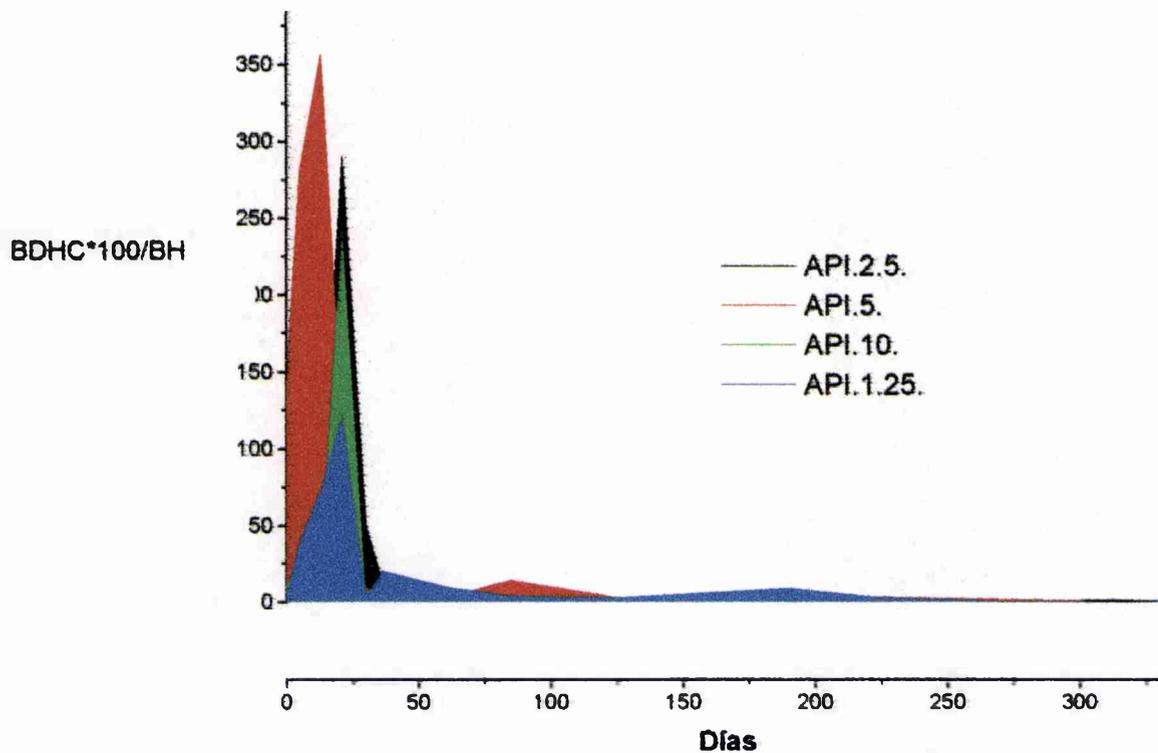
Posteriormente, el desarrollo de las poblaciones "tempranas" se ve limitado a causa de la desaparición de los hidrocarburos fácilmente asimilables, o por efectos tóxicos de sus productos de degradación.

En este punto comienza a disociarse el comportamiento entre la población BH y BDHC.

La población BDHC desciende conforme desaparece la fracción de HTCG del sistema. En cambio en la población BH se produciría el reemplazo de la población primaria degradadora de hidrocarburos por otra adaptada a la oxidación de los metabolitos y sustratos más complejos aportados por el contaminante.

La población BH "tardíamente" seleccionada se mantiene en valores relativamente aumentados demostrando una mayor afinidad por sustratos más complejos. Esta propiedad le otorga mayor grado de competitividad por los sustratos remanentes en baja concentración o difícilmente asimilables, y su dinámica podría asociarse al comportamiento de los estrategas-k.

Con la intención de realizar un análisis comparativo de la dinámica de la población BDHC respecto de la población BH, se grafica la relación porcentual de población BDHC respecto del 100% monitoreado como población BH durante la biorremediación:  $BDHC \cdot 100 / BH$  (Figura V-12).



**Figura V-12:** Relación porcentual de la población BDHC respecto de la población BH, durante el proceso de biorremediación.

En la Figura V-12 se observa que:

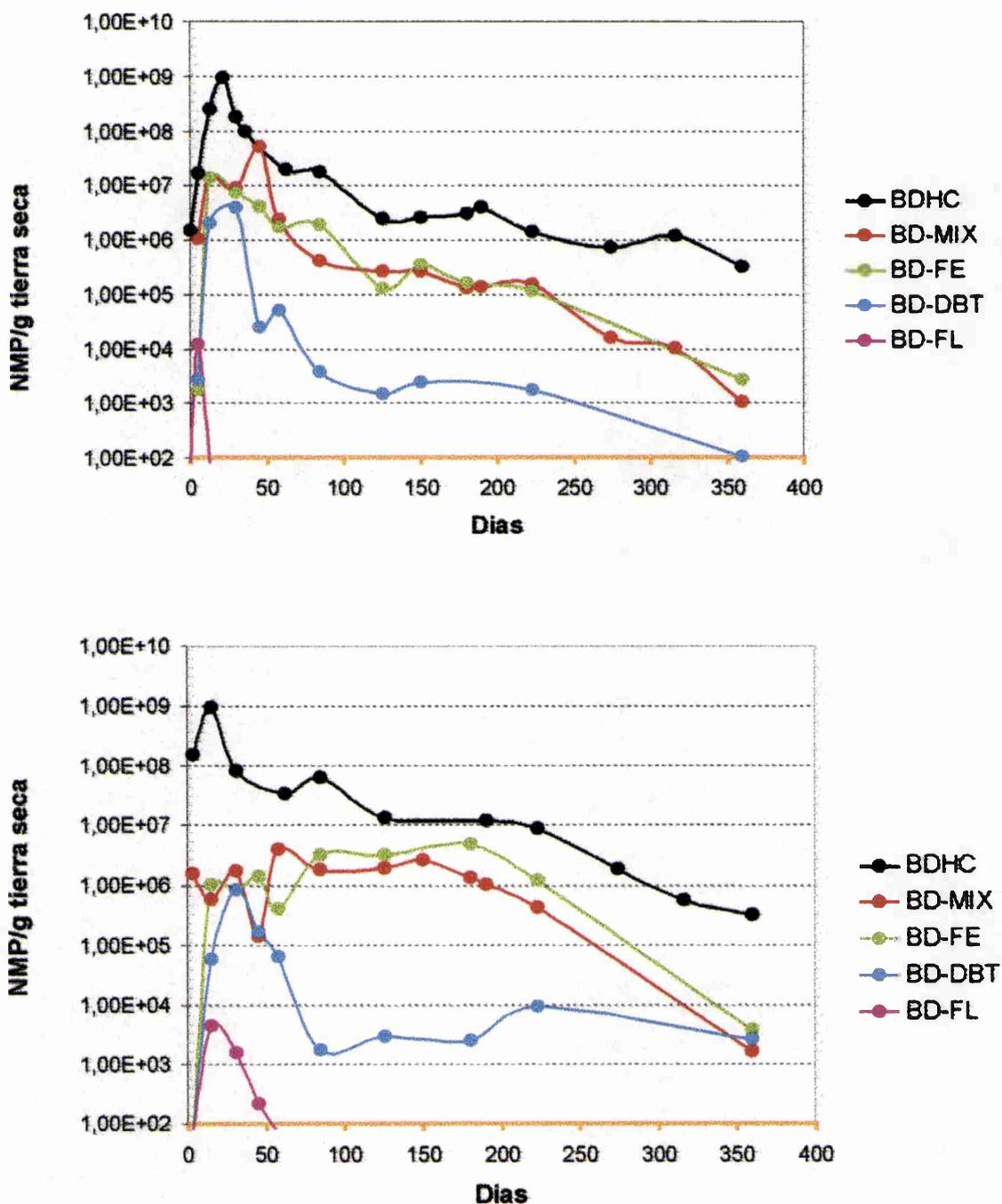
- ⊕ La relación porcentual supera el 100% en todos los sistemas durante el período coincidente con el tiempo estimado de eliminación de HCTG, indicando el rápido crecimiento de una población que se establece a expensas de los hidrocarburos aportados por el residuo.
- ⊕ Una relación porcentual  $\geq$  al 100% indicaría que la población bacteriana cultivable de los sistemas es activamente degradadora de hidrocarburos. Podría asumirse que la población BH "temprana" detectada en R2-agar es degradadora de hidrocarburos.
- ⊕ Una relación porcentual  $> 100\%$  indicaría una mayor capacidad de recuperación de bacterias cultivables mediante la técnica del NMP.
- ⊕ El período en que se detecta la relación porcentual superior al 100% corresponde al tiempo de eliminación de la fracción fácilmente asimilable de los hidrocarburos del sistema, estimada aproximadamente en 43 días.
- ⊕ El máximo de la relación porcentual es proporcional a la concentración de residuo aplicado hasta un 5%. Concentraciones mayores al 5% disminuyen la proporción de la población BDHC respecto de la BH, indicando la presencia de un efecto tóxico sobre la población degradadora.

#### **V.1.2.c Evolución de las poblaciones bacterianas degradadoras de hidrocarburos totales y de hidrocarburos policíclicos aromáticos, BDPAH.**

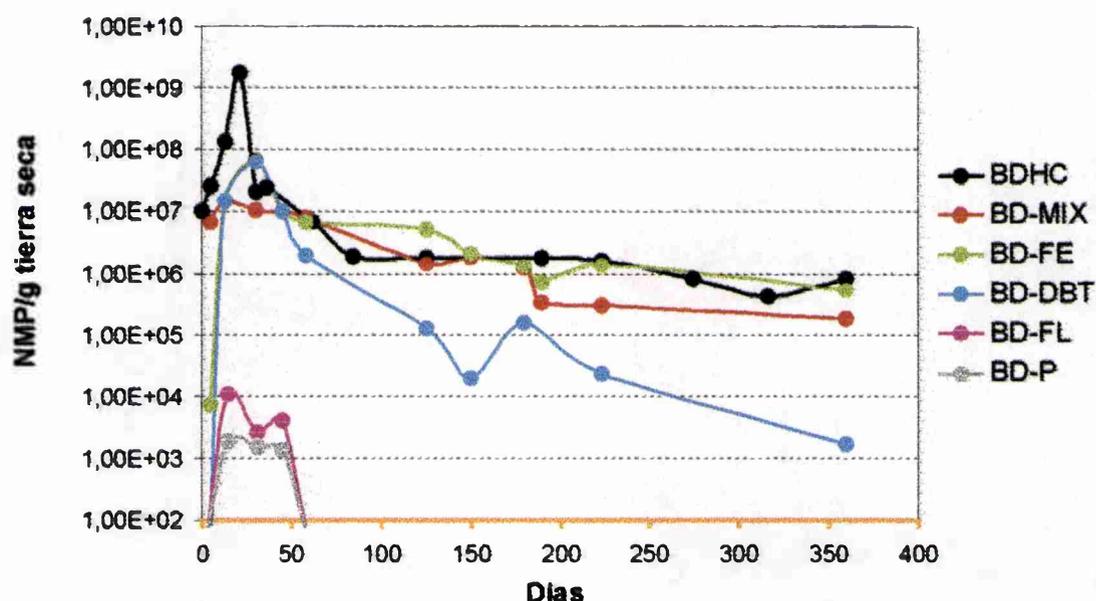
Dada la composición química del residuo conteniendo una relativamente alta concentración de hidrocarburos aromáticos, especialmente policíclicos aromáticos (PAH) se estudia la evolución de poblaciones bacterianas capaces de degradar estos hidrocarburos.

Se determina el efecto de la concentración del residuo sobre las poblaciones degradadoras de fenantreno, dibenzotiofeno, fluoreno, pireno y de la mezcla de estos 4 hidrocarburos (MIX).

La dinámica de poblaciones se estudia en los sistemas donde se registraron los mayores efectos de selección de población BDHC: API-2,5%, API-5% y API-10% (Figura V-13 y Figura V-14).



**Figura V-13:** Evolución de la densidad de las poblaciones BDHC y BDPAH, en el sistema API-2,5% (arriba) y en el sistema API-5% (abajo) . Referencias: BD, bacterias degradadoras; MIX, mezcla de Fenantreno (FE), Dibenzotiofeno (DBT), Fluoreno (FL) y Pireno (P). (Límite de detección del NMP: 100/g tierra seca)



**Figura V-14:** Evolución de la densidad de poblaciones BDHC y BDPAH en el sistema en el sistema API-10%. Referencias: BD, bacterias degradadoras; MIX, mezcla de Fenantreno (FE), Dibenzotiofeno (DBT), Fluoreno (FL) y Pireno (P). (Límite de detección del NMP: 100/g tierra seca).

Los niveles de poblaciones degradadoras de PAH detectados en el sistema Control estuvieron siempre por debajo del límite de detección del método de recuento NMP, es decir, menores de 100/g.

Analizando las Figuras V-13 y V-14 se observa que:

- ⊕ La aplicación del residuo en las tres concentraciones produce un significativo aumento en las poblaciones degradadoras de PAH, respecto del sistema Control.
- ⊕ La población degradadora de la mezcla de PAHs manifiesta una respuesta prácticamente inmediata al agregado del residuo, en todos los sistemas. Esta respuesta podría explicarse a través de la inducción de enzimas degradadoras de PAH por efecto del residuo y por el método de recuento que utiliza la mezcla de PAH (MIX). Es mayor el efecto inductivo producido por la mezcla de PAH que por los PAH individualmente.

- ⊕ La población degradadora de fenantreno (BD-FE) evoluciona paralelamente a la población degradadora de la mezcla de PAH (BD-MIX). El fenantreno es uno de los PAH presentes en mayor concentración en el residuo, lo que explicaría los altos valores determinados.
- ⊕ No se observa una relación entre el nivel de poblaciones BD-FE y BD-MIX y el aumento en la concentración de residuo aplicado. Excepto que ambas poblaciones mantienen los niveles más altos durante el año de tratamiento en el sistema API-10%.

Las poblaciones degradadoras de dibenzotiofeno (BD-DBT) y fluoreno (BD-FL) parecieran guardar cierta relación con la concentración de residuo. La población degradadora de pireno (BD-P) es seleccionada únicamente en el sistema más contaminado.

- ⊕ Las poblaciones BD-FL y BD-P se detectan únicamente en los primeros días de tratamiento, en valores significativamente más bajos que el resto de las poblaciones degradadoras.

En la primera etapa del proceso de biorremediación, una fracción de hidrocarburos fácilmente asimilable produce el enriquecimiento en la población BDHC. Paralelamente se produce una rápida selección de poblaciones degradadoras "tempranas" de PAH, aunque siempre menor que la población BDHC.

La Tabla V-4 muestra la concentración de PAH mayoritarios en los sistemas de tierra, donde se aprecia el significativo descenso de PHAs (hasta fluoranteno) a los 21 días de tratamiento, independientemente de la concentración de residuo aplicada.

Luego del período de máxima densidad de poblaciones, una vez consumidos los sustratos fácilmente asimilables, desciende el nivel de la población BDHC paralelamente con la población BD-DBT, BD-FE y BD-MIX, aunque siempre conservándose en un nivel superior.

En el sistema API-10%, las poblaciones BDHC, BD-FE y BD-MIX igualan sus niveles luego del período de eliminación de los HTCG asimilables. A partir de entonces se observa una marcada selección de bacterias degradadoras de PAH respecto de las BDHC.

**Tabla V-4:** Contenido de hidrocarburos totales y PAH mayoritarios en los sistemas API.

Limite de detección 5 mg/kg.

Compuesto (mg/kg)	API-2,5%			API-5%			API-10%		
	Día 0	Día 21	Día 360	Día 0	Día 21	Día 360	Día 0	Día 21	Día 360
FEE	2800	2600	1600	4700	4200	2500	10400	9300	5600
HC-CG	1405	400	139	2183	592	292	7290	3244	487
Naftaleno	218	Nd	Nd	243	Nd	Nd	973	5	Nd
Acenafteno	25	6	Nd	33	Nd	Nd	83	19	Nd
Fluoreno	65	5	Nd	109	Nd	Nd	232	19	Nd
Dibenzotiofeno	10	Nd	Nd	20	Nd	Nd	67	6	Nd
Fenantreno	120	5	Nd	204	6	Nd	481	22	Nd
Antraceno	44	Nd	Nd	73	Nd	Nd	161	13	Nd
Fluoranteno	24	8	Nd	43	20	Nd	104	81	Nd
Pireno	54	21	Nd	79	70	7	176	172	16
Benzantraceno	9	7	Nd	24	23	Nd	64	63	Nd
Criseno	12	10	Nd	22	23	6	31	42	Nd
Benzo(a)pireno	12	11	9	24	20	9	47	48	10
Benzo(b)fluoranteno	8	9	Nd	16	18	8	31	30	7

Nd: no detectado

La Figura V-15 muestra la evolución de la relación porcentual de la población BD-MIX respecto de la BDHC, en todos los sistemas. En ella puede apreciarse que el 10% de residuo aplicado produce inicialmente la mayor selección de BD-MIX.

Más tarde, durante el periodo de los 100 a 200 días de tratamiento, se detecta el máximo de selección de la población BD-MIX en todas las concentraciones.

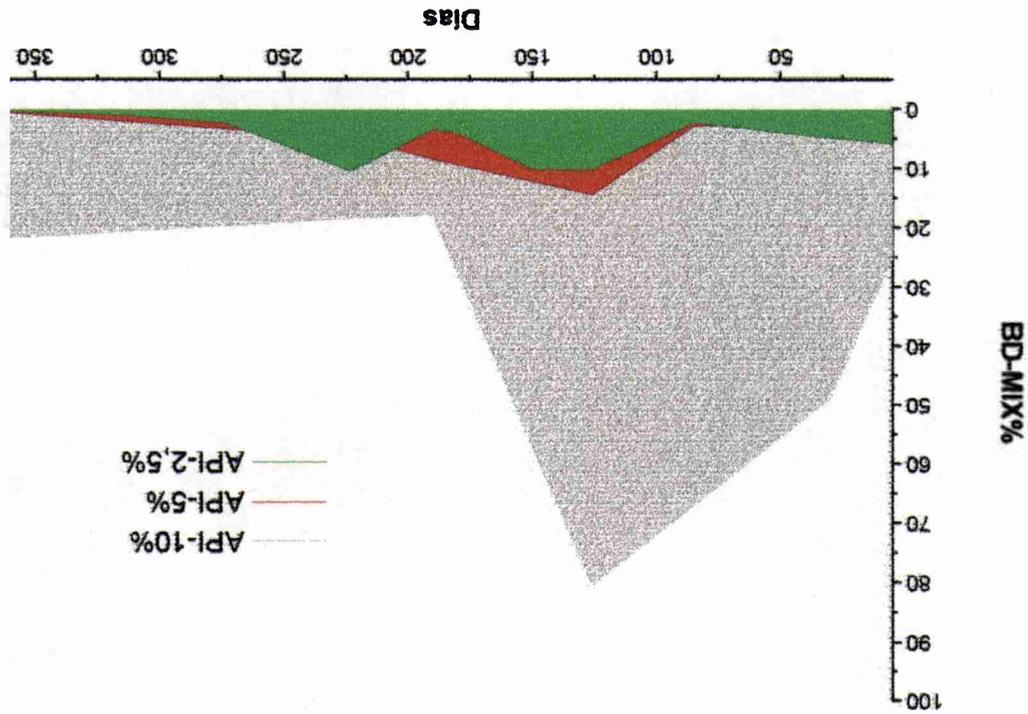


Figura V-15: Relación porcentual de la población BD-MIX respecto de la población BDHC durante el proceso de biorremediación del residuo API al 2.5%; 5% y 10% en tierra.

Las poblaciones establecidas en la etapa "tardia", estarían adaptadas a degradar los productos de transformación de la población primaria y otros relativamente más complejos como los PAH de mayor peso molecular. El tiempo de permanencia de la población BD-MIX "tardia" estaría en relación con el tiempo de eliminación estimado para la FEE del sistema (200 días aproximadamente). La misma asociación puede establecerse entre la permanencia de la población BH "tardia" y el período de degradación de la FEE.

Las sustancia solubles en éter, incluyendo los productos de biotransformación, aportan el carbono y energía necesarios para el mantenimiento de la población secundaria. Superado los 200 días se observa un marcado descenso en las poblaciones BD-MIX y BD-FE en los sistemas API-2,5% y API-5%. El sistema API-10% mantiene los valores aumentados hasta finalizar el tratamiento, demostrando una significativa selección de bacterias degradadoras de PAH, aún no detectándose PAH en el sistema, Figura V-15.

La selección de poblaciones BD-FL y BD-P en la primera etapa del proceso, podría explicarse en función de la concentración de barro aplicada.

La mayor cantidad de barro aporta mayor concentración de sustratos, tanto de fácil como difícil asimilación. Esto produciría la selección de poblaciones degradadoras "tempranas" capaces de degradar los PAH de mayor peso molecular utilizándolos como fuente de carbono y energía en presencia de cosustratos que favorecen su asimilación.

Al avanzar el proceso de biorremediación, se consumen los sustratos fácilmente asimilables aumentando la concentración de los productos de degradación, que se suman a los sustratos difícilmente degradables provocando una mayor presión de selección sobre la comunidad degradadora. Las poblaciones "tardíamente" seleccionadas, en ausencia de cosustratos para la degradación de estos PAH, disminuyen significativamente.

El relativo bajo número obtenido para estas poblaciones estaría en relación con la concentración de fluoreno y pireno en el sistema, aproximadamente un 50% de la concentración de fenantreno. La baja concentración inicial de estos PAH produce una baja estimulación de la población degradadora.

Durante el tratamiento, conforme fueron consumidos los hidrocarburos fácilmente asimilables, los sistemas se transformaron paulatinamente en ambientes cada vez más pobre en sustratos asimilables. En consecuencia las poblaciones bacterianas se vieron sometidas a un progresivo y más severo hambreado.

La permanencia relativamente aumentada de las poblaciones BH y de las poblaciones BD-MIX y BD-FE tardías, principalmente en el sistema contaminado con 10% de residuo, indicaría la selección de poblaciones metabólicamente activas a expensas de los productos de la degradación primaria. Estas poblaciones habrían manifestado cambios en sus propiedades adaptativas con el fin de competir por los nutrientes en el sistema, siguiendo el patrón estratégico *k* (Di Mattia y col., 2001).

Las poblaciones "tempranas" son responsables de la biotransformación del residuo rindiendo productos intermedios. En algunos casos éstos pueden ser menos, igual o más peligrosos que el compuesto original (Sims y col., 1990).

Según fue determinado por Morelli (1999) la biotransformación del residuo API en todas las concentraciones genera durante el tratamiento, compuestos de mayor toxicidad que los constituyentes originales del residuo.

La Figura V-16 muestra la evolución del índice de mutagenicidad indirecta según el método de Ames, durante el tratamiento del residuo API al 2,5%; 5% y 10% en tierra. En ella se aprecia que el índice de mutagenicidad aumenta en los primeros días, coincidente con el establecimiento de la población BDHC en todos los sistemas.

El aumento en los índices de mutagenicidad indica el aumento en la concentración de compuestos genotóxicos. Luego de alcanzar el máximo descienden en un período de 200 días en los sistemas API-2,5% y API-5%, y se mantienen significativamente superiores al Control hasta el final del tratamiento.

Como se observa en la Figura V-15, entre los 100 y 200 días se seleccionan las poblaciones degradadoras de PAH respecto de las BDHC, aproximadamente en un 15%.

Este resultado indicaría que los productos genotóxicos pudieron ser degradados en parte por las poblaciones BD-MIX metabólicamente activas. Luego de los 200 días los valores relativos de degradadoras de PAH en API-2,5% y API-5% disminuyen marcadamente, aunque permanecen significativamente aumentados los niveles de poblaciones degradadoras respecto del control.

El sistema API-10%, muestra un comportamiento diferente manteniendo relativamente aumentada su mutagenicidad más allá de los 200 días. No obstante, al finalizar el tratamiento el índice de mutagenicidad en este sistema no difiere significativamente de los menos contaminados, Figura V-16.

La marcada selección de población BD-MIX respecto de la BDHC observada en el sistema API-10% hasta el día 200, podría asociarse al establecimiento de una población activamente degradadora de productos genotóxicos. A los 200 días esta fuerte selección disminuye, hasta aproximadamente el 20% de la población BDHC. A partir de este momento, se mantiene en esa proporción hasta finalizar el tratamiento. Probablemente esta población altamente seleccionada intervenga en la detoxificación del sistema realizado por la comunidad microbiana.

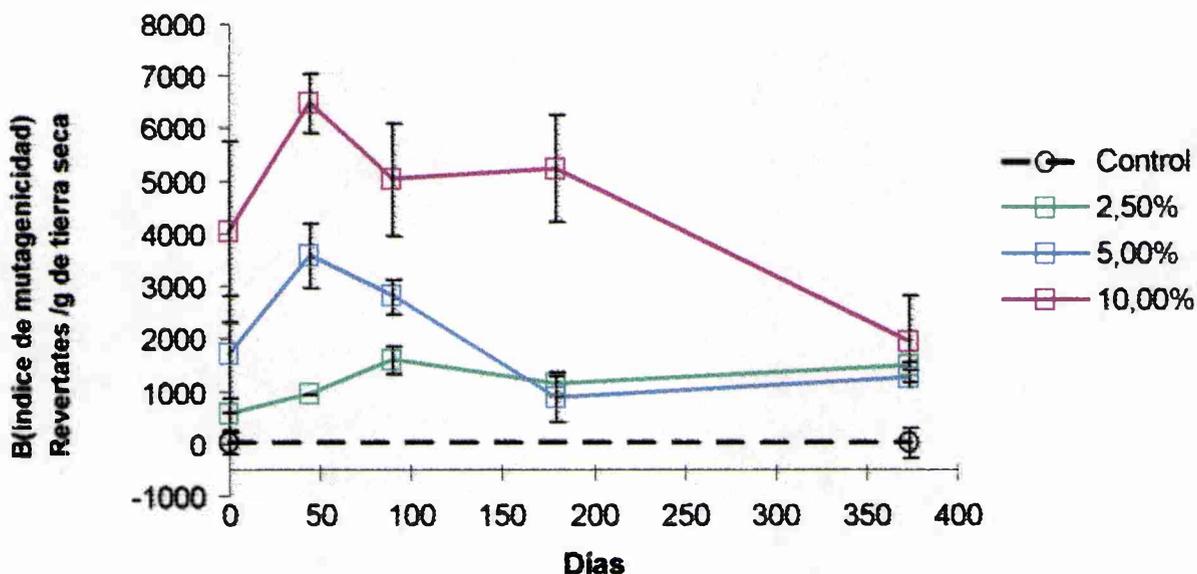


Figura V-16: Ensayo de mutagenicidad de Ames. Cepa TA98 en presencia de activación microsomal. Variación del índice de mutagenicidad (B) durante la incubación de los sistemas tierra-API. Tomado de Morelli (Trabajo de tesis, 1999).

#### V.1.2.d Efecto sobre la población fúngica.

La Figura V-17 muestra el efecto del residuo API sobre la población fúngica, durante el año de tratamiento. En ella se aprecia un efecto inhibitorio sobre la población proporcional a la concentración de residuo. Este efecto inhibitorio es significativo ( $p < 0.05$ ) en los sistemas API-5% y API-10%.

Con la intención de estimar cuantitativamente el efecto producido por el residuo sobre la población fúngica se realiza un ajuste a través de una función polinómica sobre la evolución del recuento de hongos en función del tiempo de tratamiento, Figura V-18.

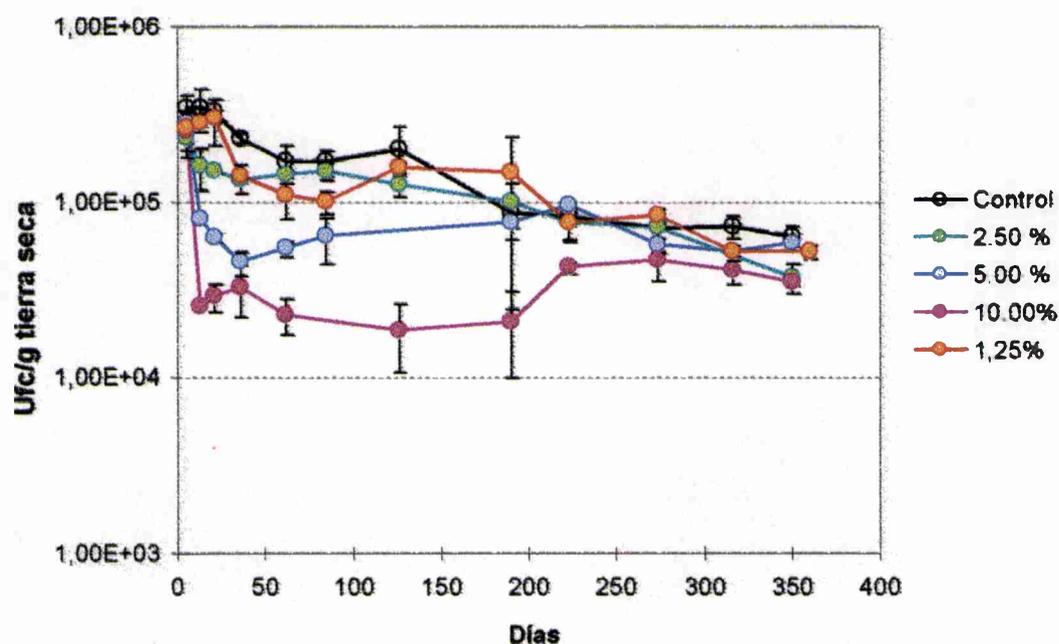
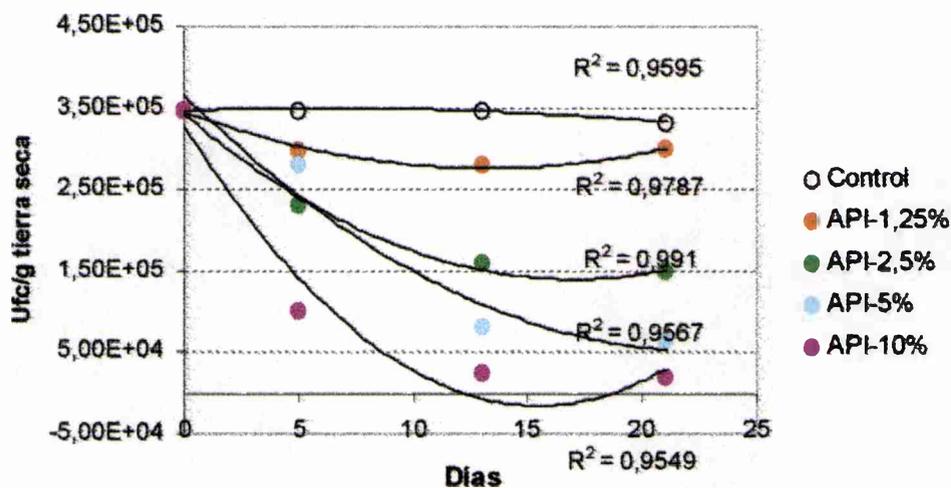


Figura V-17: Evolución de la densidad de la población fúngica en los sistemas API y en el sistema control, durante el proceso de biorremediación.



**Figura V-18:** Evolución de la población fúngica en los sistemas API y en el Control, durante los primeros días de tratamiento. Ajuste mediante una función polinómica.

En la Figura V-18 se aprecia que el efecto inhibitorio del residuo sobre la población fúngica ocurre durante los primeros días de tratamiento y aumenta al aumentar la concentración del residuo.

El efecto inhibitorio observado en los primeros 5 días, podría atribuirse en parte a la presencia de sustancias tóxicas del residuo que afectan directamente el crecimiento inicial de la población fúngica.

Durante la etapa de rápida eliminación del contaminante, se acentúa el efecto inhibitorio del sistema sobre esta población. Este comportamiento podría atribuirse a la actividad metabólica desarrollada por las poblaciones bacterianas "tempranas", que compiten satisfactoriamente por los sustratos asimilables estableciéndose rápidamente en el sistema como población dominante.

Por otra parte, el acondicionamiento periódico de los sistemas de tierra (mezclado semanal para conservar la condición aeróbica) dificulta el establecimiento de esta población a través de la formación del micelio fúngico.

Luego de aproximadamente 50 días el efecto inhibitorio solo es significativo a concentraciones mayores o iguales al 5% de residuo en tierra, extendiéndose hasta los 200 días aproximadamente. Luego de los 200 días de tratamiento, la población fúngica en el sistema más contaminado incrementa sus valores acercándose a los valores del Control, Figura V-17.

Al avanzar el proceso de biorremediación, la eliminación de los hidrocarburos fácilmente degradables (Figura V-6) y el descenso de la densidad de las poblaciones degradadoras, condicionan un ambiente que permite la recuperación de la población fúngica.

Concentraciones iguales ó mayores al 10% generan una actividad genotóxica en el sistema que perdura durante todo el tratamiento manteniendo inhibida a la población fungica hasta el final del tratamiento.

La relativamente aumentada densidad bacteriana degradadora finalmente establecidas y la menor concentración de sustratos asimilables, podrían impedir que la población fúngica aumente significativamente más allá de los valores del suelo Control.

Mediante el monitoreo de las poblaciones microbianas puede concluirse que, al finalizar el año de tratamiento, aún se mantiene aumentada la densidad de las poblaciones BH en los sistemas API-5% y API-10% y la densidad de las poblaciones BDHC en los sistemas API-2,5%; API-5% y API-10%. Particularmente se evidencia una marcada selección de poblaciones degradadoras de PAH en el sistema API-10%.

Desde el punto de vista químico, el punto final del tratamiento se alcanza cuándo la concentración de determinados constituyentes peligrosos está dentro de determinados límites. La Ley Nacional 24.051 (Decreto 831/93 – Anexo II) establece Niveles Guía de Calidad de Suelo que clasifican al suelo en distintas categorías: uso agrícola, uso residencial y uso industrial.

Los valores individuales de los PAH mayoritarios de los sistemas, determinados al finalizar el proceso de biorremediación (Tabla V-4) han permitido clasificar a la tierra de los sistemas API-2,5%; API-5% y API-10% en apta para uso industrial.

## **V.2 ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS FUNCIONALES DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN.**

### **V.2.1 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL RESIDUO API SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA COMUNIDAD DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN.**

Las actividades metabólicas del suelo están mediadas por sistemas enzimáticos específicos, la mayoría de los cuales son producidos por la microbiota del suelo.

Las actividades enzimáticas de deshidrogenasas, amilasas, fosfatasas, arilsulfatasas y celulasas son todas indicativas de los principales procesos productivos del suelo (Barkay y col., 1986).

El presente capítulo tiene por objetivo determinar los cambios en la actividad microbiana del suelo ocurridos por efecto de la contaminación con el residuo petroquímico API al 1,25%; 2,5%; 5% y 10% y durante el proceso de biorremediación.

Con la intención de detectar tales cambios se seleccionan dos ensayos enzimáticos que permiten evaluar la actividad de una proporción relativamente grande de la comunidad microbiana (Atlas y Bartha, 1998).

En el primero se determina la velocidad de hidrólisis del Diacetato de Fluoresceína (FDA) en el suelo, propiedad representativa de la actividad enzimática global, debido a que la hidrólisis es llevada a cabo por células activas con una variedad de enzimas como lipasas, estererasas y proteasas (Schnürer y Rosswall, 1982).

El segundo ensayo consiste en la determinación de la actividad deshidrogenasa debida un amplio grupo de enzimas microbianas que transfieren electrones a aceptores disponibles, como el O<sub>2</sub>. Este grupo de enzimas es inactivada en la forma extracelular y por ello es frecuentemente usada como medida de actividad microbiana en suelo (Morra, 2002).

#### **V.2.1.a Descripción del proceso de biorremediación a través de la actividad de hidrolasas.**

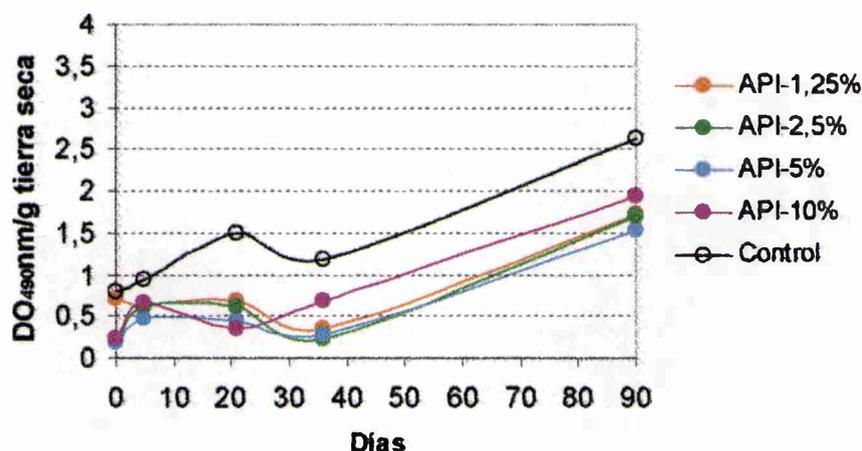
De acuerdo con el protocolo de Schnürer y Rosswall (1982), la actividad de hidrolasas se determina midiendo la cantidad de Fluoresceína producida durante la hidrólisis del sustrato Diacetato de Fluoresceína (FDA), por una muestra del sistema de suelo en solución buffer conteniendo el sustrato. La Fluoresceína producida es leída mediante un espectrofotómetro bajo una longitud de onda de 490 nm.

##### ***V.2.1.a.1 Determinación de la actividad hidrolasa como cantidad de Fluoresceína producida por gramo de suelo.***

Durante los primeros 30 días de tratamiento se evalúa la cantidad de Fluoresceína producida tomando muestras los días 0, 5, 20 y 30 del tratamiento.

En este experimento se mide colorimétricamente la Fluoresceína producida luego de 3 hs de incubación de la muestra de suelo en el buffer de reacción. Los resultados se presentan en la Figura V-19.

La Figura muestra que todas las concentraciones de residuo producen una inhibición de la actividad enzimática respecto del control y que el efecto inhibitorio no guarda proporción con la concentración inicial de residuo en suelo.



**Figura V-19 :** Evolución de la producción de Fluoresceína (3 hs de incubación) en los sistemas API-1,25%, API-2,5%; API-5% y API-10% en suelo durante 90 días de tratamiento.

#### V.2.1.a.2 Evaluación de la cinética de hidrólisis del FDA.

La determinación de la actividad de hidrolasas medida a través de la Fluoresceína producida luego de 3hs de incubación de las muestras con el sustrato FDA, aparentemente no permite apreciar un efecto de la concentración de residuo aplicado sobre la actividad enzimática del sistema.

Con la intención de mejorar la sensibilidad del ensayo se determina la cantidad de Fluoresceína producida en función del tiempo de incubación de la muestra de suelo con el FDA.

En cada punto de muestreo la actividad enzimática es determinada luego de 1, 2, 3 y 4 hs de incubación de la mezcla de reacción.

La cinética se realiza a los 30, 90, 120, 165 y 285 días de iniciado el proceso de biorremediación sobre muestras de los sistemas API y del sistema Control.

La Figura V-20 (a) y (b) muestran la cinética de hidrólisis del FDA determinada en a los 30, 90, 120, 165 y 285 días de tratamiento.

En ella se observa que:

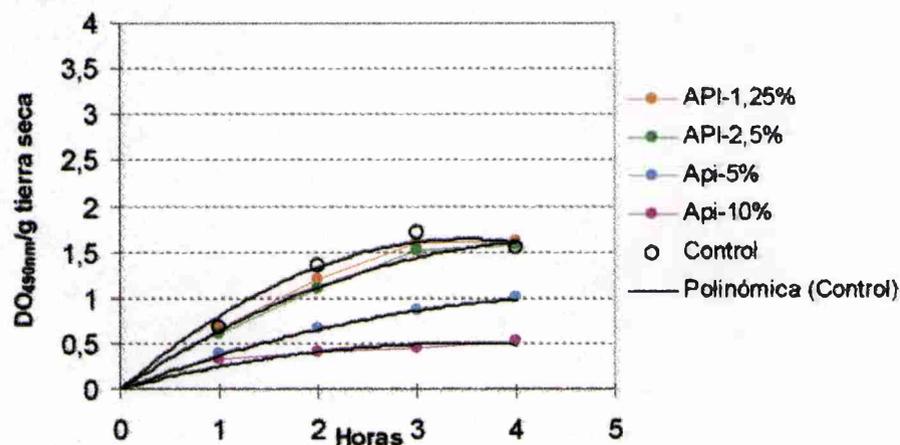
- ⊕ Conforme aumenta el tiempo de incubación aumenta la producción de Fluoresceína.
- ⊕ La cinética del Control muestra un máximo en la producción de Fluoresceína a los 120 días y desciende a los valores originales al finalizar el tratamiento.



La estimulación de la actividad microbiana del suelo limpio puede atribuirse al acondicionamiento del sistema durante el tratamiento que permite la exposición de diferentes sustratos a la degradación microbiana por hidrolasas, esterasas y lipasas.

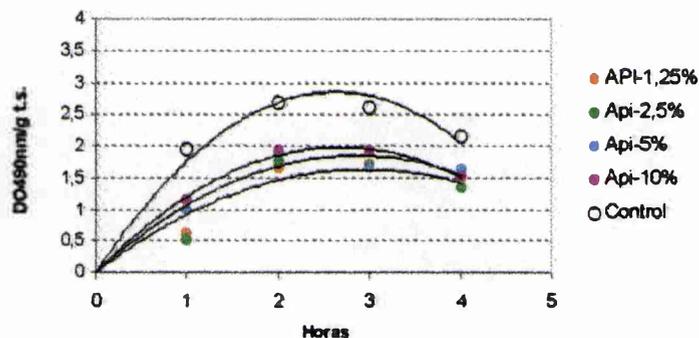
- ⊕ La presencia del residuo en todas las concentraciones produce una inhibición de la cinética de hidrólisis respecto del Control hasta los 120 días.
- ⊕ A los 30 días de tratamiento se aprecia que el efecto de inhibición del residuo aumenta al aumentar la concentración.
- ⊕ La inhibición enzimática de los sistemas contaminados es mayor en el período comprendido entre los 90 y 120 días de tratamiento e independiente de la concentración de residuo. Luego los sistemas contaminados igualan al Control.

**Cinética-30 días**

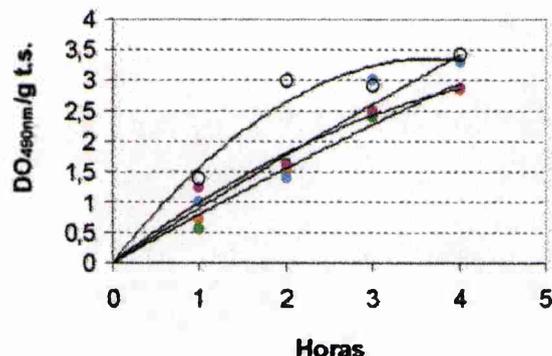


**Figura V-20 (a):** Cinética de hidrólisis de FDA a los 30 días del proceso de biorremediación, en comparación con el sistema Control.

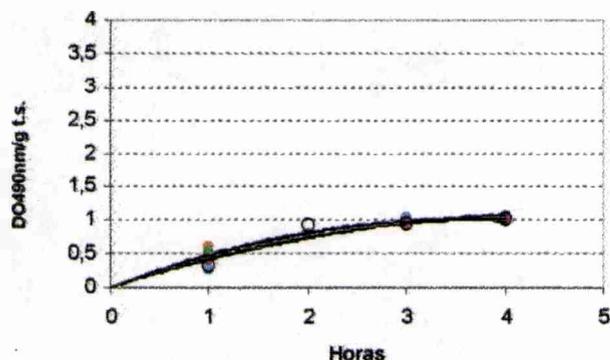
Cinética-90 días



Cinética- 120 días



Cinética-165 días



Cinética- 285 días

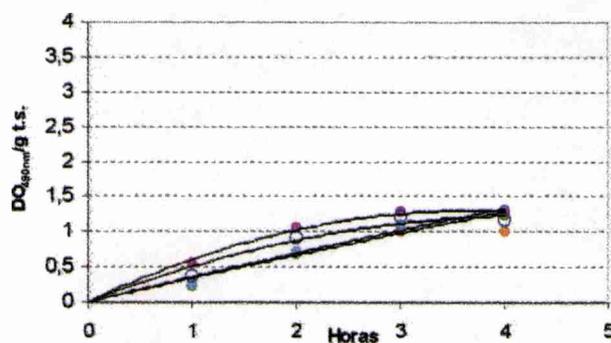


Figura V-20 (b): Cinética de hidrólisis de FDA a los 90, 120, 165 y 285 días del proceso de biorremediación, en comparación con el sistema Control.

**V.2.1.a.3 Estimación de la Velocidad inicial de hidrólisis y la influencia de la concentración de residuo aplicado.**

Con el fin de independizarnos del tiempo de hidrólisis del sustrato (FDA) se calcula la velocidad inicial ( $v_o$ ) de la reacción de hidrólisis para todos los sistemas durante el proceso de biorremediación.

Para dicho cálculo se procede, en primer lugar, a modelar el comportamiento de los puntos obtenidos experimentalmente en las cinéticas de producción de Fluoresceína en función de las horas de incubación, según una función polinómica (Figura V-20).

En segundo lugar se halla la velocidad inicial derivando dicha función respecto del tiempo, para  $t = 0$ .

A manera de ejemplo:

$$DO_{490nm}/g = -0,1238 t^2 + 0,8854 t + 0,116$$

$$\frac{d(DO_{490nm}/g)}{dt} = -0,2476t + 0,8854$$

para la condición  $t = 0$

$$V_0 = \left[ \frac{d(DO/g)}{dt} \right]_{t=0} = 0,8854$$

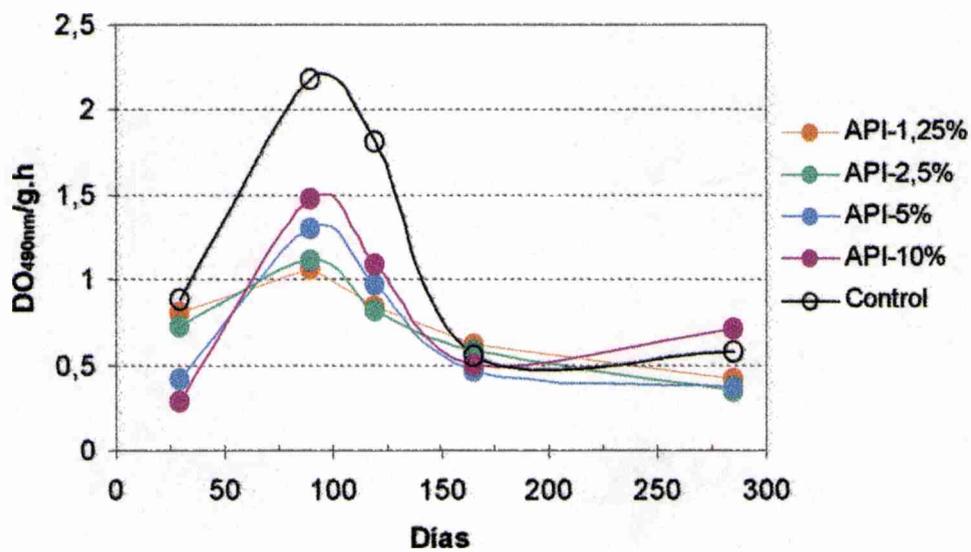


Figura V-21: Efecto de la concentración del residuo API sobre la velocidad inicial de hidrólisis de FDA ( $v_0$ ) durante el proceso de biorremediación en los sistemas API y en el Control.

La Figura V-21 muestra los cambios producidos en la  $v_o$  durante el tratamiento en los sistemas API y en el Control. De su análisis se aprecian las siguientes tendencias:

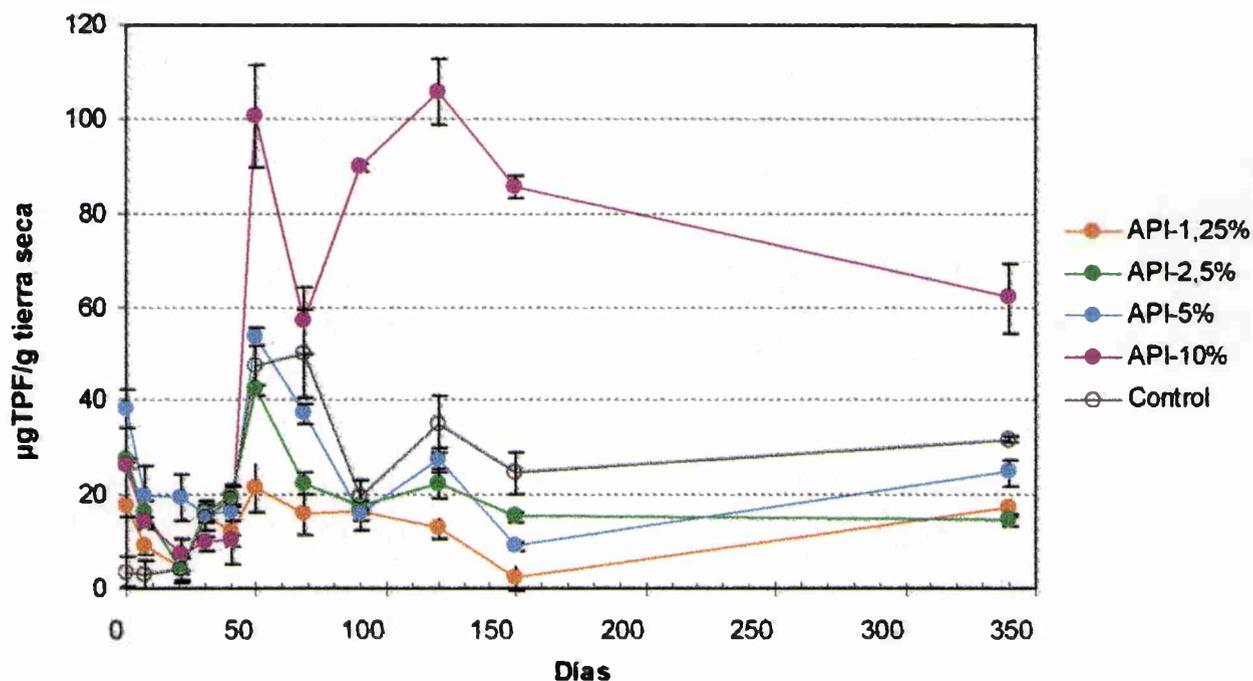
- ⊕ La presencia del residuo, en todas las concentraciones, produce un efecto inhibitor de la  $v_o$ .
- ⊕ A los 30 días se observa que la  $v_o$  en los sistemas contaminados es menor conforme aumenta la concentración inicial de residuo aplicado.
- ⊕ Todos los sistemas alcanzan un valor máximo de  $v_o$  a los 90 días del tratamiento, acompañando el comportamiento del Control pero siempre evidenciando inhibición enzimática.
- ⊕ A los 90 días se invierte el efecto de la concentración de residuo sobre la  $v_o$ . El sistema API-10% presenta la mayor  $v_o$ .
- ⊕ Todos los sistemas igualan su  $v_o$  al valor del sistema Control a partir de los 165 días de tratamiento.

#### **V.2.1.b Descripción del proceso de biorremediación a través de la actividad de deshidrogenasas.**

La determinación de la actividad deshidrogenasa de la comunidad microbiana de los sistemas se realiza según el protocolo de Thalmann (1968) que consiste básicamente en la incubación de una muestra del sistema de suelo con un aceptor artificial de electrones como el Cloruro de Trifenil tetrazolium (TTC) en un buffer adecuado. Luego de la incubación se mide colorimétricamente el producto reducido Trifenil Formazán (TPF) a una longitud de onda de 580 nm.

La actividad deshidrogenasa es determinada periódicamente durante el proceso de biorremediación en todos los sistemas contaminados y en el Control.

Las determinaciones de actividad son realizadas por triplicado en cada punto de muestreo.



**Figura V-22:** Evolución de la actividad deshidrogenasa en los sistemas API-1,25%, API-2,5%; API-5% y API-10% y en el suelo Control durante el año de tratamiento.

La Figura V-22 muestra los resultados de la evolución de la actividad deshidrogenasa de los sistemas expresada como  $\mu\text{gTPF/g}$  tierra seca.

En la misma pueden distinguirse tres fases:

- ⊕ Fase Inicial ( $t_0$ ): la actividad determinada en forma inmediata a la incorporación del residuo muestra un efecto positivo o de estimulación de la actividad enzimática. Siendo ésta directamente proporcional a la concentración de residuo incorporado hasta el 5%. La concentración del 10% muestra menor actividad aunque superior al Control. Este comportamiento podría atribuirse al tipo de respuesta que ciertos tóxicos producen a bajas concentraciones estimulando la actividad deshidrogenada (Kwan, 1991).
- ⊕ Fase temprana ( $t < 40$  días): luego del efecto de estimulación inicial todos los sistemas contaminados muestran un descenso en la actividad de la enzima deshidrogenasa. El Control registra un ligero ascenso, debido a la estimulación producida por las condiciones de incubación.

- ⊕ Fase tardía ( $t > 40$  días): se produce un significativo aumento en la actividad de todos los sistemas aunque únicamente el sistema con la mayor cantidad de barro (10%) supera significativamente los valores del Control

Hacia el final del tratamiento, la actividad del sistema API-10% permanece significativamente aumentada, en cambio en los sistemas menos contaminados la actividad esta significativamente disminuida respecto del Control ( $P \leq 0,05$ ).

Debido a las variaciones en la actividad enzimática observadas en el sistema Control durante la incubación, que enmascaran el efecto del residuo, se grafica la actividad *deshidrogenasa neta* como la diferencia entre la actividad del sistema contaminado y la actividad del suelo Control, Figura V-23. De esta forma puede apreciarse específicamente el efecto de la concentración del residuo sobre la actividad enzimática del sistema, tomando como referencia el valor 0 de actividad neta.

En la Figura V-23 se observa claramente el efecto de estimulación inicial y el posterior descenso en la actividad independientemente de la concentración de barro, hasta los 40 días de tratamiento.

A los 50 días se observa que los sistemas API-5% y API-10% experimentan un proceso de estimulación que sólo es significativo en el sistema API-10%.

La estimulación de deshidrogenasas en este sistema alcanza el máximo alrededor de los 100 días y luego comienza un paulatino descenso.

Contrariamente, los sistemas API-1,25%, API-2,5% y API-5% muestran un efecto inhibitorio en la actividad deshidrogenasa neta que se acentúa hacia los 68 días. Luego recuperan actividad, aunque finalizan en valores inferiores al Control.

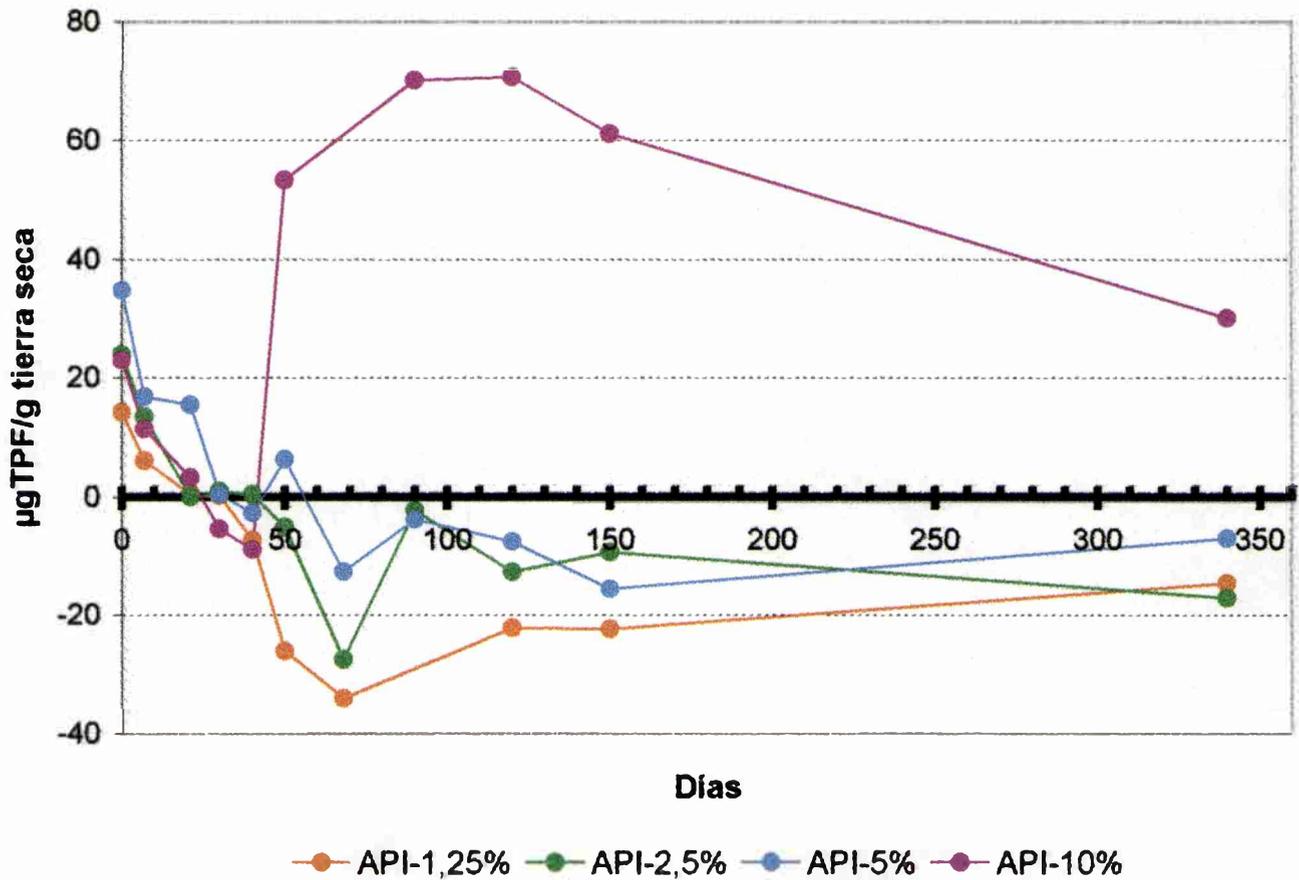


Figura V-23: Evolución de la actividad *deshidrogenasa neta* en los sistemas API durante el año del tratamiento.

**V.2.2 ESTIMACIÓN DEL EFECTO TÓXICO PRODUCIDO POR EL RESIDUO DURANTE EL TRATAMIENTO SOBRE LA COMUNIDAD MICROBIANA DEL SUELO.**

**V.2.2.a Parámetros de toxicidad**

Han sido definidos varios parámetros para expresar la toxicidad en relación con el metabolismo del suelo. De forma similar a la ampliamente utilizada LD<sub>50</sub> (Concentración del tóxico que causa el 50% de muerte en la población) fue sugerido por Babich y col. (1983) el concepto de "dosis ecológica" (EcD<sub>50</sub>).

El parámetro EcD<sub>50</sub> se define como la concentración del tóxico que inhibe el 50% de un proceso metabólico comparado con un sistema control sin contaminar. De la misma manera los parámetros EcD<sub>10</sub> y EcD<sub>25</sub> son definidos como aquellas concentraciones del tóxico que inhiben el 10% y el 25% de la actividad, respectivamente. Este concepto no incluye el elemento tiempo.

La inhibición de los procesos metabólicos producida por la mayoría de los tóxicos es un fenómeno reversible (Barkay y col., 1986).

Los valores de  $EcD_{50}$  varían según el tiempo en que se realiza la medida después que se ha producido la contaminación. Por ejemplo, la  $EcD_{50}$  obtenida al segundo día de la aplicación de Cd fue diez veces menor que la  $EcD_{50}$  obtenida a los cinco días, indicando cierta recuperación del efecto tóxico (Babich y col. 1983).

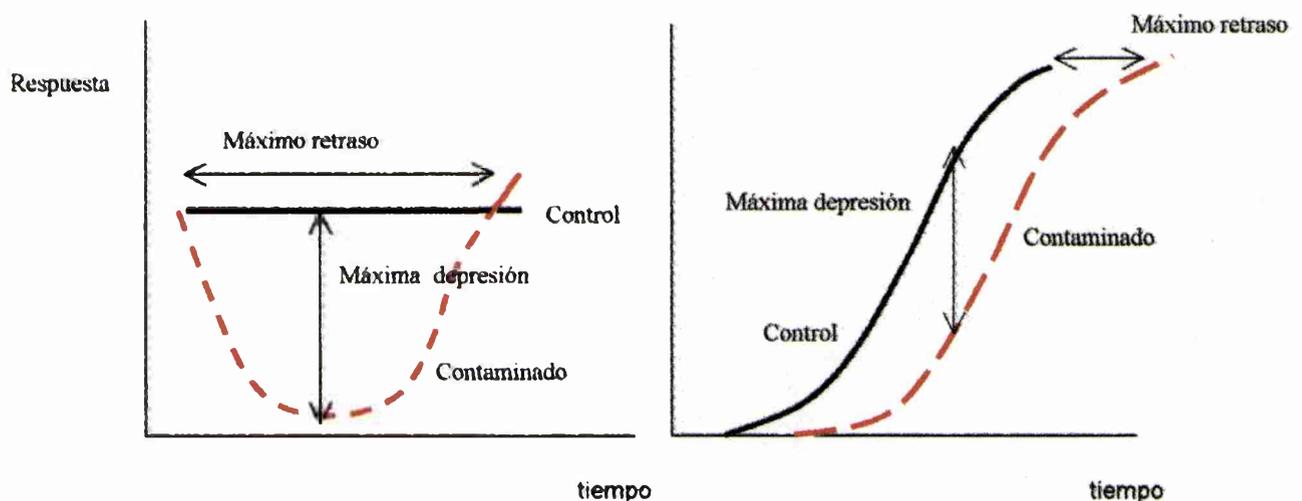
Estos resultados limitarían la utilidad de este parámetro como medida general de toxicidad.

Domsch y col. (1983) sugirieron un parámetro de toxicidad alternativo.

Estos autores clasificaron la respuesta microbiana a un tóxico como **Reversible** por un lado y **Persistente** por el otro.

Los efectos reversibles son subdivididos, dependiendo de la respuesta del sistema no contaminado utilizado como control, en dos categorías, Figura V-24.

1. Sistemas donde la actividad del control permanece constante y el tóxico induce una depresión en el sistema contaminado.
2. Sistemas donde se induce una respuesta tanto en el control como en el sistema contaminado, pero en este último la respuesta está retrasada comparando con el control.



**Figura V-24:** Efectos reversibles producidos por un contaminante sobre la actividad del suelo respecto de un sistema control donde la actividad permanece constante (izquierda) y donde es inducida una respuesta tanto en el sistema Control como en el contaminado (derecha). Tomado de Barkay y col., 1986.

A partir de este análisis surgen dos parámetros de toxicidad:

- ⊕ La **Máxima depresión**: la mayor diferencia observada entre la respuesta del sistema contaminado y el sistema control no contaminado.
- ⊕ El **Período de retraso**: el tiempo que el sistema contaminado tarda en recuperar su condición original.

En el caso de una respuesta microbiana *Persistente*, también es dividida en las mismas dos categorías. Es decir, el sistema control (no contaminado) puede mantener su respuesta constante o inducida y se define un único parámetro de toxicidad: el **Déficit** al finalizar el período monitoreado.

- ⊕ El **Déficit**: la diferencia residual entre el sistema control y el contaminado.

Mediante la relación de la Máxima depresión, el Déficit y el Período de retraso se logra introducir el factor tiempo en la descripción de la toxicidad.

Domsch y col. (1983) concluyen que la actividad microbiana de los sistemas naturales varía ampliamente aún en ausencia de sustancias tóxicas, y que los disturbios menores a 30 días deberían ser considerados normales o no significativos. En cambio, si los disturbios permanecen hasta 60 días los efectos podrían considerarse tolerables, mientras que los detectados más allá de los 60 días serían críticos.

#### V.2.2.b Estimación del efecto tóxico del residuo a través de la actividad de hidrolasas del suelo.

Al analizar el efecto de la concentración del residuo API sobre la actividad hidrolasa del suelo se observa que éste produce un tipo de respuesta reversible en todas las concentraciones aplicadas.

El sistema Control manifiesta una respuesta del tipo inducida durante el tratamiento.

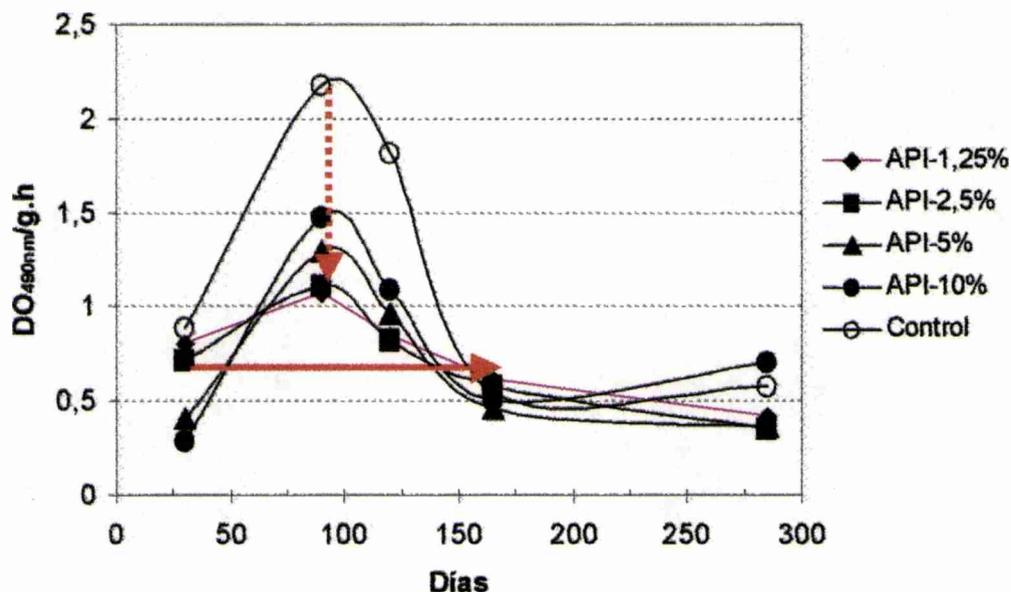
La Tabla V-5 muestra los parámetros estimados de Máxima depresión y Máximo retraso en la actividad hidrolasa, medida como velocidad inicial de hidrólisis ( $v_0$ ) en los sistemas contaminados.

**Tabla V-5:** Parámetros de toxicidad estimados en los sistemas contaminados a partir de la velocidad inicial de hidrólisis del FDA.

Sistema	Máxima Depresión <sup>†</sup> ( $DO_{490nm}/g.h$ )	Máximo retraso (días)
API-1,25%	1,11	165
API-2,5%	1,07	165
API-5%	0,89	165
API-10%	0,70	165

<sup>†</sup>Expresada como la diferencia entre la  $v_o$  del Control y la  $v_o$  del sistema contaminado.

Los datos de la Tabla V-5 muestran que el parámetro de Máxima depresión se ve influenciado por la concentración de residuo aplicado, de manera que al aumentar la concentración de residuo inicial la Máxima depresión determinada durante el tratamiento es menor. En cambio el Período de retraso sería independiente de la concentración en el rango estudiado. En la Figura V-25 se señalan ambos parámetros



**Figura V-25:** Cambios en la velocidad inicial de hidrólisis de FDA ( $v_o$ ) durante el proceso de biorremediación en los sistemas API y en el Control.

Referencias:  $\rightarrow$  , Período de retraso;  $\rightarrow$  , Máxima depresión.

Según se observa en la Figura V-25, a los 30 días el residuo produce una inhibición de la  $v_0$  directamente proporcional a la concentración de residuo aplicado.

Luego de 90 días el efecto inhibitorio se acentúa pero la relación con la concentración se invierte. Este comportamiento podría explicarse a través de la dinámica de las comunidades del suelo que constantemente se están adaptando a los recursos disponibles y condiciones ambientales, de forma que una depresión en la actividad detectada a corto plazo puede ser más adelante balanceada por un aumento en la actividad enzimática del sistema (Beyer y Linder, 1995).

El efecto inhibitorio sobre la actividad hidrolasas del sistema se extiende hasta los 165 días de tratamiento, Figura V-25. Esta etapa del tratamiento se caracteriza por la mayor densidad de poblaciones bacterianas degradadoras y la significativa inhibición de la población fúngica.

Durante el mismo período es determinada la presencia de compuestos genotóxicos generados por el proceso de biotransformación a partir de los compuestos originales del residuo (Morelli, 1999), (Figura V-16).

A partir de estas observaciones podría inferirse que la población fúngica sería sensible a los productos de transformación de la población bacteriana y que esa inhibición se manifiesta al nivel de la actividad hidrolasas hasta los 165 días. En el metabolismo degradador fúngico, las enzimas hidrolasas catalizan los primeros pasos de la transformación de la molécula de hidrocarburos, mientras que en el bacteriano juegan un rol principal las enzimas deshidrogenasas, Figura V-26.

El Máximo retraso de 165 días indica el tiempo necesario para la recuperación de la actividad del sistema contaminado en un proceso reversible. La duración de este período dependería de la permanencia de los productos de degradación, que al ser eliminados durante el tratamiento permiten la recuperación de la actividad hidrolasas del sistema.

Según la clasificación del Período de retraso sugerida por Domsch, 165 días es considerado crítico. Probablemente la selección de poblaciones degradadoras de PAH y la persistencia de un efecto genotóxico residual en los sistemas (Morelli y col, 2001) sean parte de las alteraciones producidas por el contaminante sobre la comunidad microbiana del suelo.

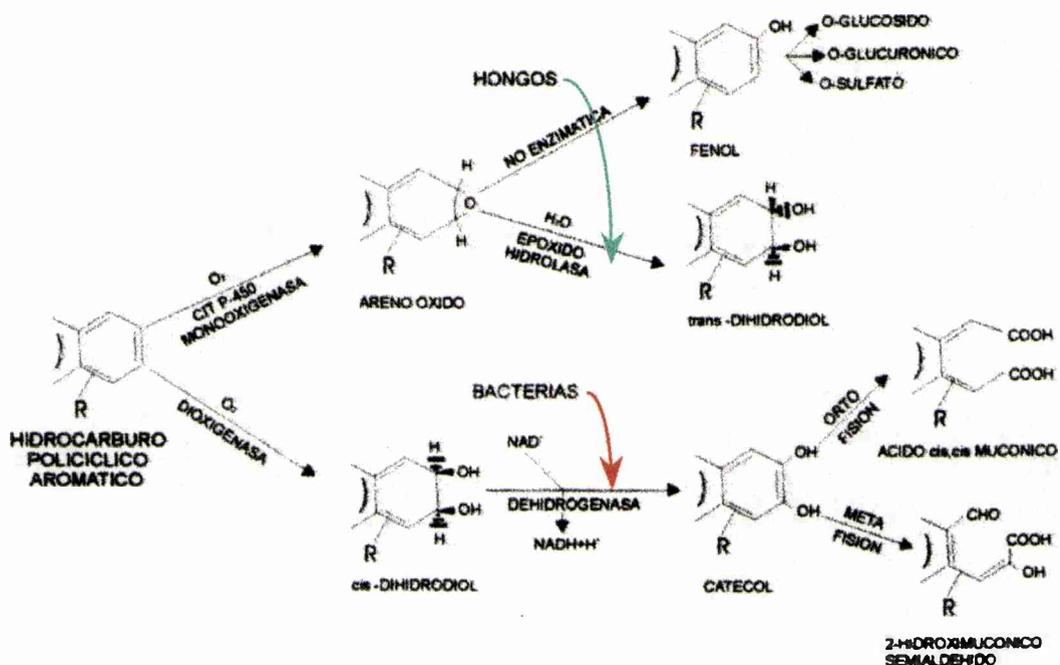


Figura V-26: Rutas metabólicas para la degradación de PAH. (Cemiglia, 1992)

### V.2.2.c Estimación del efecto tóxico del residuo a través de la actividad de deshidrogenasas.

Los resultados de la actividad deshidrogenasa del sistema Control muestran un efecto que fluctúa durante el tratamiento, Figura V-26.

Con el fin de anular estas variaciones inespecíficas que enmascaran el efecto del residuo, se estiman los parámetros a partir de los datos de *deshidrogenasa neta*, es decir la diferencia entre el valor del sistema contaminado y el control.

La Figura V-27 muestra los cambios en la actividad *deshidrogenasa neta*, y se señalan el período de tiempo en que los sistemas estuvieron enzimáticamente inhibidos (retraso) y la mayor inhibición producida durante el tratamiento (depresión).

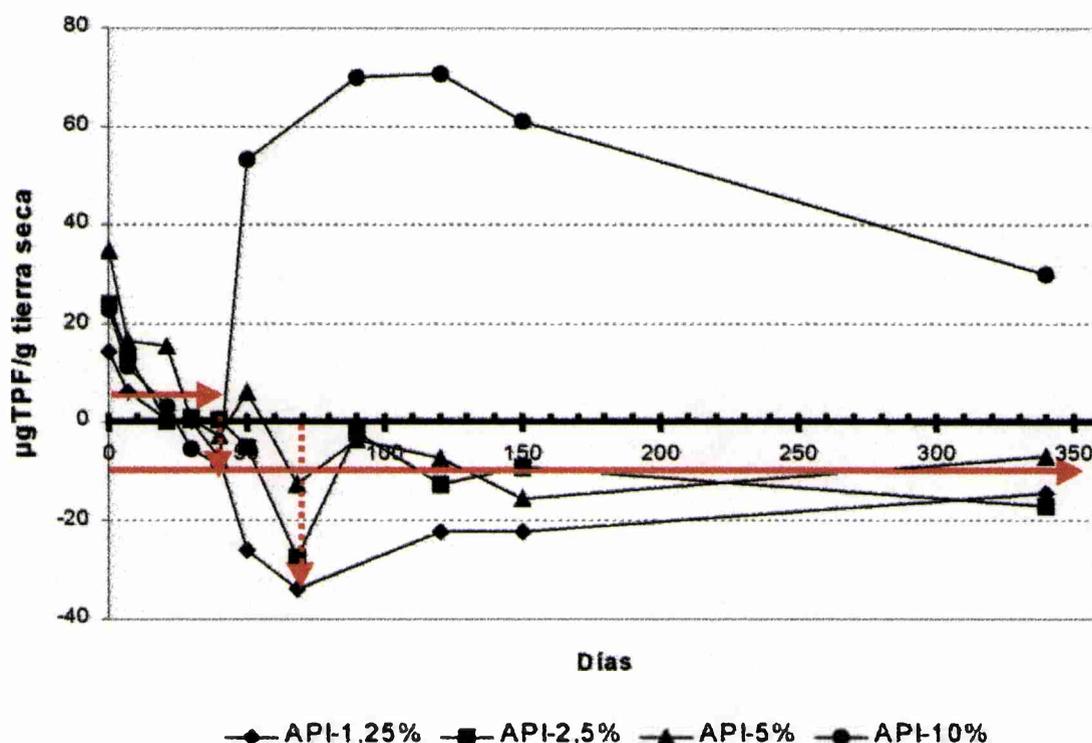


Figura V-27: Evolución de la actividad *deshidrogenasa neta* en los sistemas API durante el año del tratamiento. Referencias: → , Periodo de retraso; → , Máxima depresión.

La Tabla V-6 muestra los parámetros estimados en los sistemas contaminados. Se observa que la Máxima depresión es inversamente proporcional a la concentración inicial de residuo, este comportamiento repite lo observado en la actividad hidrolasa, demostrando la capacidad de adaptación de la comunidad.

Tabla V-6: Parámetros de toxicidad determinados en los sistemas contaminados a partir de los valores de actividad deshidrogenasa neta.

Sistema	Máxima Depresión <sup>†</sup> (µg TPF/g)	Máximo retraso (días)
API-1,25%	34,15	350
API-2,5%	27,56	350
API-5%	12,73	350
API-10%	8,98	40

<sup>†</sup> Expresada como el valor absoluto de la depresión observada en el sistema contaminado respecto del valor 0.

En la Figura V-27 se observa que, luego de la estimulación inicial, concentraciones de residuo menores o iguales al 5% producen una respuesta inhibitoria durante el tratamiento. En cambio, con el 10% de residuo, el período de inhibición dura aproximadamente 40 días y posteriormente se produce un efecto estimulador de la actividad enzimática.

La disminución de la actividad deshidrogenasa en el mismo período donde se establecen las poblaciones degradadoras de hidrocarburos, señala efectos opuestos que pueden ser explicados a través de la relación enzima – sustrato.

Al comienzo del tratamiento, ante una alta concentración de hidrocarburos asimilables, el sistema hidrocarburos-deshidrogenasa-O<sub>2</sub> muestran una alta afinidad que resultará en la biotransformación del hidrocarburo. La afinidad de la enzima por el O<sub>2</sub> no puede ser desplazada por el sustrato aceptor artificial de electrones TTC, utilizado para poner de manifiesto la actividad deshidrogenasa del sistema.

Una vez eliminada la fracción HTCG asimilable, se produce la sucesión de una población activamente degradadora de hidrocarburos a otra adaptada a la degradación de productos de transformación de la población primaria. Bajo estas nuevas condiciones, el sustrato TTC podría competir satisfactoriamente con el O<sub>2</sub>, por la enzima.

Debido a la estimulación inespecífica del suelo Control, solo la mayor concentración produce un aumento significativo de la actividad.

Los sistemas API-2,5% y API-5% desarrollan una menor actividad durante todo el tratamiento, marcando finalmente un déficit respecto del suelo Control.

En cambio el sistema API-10% desarrolla una mayor actividad que el suelo Control hasta el final del tratamiento.

Los metales pesados son los únicos ejemplos de tóxicos que inhiben la actividad deshidrogenasa, mientras que los contaminantes orgánicos pueden estimularla. Probablemente esta respuesta sea resultado de la mineralización de los tóxicos orgánicos (Barkay y col., 1986) y los primeros pasos en la transformación de los hidrocarburos.

Especialmente, la significativa estimulación determinada en el sistema API-10% se correlaciona con la mayor concentración de HTCG eliminados, la permanencia de niveles relativamente aumentados de poblaciones degradadoras de PAH y la persistencia de sustancias genotóxicas, Figuras V-7, V-15 y V-16.

Considerando que este sistema recibe la mayor carga de residuo y la degrada en aproximadamente el mismo tiempo que el resto de los sistemas que recibieron menores cargas, la dinámica de la actividad deshidrogenasa refleja la gran actividad degradadora de la comunidad del suelo ante la contaminación. Puede inferirse que el residuo produce una selección de poblaciones degradadoras cuya actividad deshidrogenasa es relevante durante la transformación genotóxica de los constituyentes del residuo.

Probablemente, este sistema continúe degradando los productos de transformación sin ningún acondicionamiento posterior a través de los mecanismos de la atenuación natural.

Comparando los parámetros de toxicidad estimados sobre la actividad de hidrolasas y deshidrogenasas surge que el sistema de deshidrogenasas sería más sensible a los cambios en la actividad de la comunidad del suelo, debido a que manifiesta un efecto de inhibición relativamente más agudo y una capacidad de recuperación más lenta respecto de la actividad de hidrolasas.

Sin embargo, los ensayos que determinan la actividad enzimática del suelo no pueden dar por sí solos una información global de la funcionalidad del sistema (Insam, 2001).

En la caracterización de la "caja negra" del suelo, el análisis de la actividad enzimática constituye una de las ventanas que junto con el análisis de las poblaciones, han aportado mayor información para la comprensión de la dinámica del proceso de biorremediación.

### **V.3 DESCRIPCIÓN DE LA DINÁMICA DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS MEDIANTE EL AJUSTE A MODELOS MATEMÁTICOS.**

El estudio del crecimiento de las poblaciones microbianas y actividades microbianas en suelo es una tarea difícil debido a que el suelo constituye un habitat heterogéneo con una extensa y muy adsorbente superficie que puede interferir con muchos métodos de medida tanto de niveles de población microbiana como de sustrato disponible para el desarrollo de las poblaciones (Schmidt, 1992; Atlas y Bartha, 1998).

La modelación de la dinámica de la población microbiana y actividad microbiana en suelo ha variado desde los modelos más simples a los modelos más complejos (Schmidt, 1992; Schmidt y Lipson, 2001).

Los mejores resultados obtenidos en la modelación de la dinámica de poblaciones han sido obtenidos con modelos de la respuesta biológica del suelo luego del agregado de diferentes sustratos. De esta manera el tamaño y la velocidad de crecimiento de una determinada población pueden ser determinados mediante el análisis de las curvas de consumo de sustrato o formación de producto aplicando modelos simples.

#### **V.3.1 APLICACIÓN DEL MODELO DE GOMPERTZ**

Existe una gran variedad de modelos que describen el comportamiento de los microorganismos bajo diferentes condiciones físicas o químicas, tales como temperatura, pH, actividad acuosa, etc. Una ecuación desarrollada según el modelo de Gompertz, ha sido considerada

estadísticamente suficiente para describir el crecimiento de determinados microorganismos en condiciones controladas de laboratorio (Zwietering et al., 1990).

El modelo describe la curva clásica de crecimiento con una fase de latencia, una fase de crecimiento exponencial y una fase estacionaria. Esta secuencia representa el crecimiento de un cultivo estático (batch) en laboratorio donde se proveen las condiciones óptimas de crecimiento durante un período limitado de tiempo.

Como una primera aproximación al estudio de la dinámica de poblaciones en el suelo se aplica esta función para describir el crecimiento de la población bacteriana del suelo a expensas de diferentes concentraciones de la mezcla compleja de hidrocarburos.

La expresión matemática que describe el modelo de Gompertz es la siguiente:

$$\ln N = \ln N_0 + A \cdot \exp \left[ \exp \frac{\mu_{m,e}}{A} \cdot (L - t) + 1 \right] \quad \text{donde,}$$

$N$  y  $N_0$  = tamaño de la población al tiempo  $t$  y  $t_0$ , respectivamente.

Definición de los parámetros según Gompertz:

Las poblaciones bacterianas crecen exponencialmente y usualmente su comportamiento es graficado como el logaritmo del tamaño de la población función del tiempo.

Las tres fases de la curva de crecimiento pueden describirse mediante tres parámetros:

- la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{máx}$ ), definida como la tangente en el punto de inflexión,
- el tiempo de latencia,  $L$ , definido como la intersección de esta tangente con el eje  $x$ ,
- y la asíntota,  $A = \ln(N_{máx}/N_0)$ , es el máximo valor de población alcanzado.

Las Figuras V-28 y V-29 muestran el crecimiento de las poblaciones BH en los sistemas tierra-residuo durante el proceso de biorremediación y el ajuste aplicando la ecuación de Gompertz.

Las Figuras V-30 y V-31 muestran el comportamiento de la población BDHC con el ajuste al modelo.

Puede observarse que para ambas poblaciones, la fase de crecimiento descrita por el modelo se ajusta hasta los 30 días aproximadamente en todas las concentraciones estudiadas.

Alrededor de los 50 días los niveles de población decrecen apartándose del modelo. Esta fase de decrecimiento se ajusta por regresión lineal.

El descenso de la población BH puede aproximarse mediante una recta de pendiente negativa  $k$ , que describe el comportamiento de la población hasta el final del tratamiento.

El descenso de la población BDHC se aproxima mediante una función lineal según dos etapas, la primera más rápida de pendiente  $k_1$ , y la segunda más lenta de pendiente  $k_2$ .

La Tabla V-7 muestra los parámetros estimados para las poblaciones BH y BDHC, que luego se analizarán con la intención de interpretar el efecto producido por la concentración de residuo sobre el comportamiento de las poblaciones bacterianas del sistema.

**Tabla V-7:** Parámetros estimados mediante la ecuación de Gompertz y regresión lineal de las curvas de crecimiento de las poblaciones BH y BDHC.

<i>Población BH</i>					
<i>Sistemas</i>	<i>L</i> (días)	<i><math>\mu_m</math></i> (1/día)	<i>g</i> (días)	<i><math>N_{m\acute{a}x}</math></i> (Ufc/g)	<i>k</i> (1/día)
API-1,25%	5	0,095	7	$4,75 \cdot 10^8$	0,0123
API-2,5%	0	0,120	6	$8,08 \cdot 10^8$	0,0089
API-5%	0	0,150	5	$8,71 \cdot 10^8$	0,0073
API-10%	0	0,140	5	$9,60 \cdot 10^8$	0,0036

<i>Población BDHC</i>					
<i>Sistemas</i>	<i><math>\mu_m</math></i> (1/día)	<i>g</i> (días)	<i><math>N_{m\acute{a}x}</math></i> (Ufc/g)	<i><math>k_1</math></i> (1/día)	<i><math>k_2</math></i> (1/día)
API-1,25%	0,194	4	$2,65 \cdot 10^8$	0,0571	0,0191
API-2,5%	0,301	2	$9,5 \cdot 10^8$	0,0867	0,0133
API-5%	0,326	2	$9,37 \cdot 10^8$	0,1415	0,0171
API-10%	0,245	3	$1,08 \cdot 10^9$	0,2976	0,0092

*g*: tiempo de duplicación de la población bacteriana.

El efecto producido por el acondicionamiento de la tierra del sistema Control sobre la población BH no se ajusta a la descripción del crecimiento según la función de Gompertz.

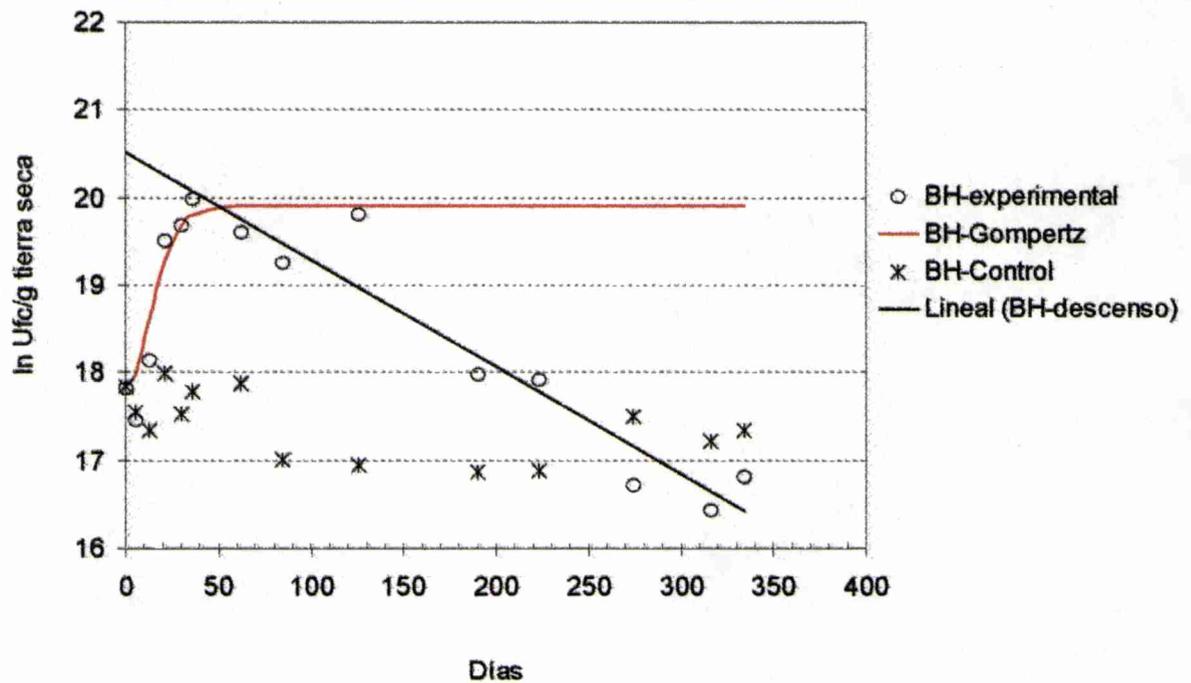
Respecto del efecto producido sobre la población BDHC de la tierra Control este se puede ser descrito según un comportamiento lineal con pendiente negativa,  $k_{Control} = 0,011/día$ .

Dicho comportamiento podría ser interpretado como la influencia que producen los sustratos disponibles del suelo sobre la población degradadora al consumirse durante la incubación del sistema.

Se observa que la velocidad de la segunda etapa de descenso de las poblaciones BDHC ( $k_2$ ) es del orden de la etapa de descenso de la población degradadora del sistema Control. De esta semejanza se podría inferir que luego de ser consumidos los hidrocarburos aportados por la

mezcla compleja del residuo, la población BDHC de los sistemas contaminados retoma el comportamiento del sistema original antes de la contaminación.

API-1,25%



API-2,5%

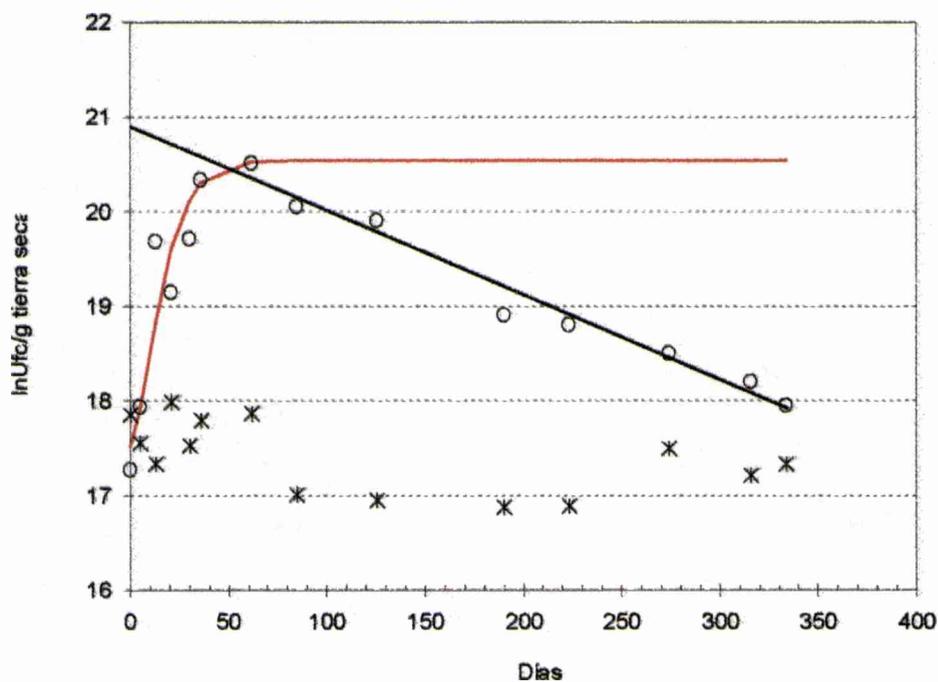


Figura V-28: Evolución de la población BH en los sistemas tierra-residuo durante el tratamiento. Ajuste aplicando el modelo de Gompertz y por regresión lineal.

API-5%

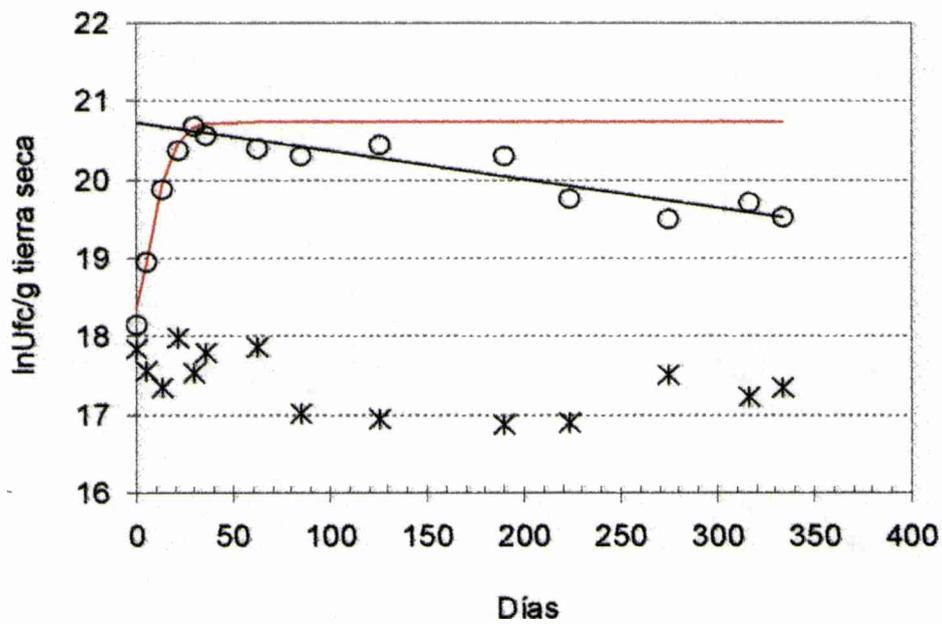
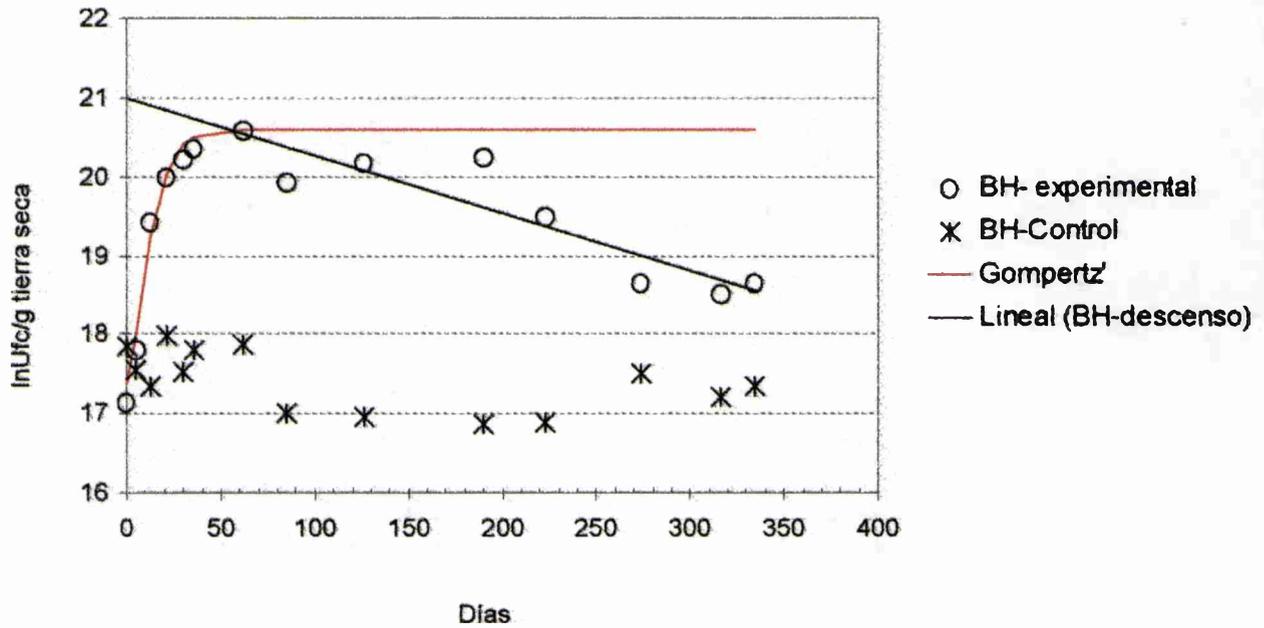
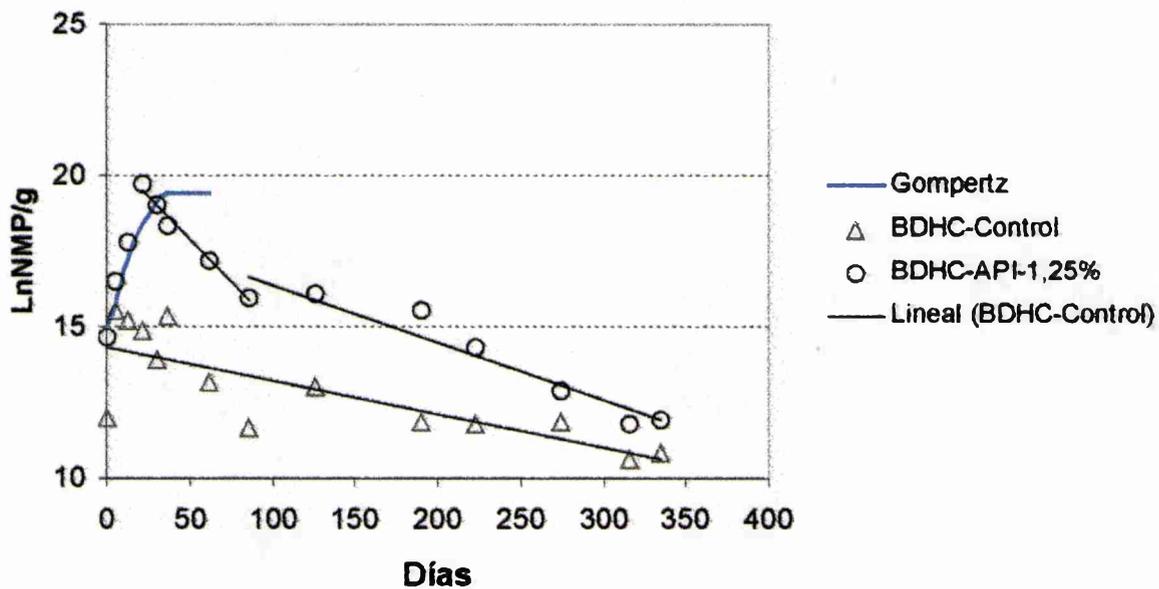


Figura V-29: Evolución de la población BH en los sistemas tierra-residuo durante el tratamiento. Ajuste aplicando el modelo de Gompertz y por regresión lineal.

**API-1,25%**



**API-2,5%**

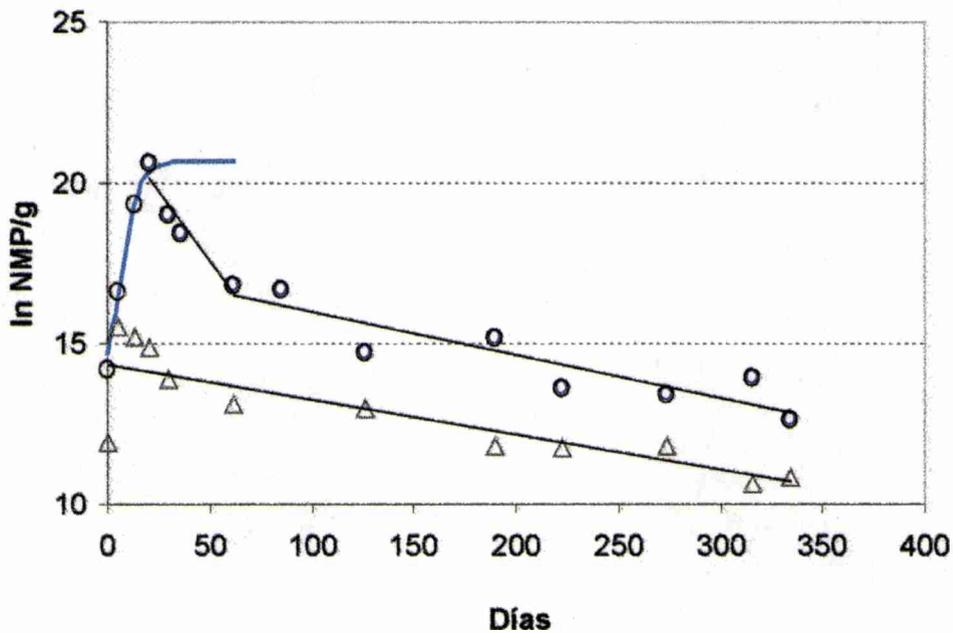
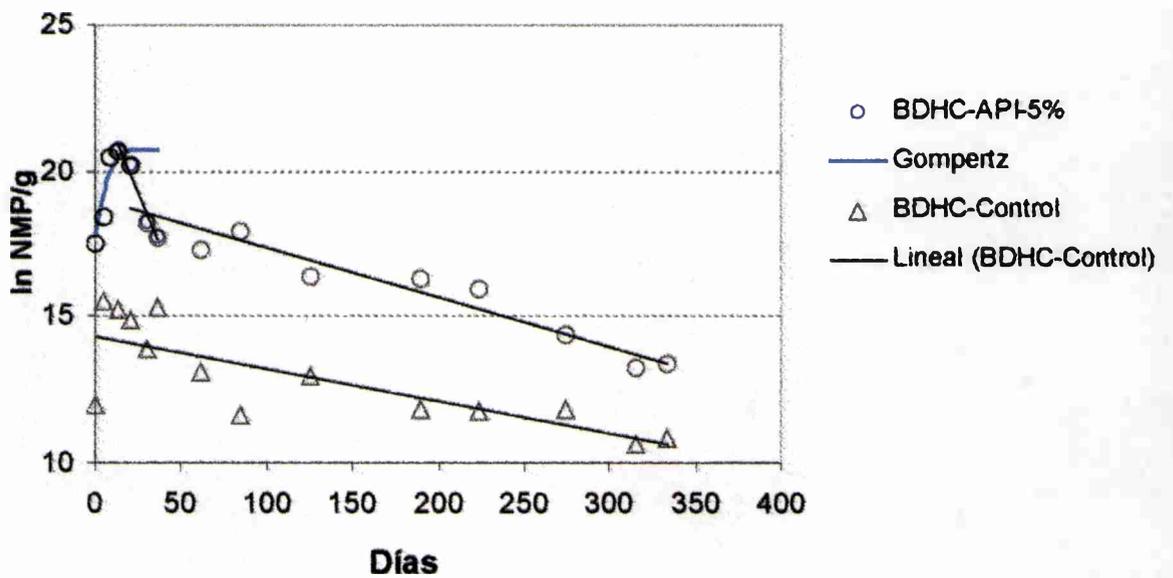


Figura V-30: Evolución de la población BDHC en los sistemas tierra-residuo durante el tratamiento. Ajuste aplicando el modelo de Gompertz y por regresión lineal.

API-5%



API-10%

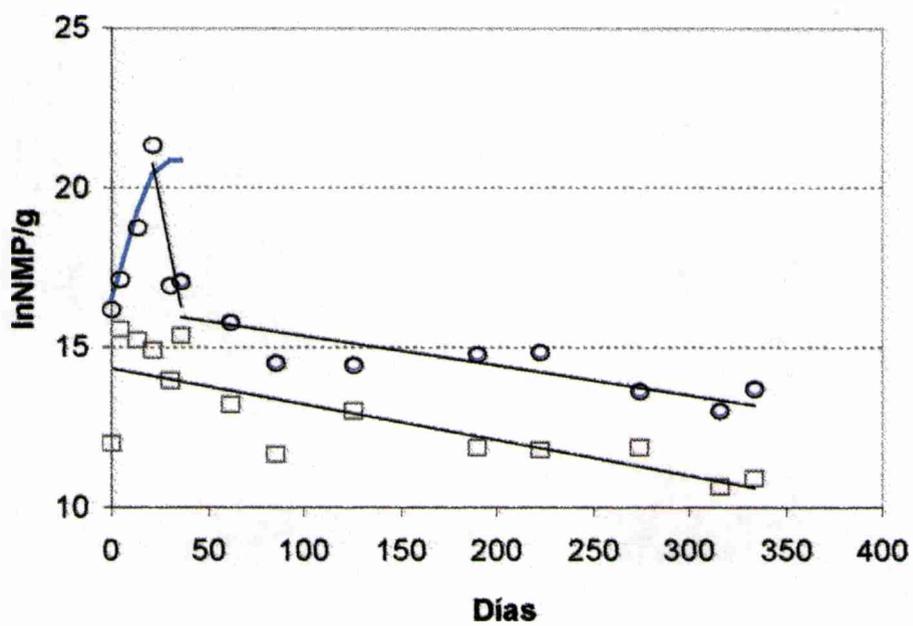
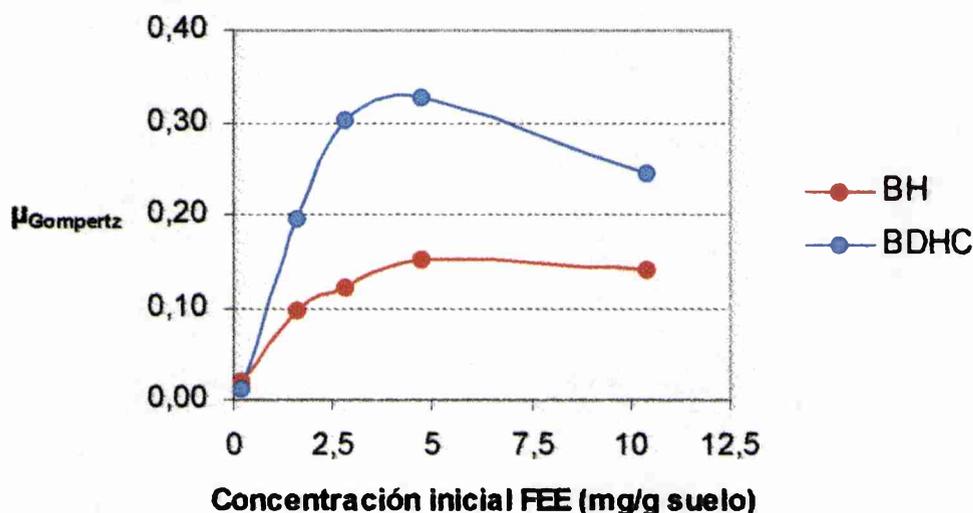


Figura V-31: Evolución de la población BDHC en los sistemas tierra-residuo durante el tratamiento. Ajuste aplicando el modelo de Gompertz y por regresión lineal.

### V.3.2 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DEL RESIDUO SOBRE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS.

La Figura V-32 muestra la influencia de la concentración del residuo API sobre la velocidad específica de crecimiento  $\mu$ , estimada según el modelo de Gompertz para ambas poblaciones.



**Figura V-32:** Velocidad específica de crecimiento  $\mu$  de las poblaciones BH y BDHC en función de la concentración inicial de residuo expresada como mg FEE/g tierra.

En la Figura V-32 puede observarse que:

- ⊕ la  $\mu$  de la población BH aumenta al aumentar la concentración de sustrato llegando al valor máximo en el sistema API-5%. Una mayor concentración de residuo no produce variación la  $\mu$  máxima alcanzada.
- ⊕ la  $\mu$  de la población BDHC muestra una respuesta más rápida que la manifestada por la población BH. Aumenta significativamente hasta el 2,5% de residuo. Alcanza la velocidad máxima con el 5% de residuo. Concentraciones superiores al 5% producen un descenso de la velocidad de crecimiento.

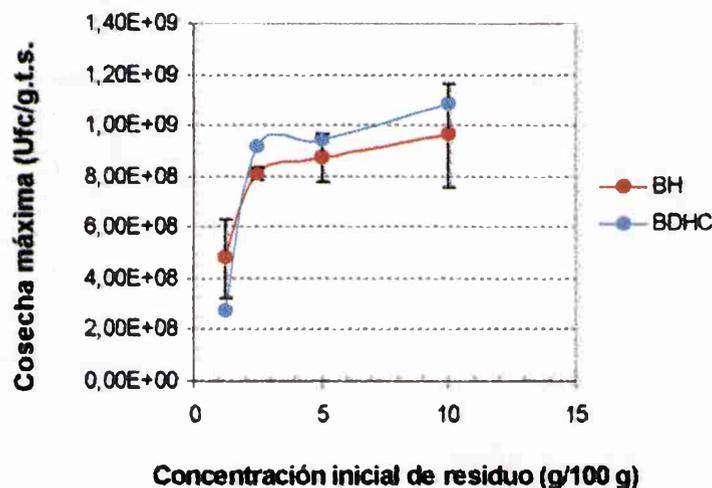
Comparando ambos comportamientos podría interpretarse que el residuo produce en la población BDHC una más rápida y acentuada selección de individuos que en la población BH. Esta población específica se desarrolla a expensas de los hidrocarburos asimilables del

contaminante a mayor velocidad que la población BH. Este comportamiento indicaría una eficiencia metabólica relativamente superior de esta población para convertir parte del sustrato en biomasa cultivable.

Una concentración mayor del 5% de residuo indicaría un efecto de saturación del sistema para la población BH. En cambio en la población BDHC el descenso en la velocidad indicaría un efecto inhibitorio en alguna fracción de la población impidiendo mantener el máximo valor alcanzado por el sistema.

### V.3.3 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DEL CONTAMINANTE SOBRE LA COSECHA MÁXIMA DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS.

La Figura V-33 muestra el tamaño máximo de población alcanzado en los sistemas para ambas poblaciones en función de la concentración inicial del contaminante.



**Figura V-33:** Relación entre el valor máximo de población obtenido ( $N_{max}$ ) y la concentración inicial de residuo, expresada como FEE (mg/g) para la población BH y como HC (mg/g) para la población BDHC.

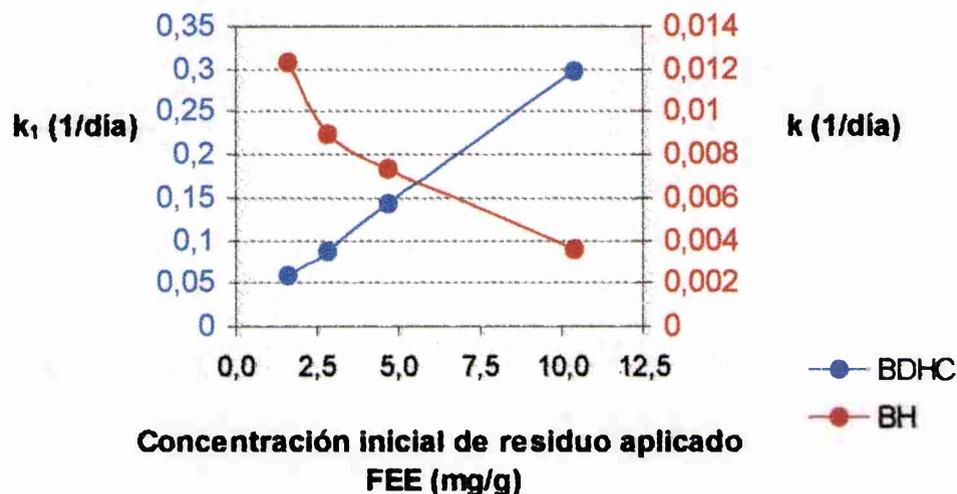
Puede observarse que ambas poblaciones responden en forma semejante ante el aumento de la concentración del residuo. Existe un significativo aumento en la cosecha máxima proporcional al residuo aplicado, a bajas concentraciones.

A concentraciones de residuo mayores que 2,5% no se producen aumentos significativos en la cosecha máxima indicando una saturación del sistema. Este comportamiento podría ser atribuido a un desbalance en la relación C/N producida al aumentar la concentración de hidrocarburos aplicados.

Este resultado se corresponde con el observado a través de la determinación de la FEE en los sistemas. Según se observa en la Figura V-4, las aplicaciones superiores al 2,5% no muestran un mayor porcentaje de eliminación de esta fracción.

#### V.3.4 INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DEL CONTAMINANTE SOBRE LA VELOCIDAD DE DECRECIMIENTO DE LAS POBLACIONES BACTERIANAS.

La Figura V-34 muestra la relación entre la velocidad de decrecimiento de las poblaciones bacterianas y la concentración inicial del residuo expresada como mg de FEE/g de tierra.



**Figura V-34:** Evolución de la velocidad específica de decrecimiento  $k$  de las poblaciones BH y de  $k_1$  de la población BDHC, en función de la concentración inicial de residuo API expresada como FEE/g de tierra.

En todos los sistemas las poblaciones BH descendieron uniformemente a una velocidad  $k$ , mientras que las poblaciones BDHC descendieron marcadamente en una primera etapa ( $k_1$ ) y lentamente hasta el final del tratamiento en una segunda etapa ( $k_2$ ).

Del análisis de la Figura V-34 surge que:

- ⊕ la velocidad de decrecimiento  $k$  de la población BH disminuye proporcionalmente con la concentración inicial del contaminante aplicado en tierra.

La población BH luego de alcanzar su máximo valor disminuye lentamente durante el tratamiento hasta su valor inicial, en los sistemas API-1,25% y API-2,5%. En cambio las concentraciones mayores de residuo sostienen un tamaño de población significativamente superior a los del suelo Control ( $P < 0,05$ ) durante el año de tratamiento, Figuras V-29.

La población BH alcanza su máximo valor a expensas de los diferentes componentes de la mezcla compleja del residuo. Tal variedad de sustratos permiten establecer una red de interacciones relativamente más diversa entre los individuos. Aumentaría así la capacidad de la comunidad para captar los nutrientes esenciales del desarrollo. También contribuye al pool de sustratos el aporte nutricional de los productos de degradación de la población primaria establecida en la etapa "temprana" del proceso.

Por lo tanto, aún cuando la fracción hidrocarburo cromatografiable ha descendido a valores significativamente bajos, existe una diversidad de sustratos disponibles para el establecimiento de una población secundaria heterótrofa aparentemente más estable, como lo indica la disminución de la velocidad de decrecimiento en los sistemas más contaminados.

La dinámica de las poblaciones BH podría asociarse a la cinética de eliminación de la fracción extractable en éter (FEE). Esta fracción abarca los sustratos que son fuentes de carbono y energía para el mantenimiento de esta población.

- ⊕ la velocidad de decrecimiento  $k_1$  de la población BDHC aumenta proporcionalmente con la concentración inicial del contaminante aplicado en tierra.

La dinámica de la población BDHC como lo muestran las Figuras V-30 y V-31, desde la incorporación del residuo, pasando por su valor máximo hasta reducirse rápidamente a un tamaño próximo al inicial, puede asociarse a la rápida cinética de eliminación de la fracción HTCG.

El período transcurrido hasta que la población BDHC desciende rápidamente es comparable al tiempo de degradación de la fracción asimilable de los hidrocarburos aportada por el residuo, de 44 días en promedio.

También puede apreciarse en las Figuras V-30 y V-31 que, la duración de la etapa activa es inversamente proporcional a la concentración de residuo. Al aumentar la concentración de residuo aplicado disminuye el tiempo en que esta población vuelve a su tamaño inicial.

Esta observación podría fundamentarse en el impacto inicial del residuo sobre la comunidad microbiana del suelo. La contaminación ejerce una presión de selección que contribuye a la pérdida de determinados biotipos resultando una comunidad relativamente menos estable.

La menor estabilidad se asociaría al rápido descenso de la población BDHC al aumentar la contaminación inicial.

Desde el punto de vista ecológico esta población seguiría el patrón de las estrategias *r*, desarrollando rápidamente en función de la concentración de sustrato y desapareciendo cuando éste se consume.

Respecto de la segunda etapa de decrecimiento observada en las poblaciones BDHC, en todos los sistemas estas fueron del orden de la determinada en el sistema Control.

Este comportamiento estaría indicando que al consumirse los HT-GC la población finalmente establecida se comporta como la población degradadora de un suelo sin contaminar.

Durante la incubación, la población BDHC del suelo Control va disminuyendo su capacidad degradadora natural asociada al agotamiento de los sustratos biodisponibles, produciéndose el envejecimiento del sistema.

### V.3.5 APLICACIÓN DEL MODELO LOGÍSTICO DE ANDREWS

Considerando que el modelo de Gompertz describe el crecimiento de una población bajo condiciones óptimas y durante un periodo limitado de tiempo en cultivo estático, mediante la estimación de sus parámetros fue posible analizar el efecto de la concentración inicial del contaminante sobre las poblaciones bacterianas del suelo.

En la naturaleza raramente se dan estas situaciones de crecimiento a expensas de un sustrato bajo condiciones controladas. El crecimiento microbiano en el ambiente ocurre bajo condiciones que pueden ser comparadas con el final de la fase de crecimiento exponencial, es decir, cuando el sustrato suplementado ha sido consumido y es insuficiente para sostener el crecimiento de una comunidad.

El crecimiento bajo tales condiciones está limitado por el aporte del sustrato y no por la cantidad de masa celular (autocatalíticamente multiplicada) (Schlegel, 1999).

La curva de crecimiento exponencial en esta situación debe ser modificada por un término de *Capacidad* transformándose en una curva de crecimiento logística (Andrews, 1991).

$$dN/dt = \mu \cdot N - (\mu/N_{m\acute{a}x} \cdot N^2)$$

$N$  = número de microorganismos

$$\mu = \text{velocidad específica de crecimiento} = \frac{dN}{dt} \left( \frac{1}{N} \right)$$

$N_{m\acute{a}x}$  = máxima densidad de población alcanzada en el ambiente, puede estar determinada por la concentración de un sustrato limitante.

En ecología  $N_{m\acute{a}x}$  es usualmente representado por  $C$ , la *capacidad de intercambio con el ambiente* (Atlas, 1998).

El término Capacidad se refiere a un sustrato limitante, por ejemplo una fuente de carbono, un donador o aceptor de electrones, fuentes de nitrógeno, azufre o fósforo. De acuerdo con el principio de Liebig, el crecimiento estará limitado por el sustrato que se consume primero, cuando el resto aún se encuentre disponible en exceso.

La eficiencia con la que puede ser alcanzada la Capacidad final  $C$  está determinada por la afinidad por el sustrato,  $K_s$  de la población estudiada. La constante de afinidad por el sustrato se define como la concentración de sustrato a la cual la población alcanza la mitad del valor de la velocidad máxima de crecimiento (Schlegel, 1999).

La ecuación logística de Andrews describe el crecimiento de una población bajo condiciones limitantes del ambiente. En situaciones donde el tamaño de la población ( $N$ ) es bajo la velocidad con que cambia la población esta determinada por la velocidad específica de crecimiento  $\mu$  y el segundo término no influye en la ecuación.

Cuando el tamaño de la población es grande, la velocidad de crecimiento queda determinada por el máximo de tamaño de población alcanzado, o en otros términos por la capacidad de intercambio con el ambiente ( $C$ ).

El mayor incremento en la densidad de población ocurre cerca de densidad de población 0 (máxima velocidad de crecimiento).

El mínimo incremento en la población ocurre en el máximo de densidad de población, cuando no hay un posterior incremento en la biomasa o en el número de individuos de la población. El incremento en la masa ( $dN$ ) se aproximará a 0, conduciendo a una densidad de población final estable.

Con la intención de aplicar el modelo de Andrews se calcula el incremento del tamaño de la población en cada intervalo de tiempo, es decir la velocidad de crecimiento  $dN/dt$ .

La velocidad se calcula a partir de los datos experimentales de tamaño de población BH y BDHC. Las Figuras V-35 y V-36 muestran el comportamiento de la velocidad de crecimiento de las poblaciones BH en cada sistema tierra-residuo durante el tratamiento.

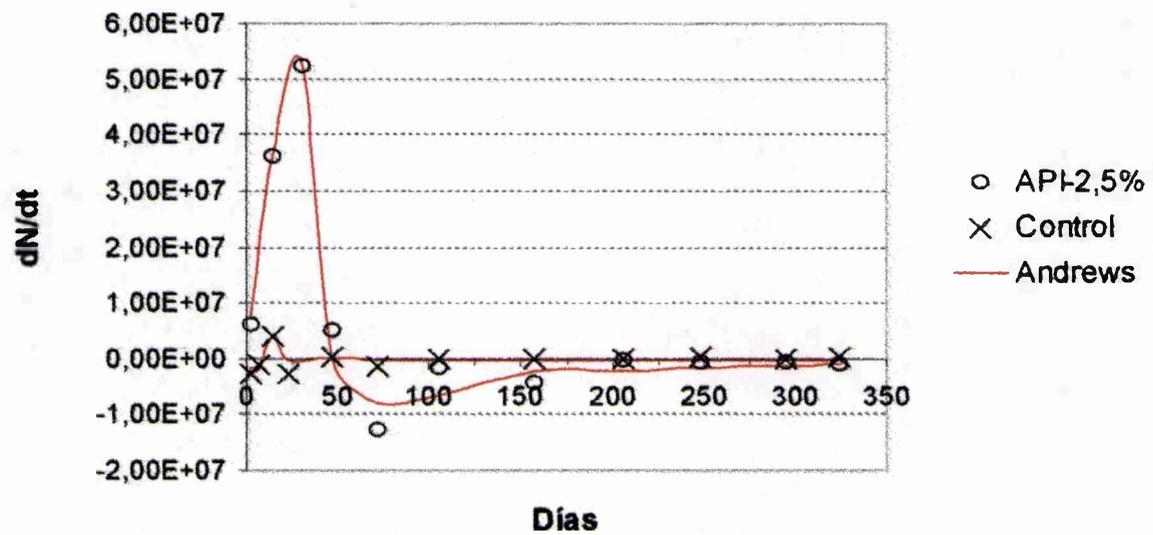
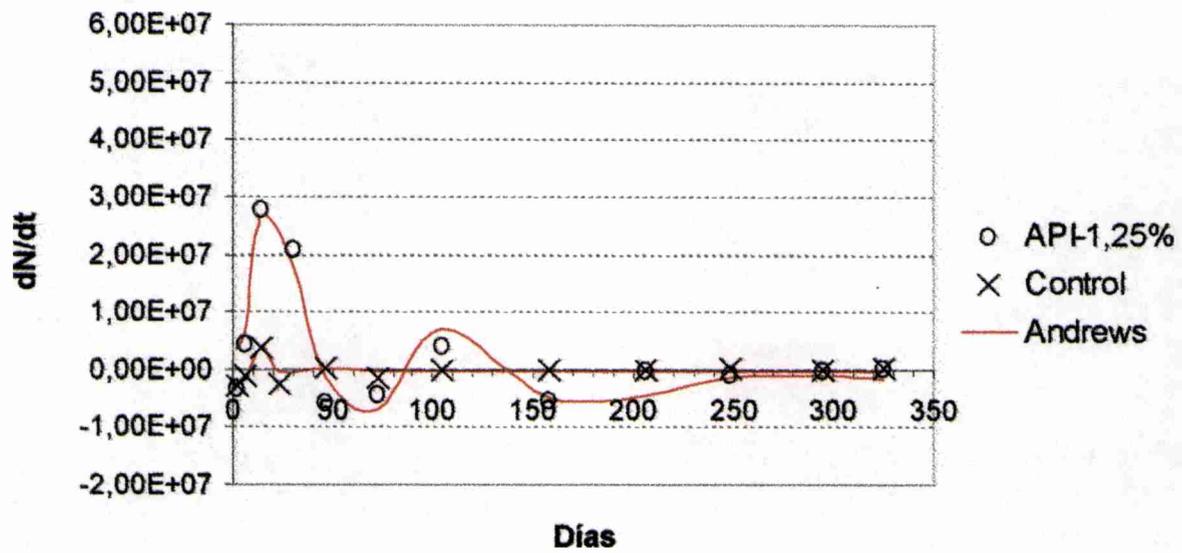


Figura V-35 : Evolución de la velocidad de crecimiento expresada como el incremento del tamaño de la población en el intervalo de tiempo correspondiente,  $\frac{\Delta U_{fc} / g}{\Delta t}$  y ajuste según modelo de Andrews. Población BH del sistema API-1,25% y API-2,5%, en comparación con la del sistema Control.

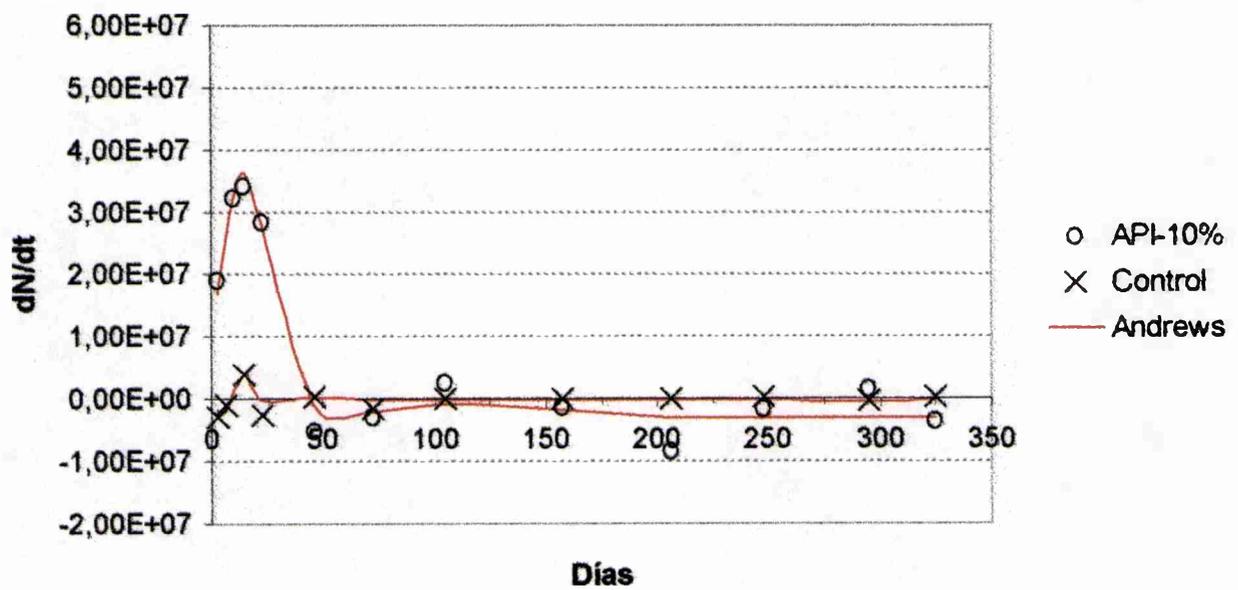
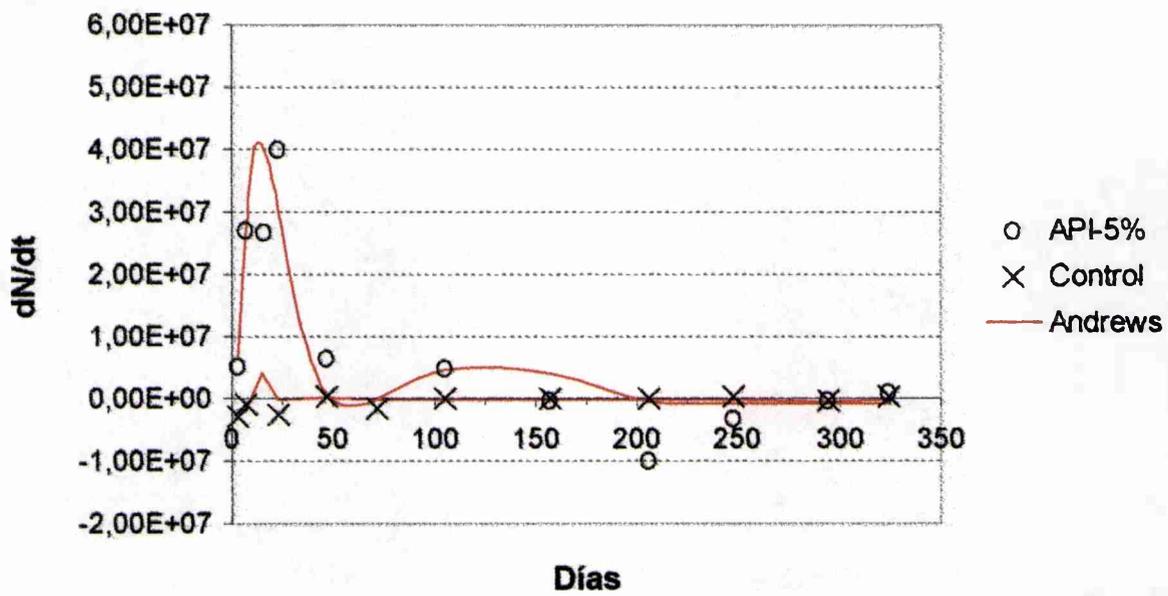


Figura V-36 : Evolución de la velocidad de crecimiento de la población BH, expresada como el incremento del tamaño de la población en el intervalo de tiempo correspondiente,  $\frac{\Delta U/c/g}{\Delta t}$  y ajuste según modelo de Andrews. Sistema API-5% y sistema API-10% en comparación con el sistema Control.

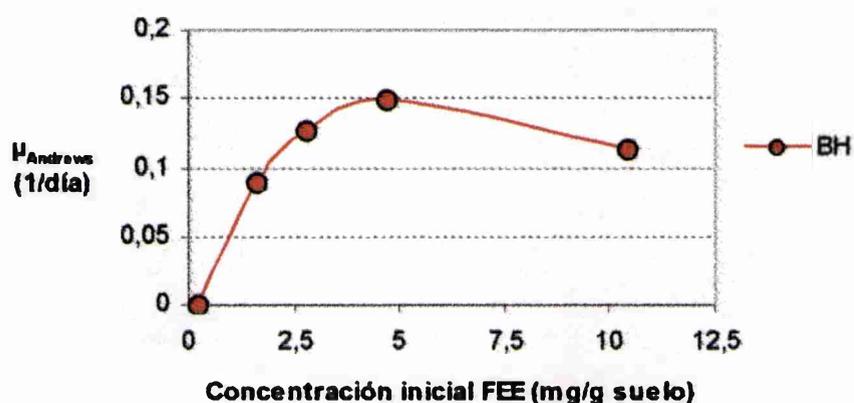
En ellas se observa que:

- ⊕ La velocidad de crecimiento  $dN/dt$ , alcanza su valor máximo aproximadamente a los 25 días en todas las concentraciones estudiadas. El valor máximo corresponde a la velocidad específica de crecimiento determinada por el modelo de Gompertz como la tangente en el punto de inflexión de la curva. La Tabla V-8 muestra la velocidad específica y la Capacidad ( $N_{\max}$ ) de la población BH estimada por Andrews.

**Tabla V-8:** Velocidad específica de crecimiento y Capacidad de intercambio estimada de acuerdo al modelo de Andrews aplicado a la población BH.

Sistemas	API-1,25%	API-2,5%	API-5%	API-10%
$\mu \pm sd$ (1/ día)	$0,089 \pm 0,023$	$0,127 \pm 0,010$	$0,148 \pm 0,020$	$0,113 \pm 0,007$
C (Ufc/g)	$2,80 \times 10^7$	$1,73 \times 10^9$	$7,74 \times 10^8$	$1,29 \times 10^9$

- ⊕ Los valores de  $\mu$  (velocidad específica de crecimiento) estimados según Andrews son similares a los estimados por Gompertz. Se observa el aumento proporcional a la concentración de residuo hasta el 5%. A diferencia de lo estimado según Gompertz, el menor valor de  $\mu$  estimado en el sistema API-10% estaría indicando un efecto inhibitor en la población BH.



**Figura V-37:** velocidad de crecimiento específica  $\mu$  estimada según Andrews, de las poblaciones BH en función de la concentración inicial de residuo expresada como FEE.

- ⊕ Independientemente de la concentración de residuo todos los sistemas descienden rápidamente su velocidad ( $dN/dt$ ) a valores próximos al cero a partir de los 50 días, aproximadamente.

Mediante la aplicación del modelo logístico pudo determinarse que el residuo estimula el crecimiento de la población heterótrofa a una velocidad que alcanza el máximo a los 25 días en todos los sistemas.

Las poblaciones continúan el crecimiento hasta aproximadamente los 50 días de tratamiento, período que coincide con el tiempo de degradación de los hidrocarburos cromatografiables.

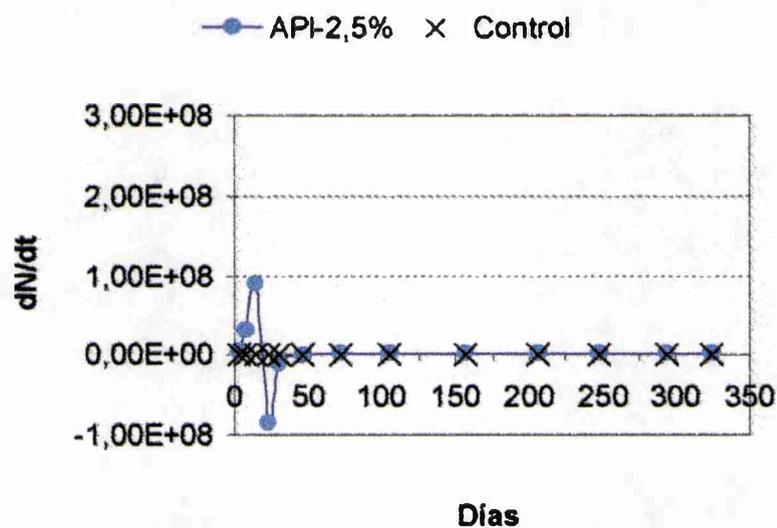
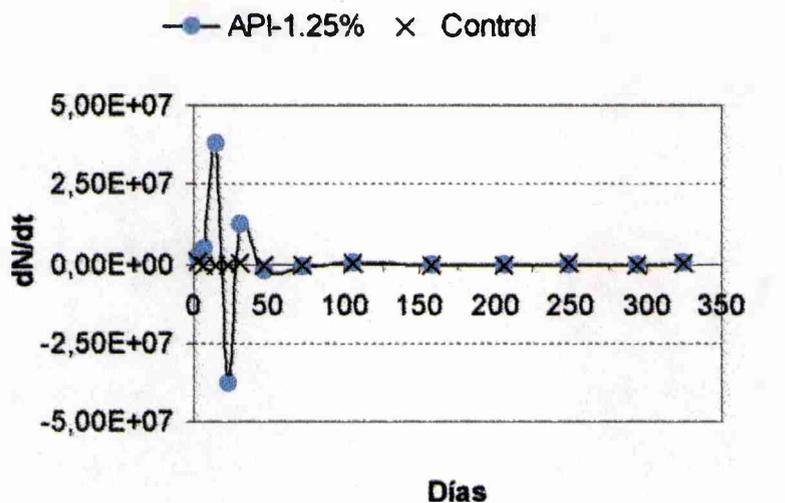
Habiéndose determinado que en todos los sistemas se eliminan aproximadamente el mismo porcentaje de hidrocarburos cromatografiables (80%), prácticamente en el mismo tiempo (44 días en promedio) podría inferirse a través de este modelo que la población BH ha desarrollado a expensas de los hidrocarburos asimilables del residuo.

Esta observación concuerda con el predominio de la población degradadora sobre la heterótrofa determinado en las primeras semanas de tratamiento, Figura V-12. Lo que indicaría que toda la población heterótrofa es degradadora de hidrocarburos.

Respecto de las poblaciones BDHC, las Figuras V-38 y V-39 muestran la dinámica de la velocidad de crecimiento de estas poblaciones en los sistemas tierra-residuo durante el tratamiento.

En ellas se observa un marcado ascenso en la velocidad y un rápido descenso en corto tiempo, por efecto de la incorporación del residuo en todas las concentraciones.

Debido a la naturaleza de los datos experimentales, la dinámica no pudo ser descrita mediante el modelo logístico.



**Figura V-38:** Evolución de la velocidad de crecimiento de la población BDHC del sistema API-1,25% y API-2,5%, expresada como el incremento del tamaño de la población en el intervalo de tiempo correspondiente  $\frac{\Delta Ufc/g}{\Delta t}$ .

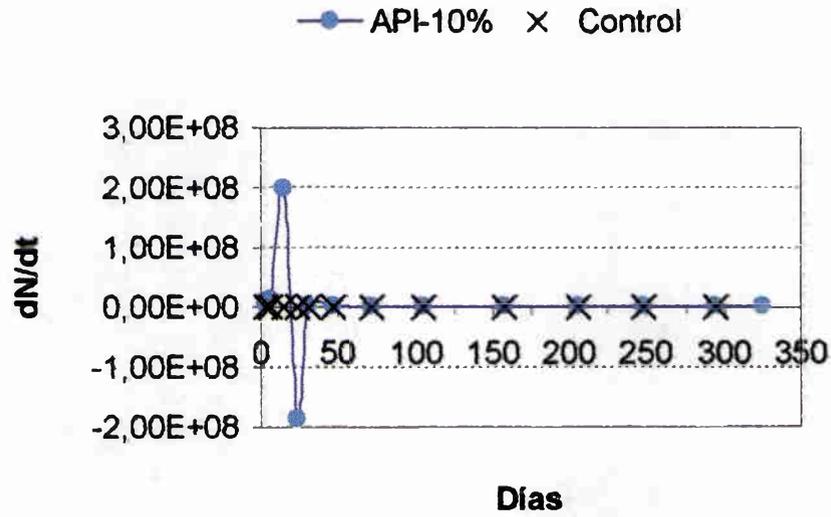
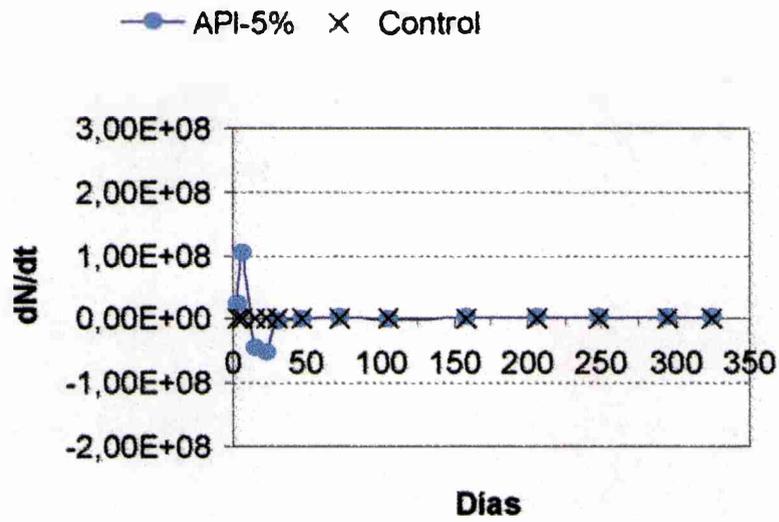


Figura V-39: Evolución de la velocidad de crecimiento de las poblaciones BDHC del sistema API-5% y API-10%, expresada como el incremento del tamaño de la población en el intervalo de tiempo correspondiente  $\frac{\Delta U_{fc} / g}{\Delta t}$ .

Un problema que presenta la ecuación logística es ser una ecuación empírica que no especifica que parámetros controlan a la velocidad de crecimiento.

Lo que sí especifica es que la velocidad de crecimiento disminuye a medida que la densidad de población se aproxima a su valor máximo ( $N_{m\acute{a}x}$ ) ó Capacidad del sistema, pero los factores que determinan el nivel de Capacidad no se expresan en la ecuación.

De esta manera el modelo de Andrews puede aplicarse independientemente de cuales sean los factores que estén controlando el sistema.

Esto último podría ser una ventaja en el ajuste de las curvas, pero limita su utilidad como herramienta para el entendimiento de la dinámica de las poblaciones microbianas en sistemas naturales.

### V.3.6 APLICACIÓN DEL MODELO DE MONOD

Un modelo de bases mecanicísticas que explica el crecimiento microbiano en condiciones de sustrato limitante es la ampliamente conocida ecuación de Monod.

La ecuación describe la relación entre la concentración de un nutriente limitante y la velocidad específica de crecimiento de una población de microorganismos según

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_s + S}$$

donde,

S= concentración del sustrato limitante

$\mu_{m\acute{a}x}$ = velocidad específica máxima de crecimiento

$K_s$ = constante de afinidad por sustrato (igual a la concentración del sustrato limitante cuando el sistema alcanza la mitad de la velocidad máxima de crecimiento,  $\mu_{m\acute{a}x}/2$ )

La principal ventaja de la ecuación de Monod sobre la logística es que explica el paulatino descenso de la población microbiana en respuesta a la disminución de la concentración del sustrato limitante.

La velocidad de crecimiento microbiano se relaciona con la concentración de sustrato mediante la misma función por la cual la actividad de una enzima se relaciona con la concentración de su sustrato específico.

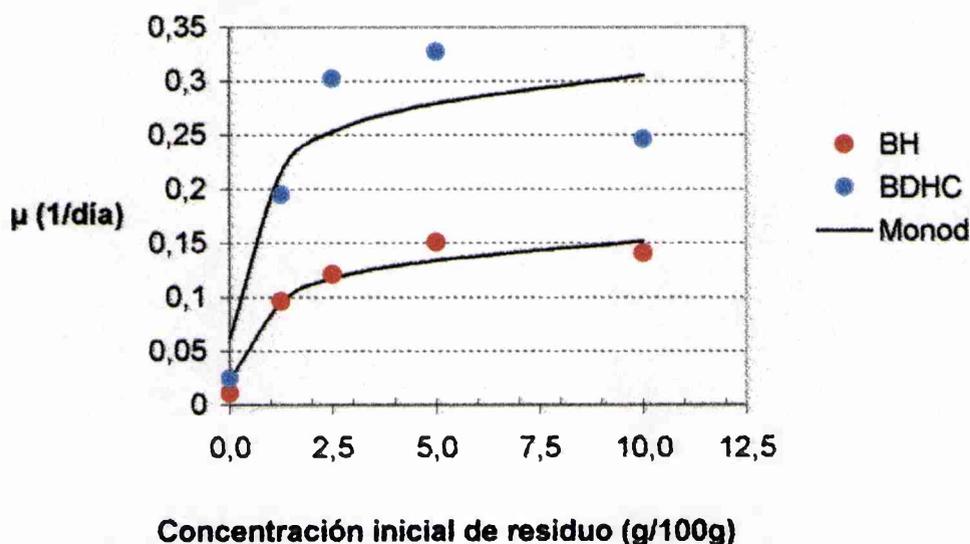
Esta relación, originalmente descrita por Michaelis-Menten, se fundamenta en que la velocidad de crecimiento está esencialmente determinada por la velocidad del paso metabólico

más lento, que es frecuentemente el transporte del sustrato a través de la membrana bacteriana catalizado por un determinado *carrier*. Entonces el crecimiento depende del aporte del sustrato siguiendo una curva de saturación, con  $K_m$  como la constante de saturación del sustrato.

A pesar de que la ecuación de Monod es análoga a la descrita por Michaelis-Menten, el significado de los parámetros  $K_s$  y  $K_m$  es diferente.

Mientras Michaelis-Menten describe un proceso catalizado por una enzima, la cinética de Monod describe procesos de naturaleza más compleja, en donde varios sistemas enzimáticos están involucrados (Egli, 1995).

Con la intención de evaluar la aplicabilidad de la ecuación de Monod al sistema complejo tierra-residuo, se aplica la función a los datos de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$  estimada por el modelo de Gompertz) en función de la concentración inicial del residuo expresada como HTCG, Figura V-40.



**Figura V-40:** Efecto de la concentración inicial de residuo sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de las poblaciones BH y BDHC en los sistemas tierra-residuo. Concentración expresada como hidrocarburos cromatografiables. Ajuste según el modelo de Monod.

El ajuste del comportamiento de  $\mu$  en función de la FEE da un valor de  $K_s$  con un alto coeficiente de variación comparando con el valor de  $K_s$  estimado en función de los HTCG. Considerando que al principio del tratamiento la fracción de los HTCG es representativa del

residuo y que ambas poblaciones desarrollan inicialmente a expensas de los hidrocarburos del residuo se realizarán los ajustes en función de esta fracción.

De la Figura V-40 puede inferirse que la ecuación de Monod describe aceptablemente la relación entre la  $\mu$  de la población BH y la concentración inicial de hidrocarburo en los sistemas API-1,25%; API-2,5%; API-5% y API-10%.

En el caso de la población BDHC el modelo pareciera describir el comportamiento solo a bajas concentraciones de hidrocarburos.

La Tabla V-9 muestra los parámetros estimados mediante el modelo de Monod: el valor máximo de velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) de las poblaciones microbianas a expensas del residuo y la constante media de saturación del sistema ( $K_s$ ).

Puede apreciarse que la  $\mu_{\max}$  de la población BDHC es aproximadamente el doble que la  $\mu_{\max}$  de la población BH.

Los valores estimados de  $K_s$ , indicarían que la población BDHC tiene una mayor afinidad por su sustrato específico que la población BH. Aunque el  $K_s$  de la población BDHC no resulta confiable debido al alto valor de desvío standard obtenido.

**Tabla V-9:** Velocidad específica máxima de crecimiento y constante de afinidad por el sustrato de las poblaciones BH y BDHC, estimadas mediante la ecuación de Monod.

Poblaciones	$\mu_{\max} \pm sd$ (1/día)	$K_s \pm sd$ (mg HTCG/g)
BH	0,161 ( $\pm 0,018$ )	0,506 ( $\pm 0,248$ )
BDHC	0,309 ( $\pm 0,058$ )	0,292 ( $\pm 0,336$ )

Esta imprecisión en la estimación de la constante de afinidad de la población BDHC puede atribuirse en parte, a la influencia que ejerce la compleja matriz de suelo sobre la biodisponibilidad del residuo.

Dicha influencia se fundamenta en la naturaleza de las interacciones de los diferentes constituyentes del residuo con la matriz del suelo. La adsorción de los diferentes constituyentes a las partículas orgánicas o inorgánicas del suelo tenderían a disminuir el flujo de las moléculas del sustrato hacia las células microbianas, dificultando a los microorganismos alcanzar los valores aparentes de  $K_s$ . También existiría una disminución en la velocidad de difusión de los contaminantes en el suelo debido a la mayor distancia que debe cubrir el sustrato en este ambiente (Schmidt, 1992).

Observando la Figura V-40 se podría inferir que a baja concentración de residuo predominan los efectos positivos de los sustratos asimilables sobre las poblaciones, permitiendo el

desarrollo de las poblaciones a su velocidad máxima. A concentraciones mayores al 5%, si bien existe una respuesta positiva de la población, ésta no sigue un patrón de saturación por el sustrato. De lo que podría inferirse que las sustancias no asimilables comienzan a competir por los sitios receptores en la célula resultando en una inhibición de la velocidad de crecimiento, como se aprecia en el menor valor de  $\mu$  determinado de la cinética de crecimiento de la población BDHC del sistema API-10%.

En el estudio de la dinámica de poblaciones microbianas que degradan compuestos tóxicos en suelo fue observada la variación de valores estimados de  $\mu_{\max}$  y  $K_s$  con la concentración de sustrato agregado al suelo (Schmidt y Gier, 1992). Dicho comportamiento fue atribuido a la existencia de más de una población con diferentes afinidades por el sustrato y Schmidt, 1992, lo explica a través una población microbiana con múltiples sistemas de captura o diferentes rutas metabólicas para un dado sustrato.

En el campo de la ecología microbiana la cinética de Monod, originalmente derivada a partir de experimentos con cultivos puros y sustratos simples, frecuentemente se aplica para describir el comportamiento de cultivos mixtos indefinidos creciendo a partir de sustratos simples o mezclas complejas de sustratos (Egli, 1995).

En este marco, los parámetros de crecimiento estimados  $K_s$  y  $\mu_{\max}$  representan los valores promedio entre las diferentes poblaciones de la comunidad. De esta forma, las constantes estimadas reflejan el crecimiento de una comunidad microbiana en un sistema multisustrato.

Aplicando este concepto a la dinámica de las poblaciones durante el proceso de biorremediación,  $\mu_{\max}$  y  $K_s$  no serían constantes durante el tratamiento, sino que variarían con el tiempo dependiendo de la composición de la biocenosis y el estado fisiológico de los cultivos responsables del crecimiento y consumo de sustratos (Kovárová-Kovar y Egli, 1998).

### V.3.7 ESTIMACIÓN DEL EFECTO DE INHIBICIÓN DEL RESIDUO SOBRE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO.

Con el objetivo de estimar el efecto inhibitorio que los componentes del residuo ejercen sobre las poblaciones bacterianas a altas concentraciones, se intenta aplicar modelos de crecimiento microbiano desarrollados a partir de sistemas que contemplan la dinámica de poblaciones sobre sustratos inhibitorios. Estos modelos describen desviaciones de la forma clásica de la ecuación de Monod.

Un modelo que ha sido aplicado en numerosos casos estudiados es la ecuación de Haldane (Schmidt, 1992; Watanabe, 1997).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot S / [K_s + S + (S^2 / K_i)]$$

Donde S,  $K_s$  y  $\mu_{\max}$  han sido definidas anteriormente y  $K_i$  es la constante de inhibición definida como la mayor concentración de sustrato a la cual  $\mu = \mu_{\max} / 2$ .

El autor hace notar que para distinguir  $K_i$  de  $K_s$  esta última puede ser redefinida como la menor concentración de sustrato a la cual  $\mu = \mu_{\max} / 2$ .

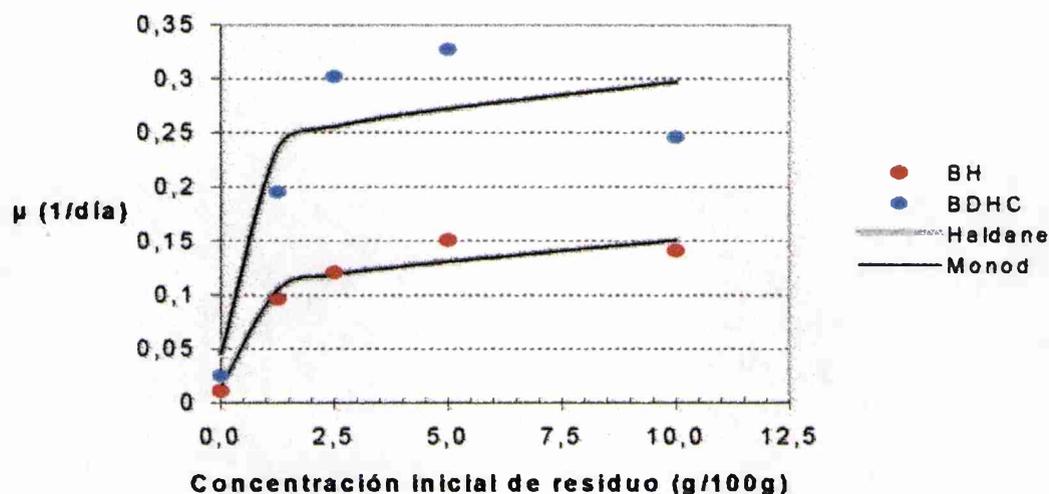
La ecuación de Haldane ha sido aplicada en la modelación de la dinámica de poblaciones microbianas como respuesta a un amplio rango de sustancias tóxicas, como el amonio, benzoato, nitrito,  $Fe^{++}$ , fenol y pentaclorofenol (Schmidt, 1992).

Una característica útil de esta ecuación es que tiende a la ecuación de Monod al disminuir la concentración del sustrato inhibitorio.

Al analizar el efecto que la mezcla compleja del residuo API produce sobre la velocidad de crecimiento bacteriano, se observa que el modelo de Haldane describe la dinámica de la población BH y BDHC de una forma coincidente a la descrita por la ecuación de Monod, Figura V-40.

La ecuación de Haldane permite estimar la constante de afinidad y la de inhibición del residuo sobre cada población.

En ambos casos la  $\mu_{\max}$  y la  $K_s$  estimada por Haldane son coincidentes con los parámetros estimados por Monod. Nuevamente el valor de  $K_s$  para la población BDHC es poco confiable debido al amplio desvío estándar que presenta, Tabla V-10.



**Figura V-41:** Efecto de la concentración inicial de residuo sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de las poblaciones BH y BDHC en los sistemas tierra-residuo. Ajuste según el modelo de Haldane.

**Tabla V-10:** Velocidad específica máxima de crecimiento y constante de afinidad por el sustrato de la población BH y BDHC estimados mediante la ecuación de Haldane.

Poblaciones	$\mu_{m\acute{a}x}$ (sd) (1/día)	$K_s$ (sd) (mg/g)	$K_i$ (sd) (mg/g)
BH	0,162 ( $\pm 0,022$ )	0,512 ( $\pm 0,30$ )	1493,0 ( $\pm 855,0$ )
BDHC	0,309 ( $\pm 0,071$ )	0,294 ( $\pm 0,40$ )	5462,0 ( $\pm 3481,0$ )

En ambas poblaciones la función estima un valor de  $K_i$  significativamente más alto que el  $K_s$ . Aparentemente, las poblaciones seleccionadas por efecto de la aplicación del residuo se establecerían manifestando una baja afinidad por los componentes inhibitorios del residuo. Es decir, que al inicio del tratamiento el crecimiento a expensas de la fracción fácilmente asimilable supera los efectos inhibitorios en ambas poblaciones. Así mismo, la población BDHC sería menos susceptible a los efectos inhibitorios del residuo que la BH.

**V.3.8 MODELOS QUE RELACIONAN LA ELIMINACIÓN DE UN SUSTRATO CON EL CRECIMIENTO DE LAS POBLACIONES.**

En muchos casos, la cinética de desaparición del sustrato o de formación de producto es una medida indirecta de la actividad de grupos microbianos específicos.

Mediante la aplicación de modelos adecuadamente diseñados es posible utilizar los datos de las cinéticas de eliminación del sustrato para estimar los parámetros de la dinámica de la población microbiana en sistemas relativamente simples (Schmidt, 1992).

Como se desarrolló en el punto anterior, la ecuación de Monod es aplicable a situaciones en donde el sustrato medido es el único factor limitante de la extensión y velocidad del crecimiento microbiano.

La mayoría de los modelos comúnmente aplicados a las cinéticas de desaparición de sustratos tienen en cuenta que la velocidad de crecimiento es controlada por un solo sustrato. En otras palabras, que el sustrato monitoreado es el limitante del crecimiento microbiano.

Sin embargo, cuando se estudian sustratos mixtos es posible que uno o más compuestos que no son determinados, puedan simultáneamente limitar la extensión o la velocidad del crecimiento microbiano.

Schmidt, 1992 deriva una familia de modelos cuyas bases teóricas se fundamentan sobre observaciones donde las células pueden metabolizar un sustrato mientras su velocidad de crecimiento esta siendo controlada por la concentración de otro sustrato o algún otro factor ambiental (modelos de sustrato dual).

Estas situaciones pueden darse comúnmente bajo condiciones naturales, especialmente si el sustrato analizado no es esencial (o factor determinante) para el crecimiento o cuando la concentración es muy alta o muy baja (Alexander, 1994).

Las ecuaciones (1) y (2) corresponden a dos de los modelos estudiados por Schmidt, que incorporan parámetros de crecimiento y han demostrado dar buenos ajustes a las curvas de eliminación de sustrato.

$$(1) \quad S = S_0 [\Phi(e^{\mu \cdot t} - 1) + 1]^{-k_2/\mu} \quad \text{Modelo-I}$$

$$(2) \quad S = S_0 \exp [-(k_1 / \mu_{\max})(e^{\mu_{\max} \cdot t} - 1)] \quad \text{Modelo-IV}$$

donde,

$S_0$  y  $S$ , concentración inicial de sustrato medido en el sistema y a un tiempo determinado, respectivamente.

$K_1$  y  $k_2$ , constante de velocidad de pseudo-primer orden

$\mu_{\max}$ , velocidad específica de crecimiento microbiano

$q = 1/Y$ , donde  $Y$  es el rendimiento expresado como biomasa producida ( $N$ ) a expensas del sustrato ( $S$ )

$X = N \cdot q$

$X_0$ ,  $X$  y  $X_{m\acute{a}x}$ , concentración de sustrato necesaria para producir una densidad de población  $N_0$ ,  $N$  y  $N_{m\acute{a}x}$  respectivamente.

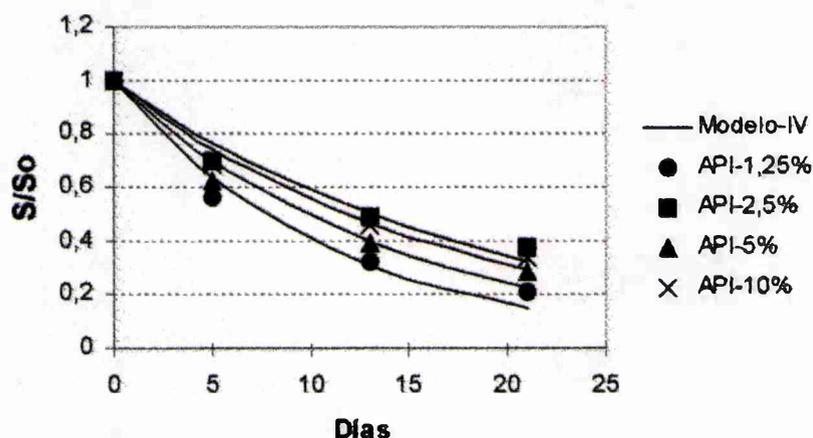
$$\Phi = X_0 / X_{m\acute{a}x}$$

Considerando al residuo como un sustrato complejo, la aplicación de esta clase de modelos podría predecir el comportamiento de la mezcla compleja sobre la dinámica de las poblaciones desde un punto de vista más ajustado a la situación real.

Como el crecimiento de las poblaciones ocurre durante los primeros días de tratamiento, se espera que el modelo describa la eliminación del sustrato en la primera etapa.

Haciendo referencia a la Figura V-9 se observa que la cinética de desaparición del sustrato determinado como HTCG, describe un rápido descenso en todos los sistemas desde el momento de la aplicación del contaminante. Paralelamente, ante la incorporación del residuo tanto la población BH como BDHC aumentan rápidamente alcanzando valores significativamente superiores a los del suelo Control.

Ambos ecuaciones fueron probadas y sólo el modelo-IV demostró un buen ajuste, Figura V-42.



**Figura V-42:** Cinética de eliminación de la fracción HTCG en los sistemas API durante la etapa de establecimiento de la población BDHC. Ajuste según el Modelo-IV de Schmidt.

( $S/S_0 = \text{HTCG}/\text{HTCG}_{\text{inicial}}$ ).

El Modelo-IV describe en forma aceptable la cinética de desaparición del sustrato como hidrocarburos totales cromatografiables en todas las concentraciones ( $r^2 = 0,963$  API-1,25%;  $r^2 = 0,955$  API-2,5%;  $r^2 = 0,956$  API-5% y  $r^2 = 0,967$  API-10%).

Este resultado pudo ser validado al comparar la velocidad de eliminación estimada ( $k$ ) por el Modelo-IV con la obtenida en forma directa mediante la aplicación del Modelo-3 de Vecchioli, Tabla V-11.

La cinética de eliminación del sustrato según el Modelo-3 es  $C = a.e^{-kt} + b$ , donde  $a$  es la concentración de sustrato degradable,  $b$  es la concentración de sustrato difícilmente degradable y  $k$  es la constante de eliminación del sustrato.

**Tabla V-11:** Velocidad de eliminación de HTCG estimada a partir del Modelo-IV de Schmidt en comparación con los valores estimados a partir del Modelo-3 de Vecchioli.

<i>Sistemas</i>	<i>k Modelo IV (1/día)</i>	<i>Sd</i>	<i>k Modelo-3 (1/día)</i>	<i>sd</i>
API-1,25%	0,089	± 0,026	0,093	± 0,007
API-2,50%	0,053	± 0,016	0,062	± 0,018
API-5%	0,072	± 0,022	0,080	± 0,010
API-10%	0,059	± 0,015	0,064	± 0,015

De acuerdo con el fundamento matemático del modelo de Schmidt,  $k$  representa la constante de pseudo primer orden de la cinética de eliminación del sustrato por microorganismos que metabolizan el sustrato, pero cuya velocidad de crecimiento está siendo controlada por otro factor del sistema.

La Tabla V-12 muestra los valores de  $\mu$  estimados por el modelo-IV en comparación con los datos estimados directamente a partir del crecimiento de la población BDHC mediante de la ecuación de Gompertz.

Puede apreciarse que, la  $\mu$  estimada por Schmidt es prácticamente nula. Lo que implica que la cinética descrita por el contaminante no tiene un crecimiento asociado.

**Tabla V-12:** Velocidad específica de crecimiento estimada mediante el modelo de Schmidt en comparación con la estimada según Gompertz.

$\mu$ (1/día)	API-1,25%	API-2,5%	API-5%	API-10%
Gompertz	0,095	0,120	0,150	0,140
Schmidt	$5,85 \cdot 10^{-10}$	$5,27 \cdot 10^{-10}$	$5,74 \cdot 10^{-10}$	$4,61 \cdot 10^{-10}$

Sin embargo, es significativo el crecimiento de la población BH y BDHC en la primera etapa del tratamiento. Este comportamiento pone de manifiesto la naturaleza compleja del contaminante. El ajuste al modelo-IV indica que la fracción de HTCG no es limitante del crecimiento de las poblaciones bacterianas.

La rápida cinética de eliminación podría ser inicialmente el efecto de la mineralización de hidrocarburos o reacciones cometabólicas sobre los hidrocarburos complejos. El primer ataque bacteriano a estas sustancias consiste en la oxidación directa de la molécula de hidrocarburo (Cerniglia, 1993), que la transforma así en una molécula "invisible" a la técnica cromatográfica.

Entonces el rápido crecimiento inicial de poblaciones bacterianas determinado en todos los sistemas sería a expensas de hidrocarburos de fácil asimilación, hidrocarburos no determinados por la técnica cromatográfica y otras sustancias diferentes de hidrocarburos aportadas por la mezcla compleja del residuo.

### ***V.3.9 APLICACIÓN DE LOS MODELOS QUE RELACIONAN LA CINÉTICA DE ELIMINACIÓN DE UN SUSTRATO CON EL CRECIMIENTO, EN UN SISTEMA SIMPLE.***

Debido a la naturaleza compleja del residuo que se suma a la complejidad propia de un sistema heterogéneo como el suelo, resulta algo complicado describir ajustadamente la dinámica de la biocenosis durante el proceso de biorremediación.

Con la finalidad de reducir las variables del sistema, es decir los diferentes componentes que pueden interaccionar con las diferentes poblaciones, y corroborar las conclusiones a las que se abordaron en el estudio del sistema complejo, se estudia ahora la aplicabilidad de los modelos en la descripción de la dinámica de la biocenosis durante la biorremediación de tierra contaminada con un sustrato simple.

Como sustrato fue seleccionado un PAH que se encuentra en mayor concentración en el residuo: fenantreno.

A partir de los datos obtenidos de un experimento de biodegradación de fenantreno en tierra bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, se pretende relacionar la cinética de degradación del hidrocarburo con la velocidad de crecimiento de la población comprometida en el proceso.

El fenantreno fue incorporado en tierra a una concentración inicial de 680mg/kg, comparable a la concentración de fenantreno en el sistema API-10%. Periódicamente se determinó la concentración del PAH por cromatografía gaseosa y el crecimiento de las poblaciones BH y bacteriana degradadora de fenantreno (BDF) del sistema.

La Figura V-43 muestra la cinética de eliminación del fenantreno y el ajuste obtenido aplicando los modelos I y IV de Schmidt a los datos experimentales. Se observa que el modelo-IV describe de manera más ajustada la curva de eliminación del sustrato.

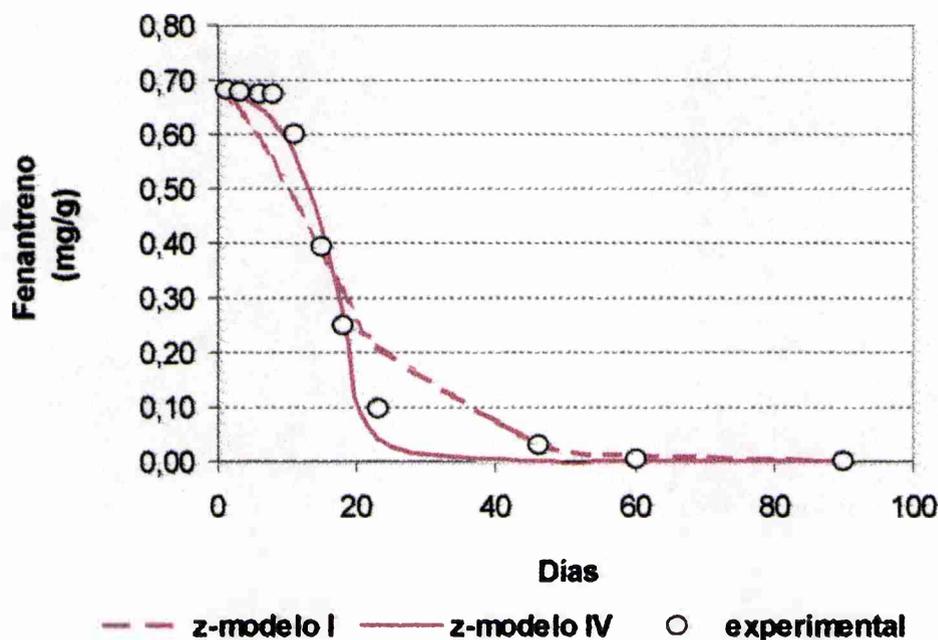


Figura V-43: Cinética de eliminación de Fenantreno en el sistema de tierra. Ajuste según el Modelo I y el Modelo IV de Schmidt.

Del ajuste al modelo-IV se infiere una cinética de eliminación con crecimiento asociado.

La Figura V-44 representa la cinética de crecimiento de la población BH y de la población degradadora de fenantreno (BDF) durante el tratamiento en comparación con el nivel de la población BH del Control.

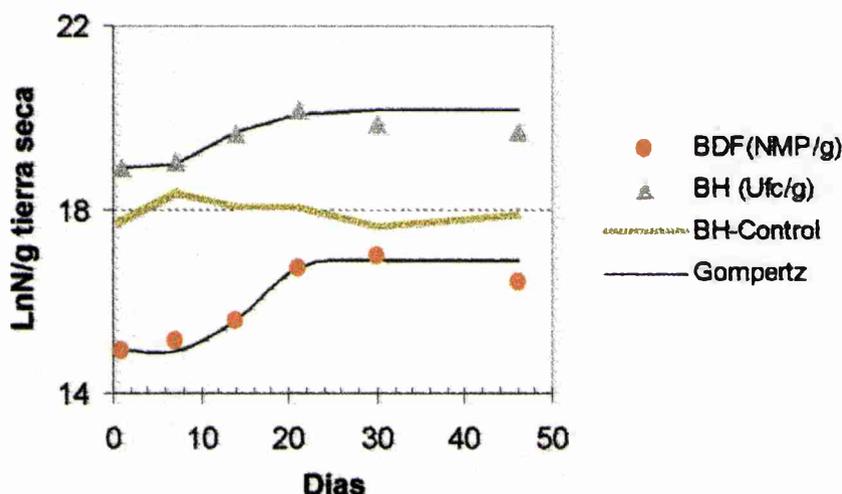
La población BDF del Control estuvo siempre por debajo del límite de detección de la técnica de recuento, 100 NMP/g tierra seca.

Puede apreciarse que la presencia del PAH produce un incremento significativamente mayor, de 5 órdenes logarítmicos en la población BDF frente a 1 orden en la población BH.

Este significativo incremento en un corto tiempo se explicaría por el efecto de inducción que produce el fenantreno sobre las bacterias del suelo (Kovárová –Kovar y Egli, 1998).

Luego de la inducción sigue una fase de latencia que es mayor en la población BDF. A continuación se inicia la etapa de crecimiento exponencial con una velocidad superior en la población BDF, como se muestra en la Tabla V-13.

Ambas poblaciones se estabilizan alrededor de los 25 días.



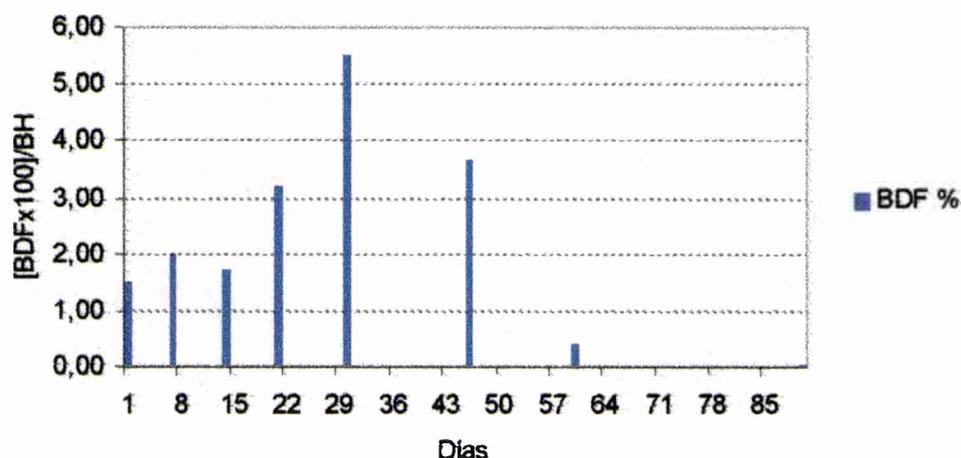
**Figura V-44:** Evolución de la población bacteriana degradadora de fenantreno (BDF) en comparación con la BH en el sistema de tierra. Ajuste mediante el modelo de Gompertz

**Tabla V-13:** Parámetros del crecimiento de las poblaciones BH y BDF estimados según Gompertz.

Poblaciones	$L \pm sd$ (día)	$\mu \pm sd$ (1/día)	$g$ (día)
BFD	11 ( $\pm 1$ )	0,256 ( $\pm 0,076$ )	3
BH	7 ( $\pm 1$ )	0,116 ( $\pm 0,022$ )	6

No obstante la mayor velocidad de crecimiento desarrollada por la población BDF, ésta representa solo un pequeño porcentaje de la población BH durante los 90 días de tratamiento (menor del 10% de BH). Como se observa en la Figura V-45, en el periodo inicial del tratamiento la población BDF representa el 2% de la BH, alcanza el máximo de 6% aproximadamente a los 30 días y finalmente representa menos del 1% al agotarse el fenantreno.

El máximo porcentaje de población BDF coincide con el periodo de eliminación de fenantreno cromatografiable, de lo que se infiere que la población degradadora permanece aún seleccionada, desarrollando a expensas de los productos de transformación del fenantreno.



**Figura V-45:** Evolución de la relación porcentual de la población BDF respecto de la población BH, durante el tratamiento de fenantreno en tierra.

La concentración de fenantreno aplicada al suelo equivale a la concentración en el residuo aplicado al 10%, por lo que podría considerarse que se encuentra en concentración no limitante del crecimiento, condición bajo la cual es aplicable el modelo.

Como fue apreciado anteriormente en la Figura V-43, el modelo IV mostró un mejor ajuste a la evolución de los datos experimentales, Tabla V-14.

De esta manera se describe la cinética de eliminación del fenantreno por una población bacteriana que metaboliza el sustrato no limitante, creciendo a una velocidad  $\mu$ , y cuya dinámica se vería influenciada por otros factores del sistema.

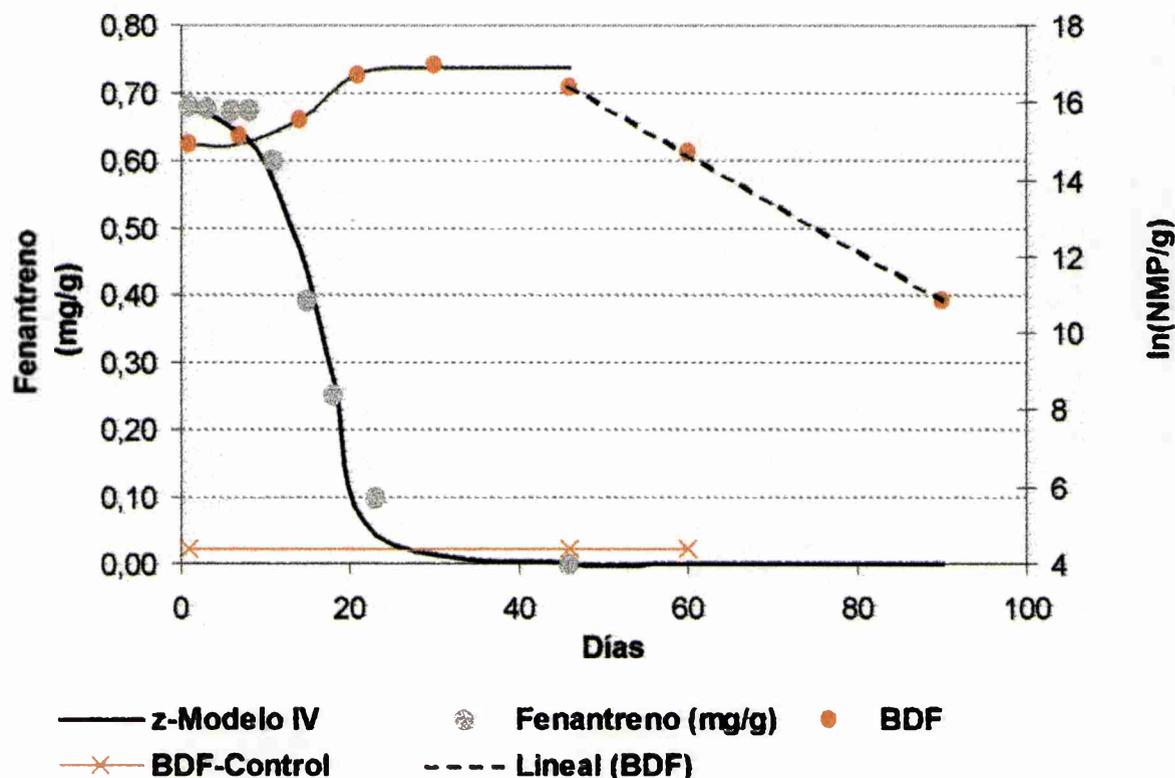
Si se compara la  $\mu$  estimada indirectamente por estos modelos con la estimada directamente a través de la ecuación de Gompertz, puede apreciarse que la  $\mu$  del modelo IV es coincidente a la estimada por Gompertz, Tabla V-14.

**Tabla V-14:** Parámetros estimados de la cinética de eliminación del fenantreno aplicando los modelos de Schmidt, en comparación con el estimado por Gompertz.

Modelos	$k$ (1/día)	(sd)	$\mu$ (1/día)	(sd)	$g$ (día)
Schmidt I	0,0839	( $\pm$ 0,0700)	0,191	( $\pm$ 0,200)	4
Schmidt IV	0,00378	( $\pm$ 0,0015)	0,220	( $\pm$ 0,030)	3
Gompertz (BDF)	-	-	0,256	( $\pm$ 0,076)	3

-: Parámetro no estimado por el modelo

Con la intención de realizar una interpretación integrando las cinéticas de crecimiento y de eliminación, se muestra en la Figura V-45 la evolución de la población BDF durante los 90 días de tratamiento en comparación con la cinética de eliminación según el modelo IV de Schmidt.



**Figura V-45:** Evolución de la población BDF del sistema tierra-fenantreno y del sistema Control, junto con la cinética de eliminación del fenantreno cromatografiable, durante los 90 días que dura el experimento. Ajuste del crecimiento de la población BDF por Gompertz y del decrecimiento por regresión lineal.

En ella se aprecia que la presencia del fenantreno origina una fase de inducción-adaptación de la población BDF. Paralelamente se mantiene constante la concentración de fenantreno en el sistema. Superada esta fase, la población consume el PAH transformándolo en biomasa.

Una vez iniciada la fase de crecimiento exponencial se evidencia el significativo descenso del PAH, hasta ser no detectable alrededor de los 35 días.

El tamaño máximo de población degradadora es alcanzado a los 30 días y se mantiene aún cuando ya no se detecta fenantreno en el sistema. Recién alrededor de los 45 días comienza un lento descenso lineal, debido al consumo de los productos de transformación.

De la aplicación del modelo y su validación a través de la medida directa de la  $\mu$  de la población BDF, puede concluirse que:

- ⊕ La forma sigmoidea de la curva corresponde a una cinética de eliminación de un compuesto con crecimiento asociado. Es decir, que describe la eliminación del fenantreno por una población donde el factor limitante del crecimiento no es el PAH.
- ⊕ La población degradadora de fenantreno monitoreada es la población representativa de la comunidad microbiana total del sistema responsable de la degradación del PAH.
- ⊕ El grado de correspondencia entre la  $\mu$  estimada por el modelo de Schmidt y la determinada directamente a través de la cinética de crecimiento, depende de la complejidad del sistema.

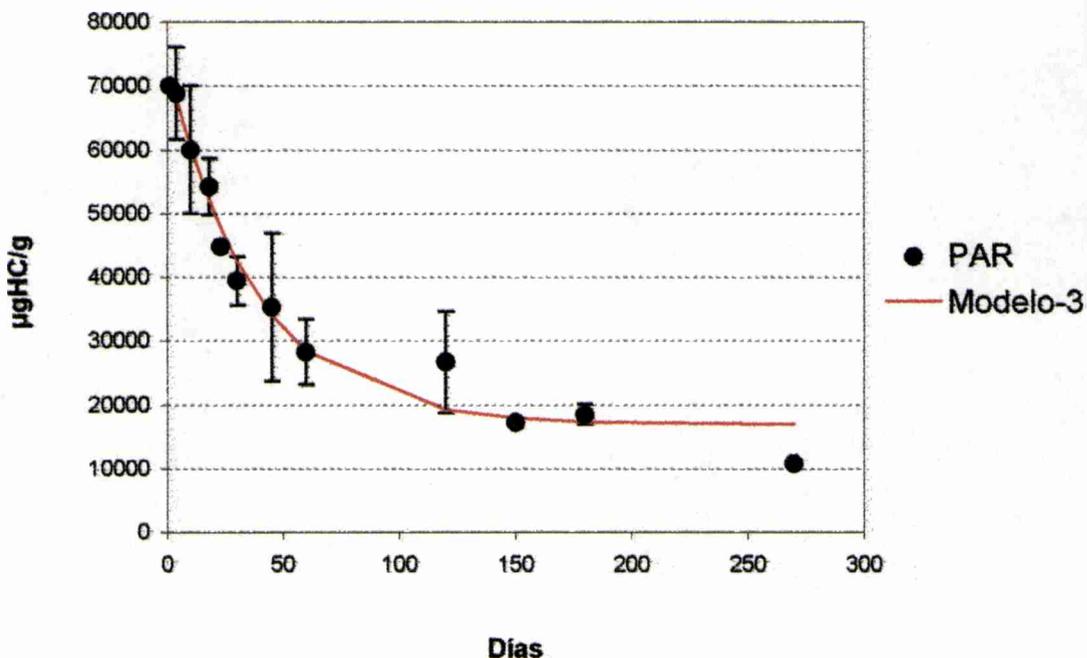
#### ***V.3.10 EVALUACIÓN DE LA POSIBILIDAD DE EXTENSIÓN DEL MARCO DE VALIDEZ DE LOS MODELOS EN SISTEMAS COMPLEJOS.***

Con la intención de evaluar la aplicabilidad del modelo a sistemas complejos se analizan los resultados obtenidos en un experimento de biorremediación en tierra de un residuo de naturaleza francamente alifático. Es un barro parafínico de aspecto más homogéneo que el residuo API, constituido por una fase oleosa y espesa, predominantemente alifático. Se lo denomina residuo PAR.

La biodegradación de este residuo fue estudiada en una sola concentración (7%) tal que aporte una significativa fuente de C y energía para las poblaciones degradadoras.

El monitoreo del proceso fue seguido a través de la eliminación del contaminante por espectrometría infrarroja (IR), por la dinámica de la población BH y BDHC y por la actividad enzimática de deshidrogenasa.

La Figura V-46 muestra la cinética de eliminación del residuo PAR a partir de un sistema de tierra contaminada con 7% del residuo PAR y el ajuste aplicando el modelo-3 de Vecchioli.



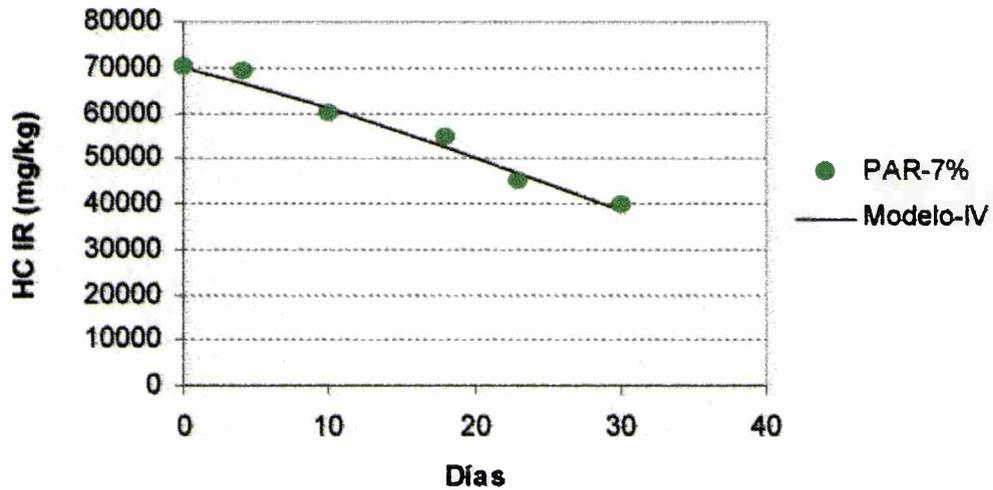
**Figura V-46:** Cinética de eliminación del residuo PAR en un sistema de tierra-PAR al 7%. Ajuste según el modelo-3 de Vecchioli.

Como se observa en la Figura V-46, el modelo-3 describe aceptablemente la cinética de eliminación del residuo durante el año de tratamiento. El cálculo de los parámetros estima que la velocidad de eliminación  $k$  es de  $0,0266 \pm 0,0039$  1/día dejando un residual de HTCG de 16.800 mg/kg de tierra.

El modelo-IV de Schmidt permitió un buen ajuste, pero luego de una modificación con un factor de corrección de 0,401 que afecta a la  $\mu_{max}$ .

Según se aprecia en la Figura V-47, permite describir aceptablemente la eliminación del contaminante por una comunidad microbiana que se desarrolla a partir de un sustrato no limitante, en los primeros 35 días de tratamiento.

$$S = S_0 \exp \left\{ -\left( k_1 / \mu_{max} \right) \left( e^{0,401 \cdot \mu_{max} \cdot t} - 1 \right) \right\} \quad \text{Modelo-IV (modificado)}$$



**Figura V-47:** Cinética de eliminación del residuo PAR en un sistema de tierra-PAR al 7%. Ajuste según el modelo IV-modificado, de Schmidt.

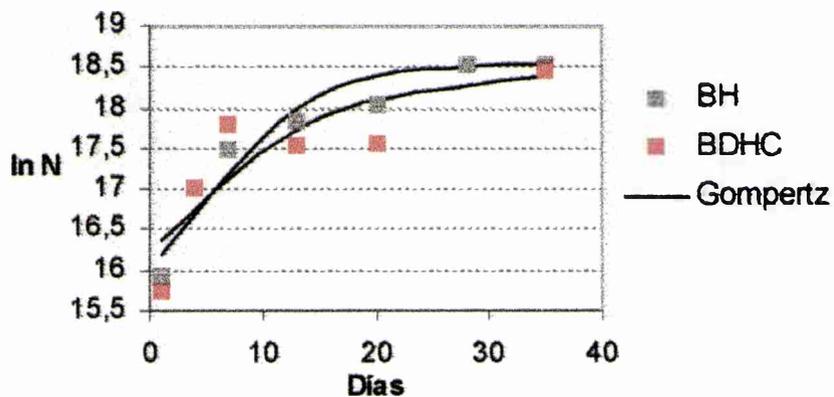
El valor estimado de  $\mu$  por el modelo-IV modificado es de  $0,084 \pm 0,035$  1/día.

Para validar de una forma independiente el valor estimado de  $\mu$ , se calculan las velocidades específicas de crecimiento para la población BH y BDHC del sistema tierra-PAR.

La Figura V-48 muestra la evolución de las poblaciones BH y BDHC en respuesta a la contaminación con el residuo PAR. Ambas poblaciones parecen seguir un comportamiento semejante. La población BDHC muestra una mayor dispersión en los puntos experimentales, por lo cual el valor estimado de  $\mu$  tiene una gran variación, no obstante el valor medio es aproximadamente igual al de la población BH.

$$\mu_{BH} = 0,134 \pm 0,015 \text{ 1/día}$$

$$\mu_{BDHC} = 0,130 \pm 0,071 \text{ 1/día}$$



**Figura V-48 :** Cinética de crecimiento de las poblaciones BH y BDHC y el ajuste según la ecuación de Gompertz.

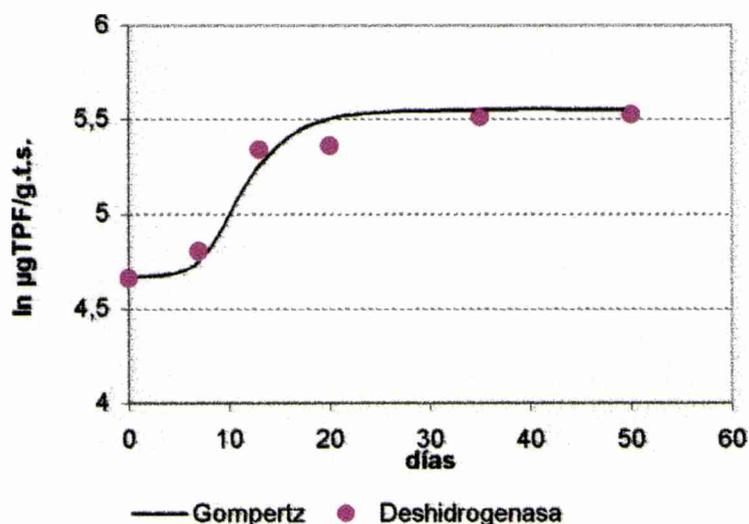
La Tabla V-15 muestra los parámetros calculados por el modelo-IV modificado y los valores de  $k$  y  $\mu$  estimados mediante el modelo-3 y la ecuación de Gompertz, respectivamente.

De esta manera, los parámetros estimados por el modelo de Schmidt son comprobados de forma independiente. Se observa que los valores de  $k$  son coincidentes y que el valor de  $\mu$  estimado indirectamente es algo menor que el de Gompertz.

**Tabla V-15:** Constante de eliminación del sustrato  $k$  y velocidad específica de crecimiento  $\mu$  estimadas por los modelos de Schmidt, Vecchioli y Gompertz.

	$k \pm sd$ (1/día)	$\mu \pm sd$ (1/día)
Modelo-3 (Vecchioli)	$0,0266 \pm 0,0039$	-
Modelo IV-modificado (Schmidt)	$0,0287 \pm 0,0058$	$0,084 \pm 0,035$
Población BH (Gompertz)	-	$0,134 \pm 0,015$

Considerando que las poblaciones BH y BDHC, representan la fracción minoritaria cultivable de la comunidad microbiana del suelo, se estima la  $\mu$  de la comunidad a partir del ajuste de la actividad deshidrogenasa del sistema mediante Gompertz, durante los 30 días de tratamiento (Figura V-49).



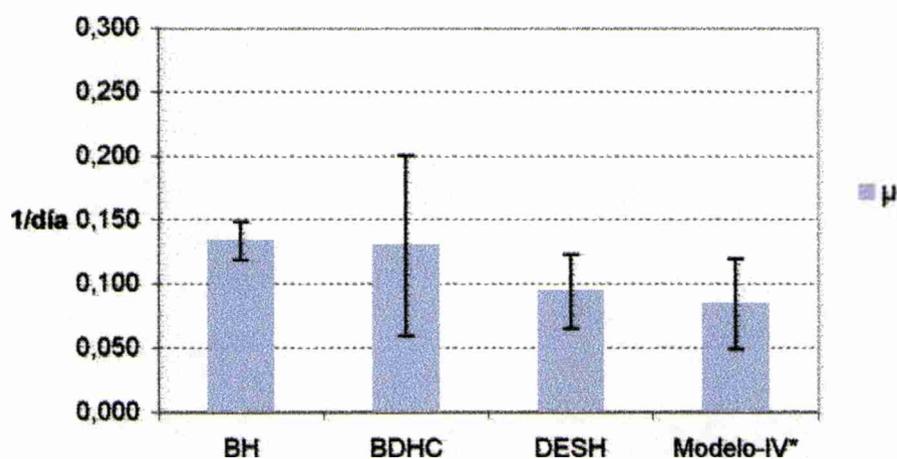
**Figura V-49:** Evolución de la actividad deshidrogenasa de la comunidad microbiana en el sistema tierra-PAR durante los primeros días de tratamiento. Ajuste por la ecuación de Gompertz.

La Figura V-50 muestra en forma comparativa los valores de  $\mu$  obtenidos directamente a partir de los monitoreos de las poblaciones cultivables, de la comunidad completa y el estimado indirectamente por el modelo-IV modificado.

Según se aprecia no hay diferencias significativas entre los parámetros estimados.

Por lo que se infiere que :

- \* El modelo-IV modificado describe la cinética de eliminación de una mezcla compleja de hidrocarburos en suelo por una comunidad microbiana activamente degradadora.
- \* Las poblaciones degradadoras cultivables son poblaciones relevantes dentro de la comunidad del sistema.



**Figura V-50:** Comparación de las  $\mu$  estimadas según Gompertz, de los distintos monitoreos realizados durante el tratamiento del residuo Par en tierra, con la  $\mu$  estimada indirectamente por el modelo-IV modificado.

Los valores de  $\mu$  obtenidos directamente de las cinéticas de crecimiento tienden a sobrestimar el parámetro si se compara con el estimado indirectamente de los modelos que relacionan la eliminación del sustrato con el crecimiento. Esto es debido a que no tienen en cuenta los efectos que otros factores (bióticos o abióticos) del sistema puedan ejercer sobre la comunidad *in situ*.

Los resultados obtenidos al trabajar con el sistema tierra-PAR han permitido adaptar el rango de aplicación de estos modelos, originalmente diseñados para describir el comportamiento en sistemas duales (dos sustratos), a sistemas naturales donde fuerzas más complejas regulan el comportamiento de las poblaciones dentro de la comunidad y con su ambiente.

Estos modelos que relacionan la cinética de eliminación de un sustrato con el crecimiento de la comunidad permitieron estimar la velocidad de crecimiento en dos habitats muy diferentes. Un habitat complejo representado por el sistema tierra-residuo petroquímico en comparación con un habitat relativamente más sencillo representado por el sistema tierra-fenantreno. Una propiedad interesante que presentan los modelos de eliminación de sustrato relacionados con la actividad microbiana es que evitan la limitación que origina el cultivo de las muestras en el recuento de los microorganismos. De esta manera se asume que la velocidad de crecimiento estimada mediante estos modelos describe la dinámica resultante de la biocenosis total del sistema.

Durante el desarrollo del Capítulo V, fue analizada una variedad de modelos con la intención de describir desde diferentes puntos de vista el crecimiento de las poblaciones microbianas del suelo ante la presencia de un contaminante orgánico.

Es importante remarcar que ningún modelo puede explicar completamente la complejidad de los sistemas biológicos, ni aún la de los más simples. El valor real que presentan es la posibilidad de formalizar ideas dentro de un manejable conjunto de hipótesis matemáticas que puedan ser validadas (Schmidt y Lipson, 2001).

Conociendo esta limitación fueron seleccionados aquellos modelos cuyos parámetros pudieran ser biológicamente interpretados. Así mismo, los modelos fueron validados utilizando datos generados de los mismos sistemas en estudio.

## **CAPÍTULO VI**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Cambio en la estructura de las comunidades  
microbianas durante el proceso de Biorremediación.**

## VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN: CAMBIO EN LA ESTRUCTURA DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN.

### VI.1 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL RESIDUO API SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN.

Para realizar el estudio de los cambios en la estructura de la comunidad microbiana del suelo en respuesta a la contaminación con el residuo API y durante el proceso de biorremediación, se procede aplicando una metodología combinada entre la técnica clásica de aislamiento de cultivos y los métodos moleculares, Figura VI-1.



**Figura VI-1:** Esquema de la metodología aplicada al estudio de la estructura de comunidades de suelo.

La estrategia clásica cultivo-dependiente aplica el enfoque de la autoecología, infiriendo a partir del conjunto de aislamientos caracterizados o identificados, las características o propiedades de la comunidad.

Obviamente, de sus resultados puede obtenerse una información parcial del sistema dependiendo de la relevancia de las poblaciones cultivables seleccionadas como representativas de la comunidad.

Con la intención de lograr un análisis más integral de la diversidad microbiana, evitando la limitación de las técnicas de cultivo-dependiente, se realiza el estudio de la comunidad aplicando dos técnicas. Una basada en el análisis del DNA extraído directamente de las muestras de suelo y otra basada en la detección de las células bacterianas intactas en la matriz de suelo.

### **VI.1.1 ESTRATEGIA BASADA EN EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PREDOMINANTES.**

Cuando se trabaja con muestras ambientales conteniendo distintas poblaciones microbianas, frecuentemente se intenta medir las similitudes entre las diferentes poblaciones y/o estudiar los cambios dentro de la población debido a diversos factores ambientales. Esto se realiza habitualmente mediante la cuantificación de los distintos grupos bacterianos y medida de los cambios en el número de bacterias dentro de los diferentes grupos.

En la evaluación estadística de estos resultados el análisis multivariante de los componentes principales (PCA) puede ser utilizado para describir relaciones entre factores ambientales y las diferentes poblaciones ó los distintos grupos de microorganismos (Sparks y col., 1997).

Como ha sido determinado en secciones anteriores, la incorporación del residuo al suelo, en todas las concentraciones estudiadas, produce una significativa respuesta positiva en la población bacteriana heterótrofa (BH) y en la población degradadora de hidrocarburos (BDHC) respecto del suelo limpio.

La relación porcentual de población BDHC/BH alcanza el máximo a los 21 días de tratamiento, siendo significativamente mayor en los sistemas API-2,5%, API-5% y API,10%.

Este comportamiento corresponde a la etapa de mayor velocidad de degradación de HTCG y estaría indicando el establecimiento de una población activamente degradadora.

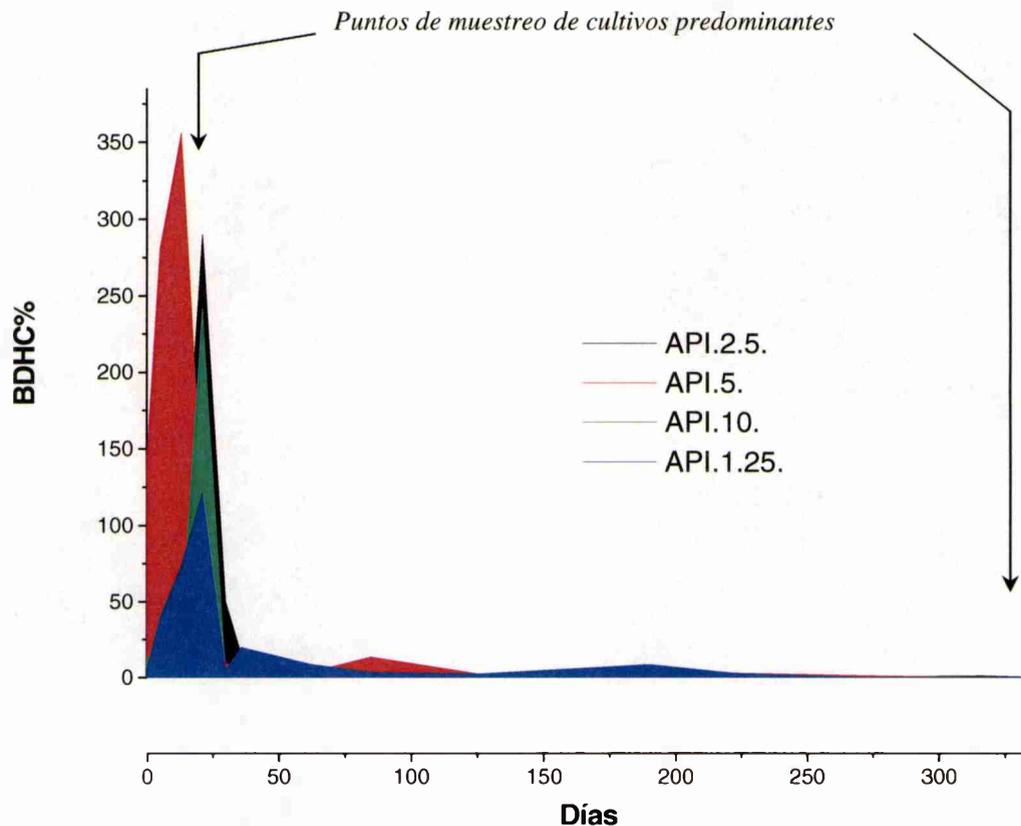
Prolongando el tratamiento hasta el año se observa que ambos niveles de población se han estabilizado correspondiendo a un nivel residual constante de HTCG.

El tamaño de la población BDHC permanece relativamente aumentado en los sistemas API-2,5% API-5% y API-10% al comparar con la población degradadora del Control.

El tamaño de la población BH no difiere significativamente del Control en el sistema API-2,5%, mientras que es significativamente superior en los sistemas API-5% y API-10%.

El período donde se detecta el establecimiento de la población degradadora activa y aquel donde se han alcanzado niveles de hidrocarburos significativamente bajos, son seleccionados para el estudio de la composición taxonómica de las comunidades mediante la identificación de los cultivos dominantes de los sistemas contaminados y del suelo limpio.

El estudio se realiza sobre los sistemas donde la respuesta de población BDHC se encuentra significativamente aumentada (superior al 200%): API-2,5%; API-5% y API-10%, Figura VI-2.



**Figura VI-2:** Relación porcentual de la población BDHC respecto de la población BH, durante el proceso de biorremediación. Las flechas indican los puntos de muestreo seleccionados para la identificación de los cultivos predominantes: 21 días y 360 días.

#### **VI.1.1.a Identificación de los cultivos predominantes de los sistemas de suelo contaminado y suelo Control durante el establecimiento de la población degradadora activa.**

A los 21 días de incubación de los sistemas se realiza el aislamiento de las colonias obtenidas en superficie de R2-agar (Población BH) y de los tubos con desarrollo, según la técnica del NMP (Población BDHC). En ambos casos se utilizan las mayores diluciones, de esta manera los cultivos obtenidos son considerados mayoritarios y representativos del sistema.

##### **VI.1.1.a.1 Cultivos predominantes del sistema Control a los 21 días.**

Son aislados un total de 81 cultivos primarios. Luego de los sucesivos aislamientos en R3-agar hasta obtener el cultivo puro son recuperados 78 cultivos.

La Tabla VI-1 muestra una primera descripción de los cultivos del suelo limpio.

Considerando que en este período del tratamiento toda la población BH es degradadora de hidrocarburos, se expresa la relación porcentual de cultivos Gram-positivos a Gram-negativos del total de la población bacteriana cultivable, siendo 57% a 43%.

**Tabla VI-1:** Descripción macro-microscópica de los cultivos representativos de las poblaciones BH y BDHC del suelo Control.

<i>Población</i>	<i>Macroscópico</i>	<i>Microscópico</i>	<i>Gram</i>	<i>Mov,</i>	<i>OF-glu</i>
BH	Mucoide, blanca	Bacilos medianos, de a pares	+	+	
BH	Desarrollo pulverulento	Streptomyces	+	nd	nd
BH	Desarrollo pulverulento	Streptomyces	+	nd	nd
BH	Creмосa rosada	Bacilos gruesos, pares y cadena	+	-	
BH	Creмосa blanquecina	Cocos agrupados en masas	+	-	O
BH	Micelio aéreo	Streptomyces	+	nd	nd
BH	Creмосa naranja	Bacilos pleomórficos	+	-	
BH	Micelio aéreo	Streptomyces	+	nd	nd
BH	Mucoide blanquecina	Cocos agrupados en masas	+	-	O
BH	Desarrollo pulverulento	Streptomyces	+	nd	nd
BH	Transp, blanquecina	Bacilos pequeños pleomórficos	+	-	
BH	Creмосa naranja	Bacilos pleomórficos	+	-	
BH	Transp, blanquecina	Cocos agrupados en masas	+	-	O
BH	Creмосa blanquecina	Bacilos medianos, de a pares	+	-	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos pequeños, aislados	+	+	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos pequeños, aislados	+	-	
BH	Creмосa amarillenta	Cocos en masas	+	-	
BH	Creмосa blanquecina	Bacilos pequeños, de a pares	+	-	
BH	Transp. blanquecina	Bacilos medianos, aislados	+	+	
BH	Creмосa blanquecina	Bacilos esporulados, en cadenas	+	+	O
BH	Creмосa blanquecina	Bacilos medianos, aislados	+	+	
BH	Creмосa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	
BH	Creмосa amarillenta	Cocos pequeños	+	-	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos pequeños, de a pares	+	+	
BH	Creмосa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	
BH	Transp. blanquecina	Bacilos pequeños, de a pares	+	-	
BH	Transp. blanquecina	Bacilos pequeños aislados	+	-	
BH	Transp. blanquecina	Bacilos pleomórficos	+	-	
BH	Creмосa amarilla	Bacilos finos, pleomórficos	+	-	O <sub>lento</sub>
BH	Creмосa amarilla	Bacilos pleomórficos, de a pares	+	-	
BH	Cerosa grisácea	Bacilos esporulados en cadenas	+	+	
BH	Cerosa grisácea	Bacilos esporulados en cadenas	+	+	
BH	Creмосa blanquecina	Bacilos pequeños aislados	+	-	
BH	Creмосa amarilla	Pequeños bacilos aislados	+	-	
BH	Cerosa, grisácea	Bacilos esporulados en cadenas	+	+	
BH	Creмосa amarilla	Bacilos pequeños y filamentosos	-	-	
BH	Creмосa amarilla	Bacilos finos en cadenas	-	-	
BH	Transp, blanquecina	Bacilos finos, largas cadenas	-	-	
BH	Creмосa verdosa	Bacilos medianos, pares y aislados	-	+	O
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos medianos, pares y aislados	-	+	O
BH	Transp. blanquecina	Bacilos medianos, de a pares	-	+	
BH	Transp. blanquecina	Bacilos medianos, aislados	-	+	

BH	Transp. amarilla	Bacilos pequeños aislados	-	+	O
BH	Creмосa amarilla	Bacilos pequeños aislados	-	+	O
BH	Transp. grisácea	Bacilos medianos, aislados	-	+	F
BH	Transp. amarilla	Bacilos pequeños aislados	-	+	O
BH	Transp. amarilla	Bacilos pequeños aislados	-	+	O
BH	Creмосa blanquecina	Bacilos pequeños aislados	-	-	I
BH	Creмосa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	-	+	I
BH	Creмосa amarillenta	Bacilos pequeños aislados	-	+	I
BH	Creмосa blanquecina	Bacilos medianos, aislados	-	+	I
BH	Transp. grisácea	Bacilos medianos, de a pares	-	+	O
BH	Creмосa blanquecina	Bacilos medianos, aislados	-	+	I
BH	Creмосa blanquecina	Bacilos medianos, aislados	-	+	I
BH	Creмосa blanquecina	Bacilos medianos, aislados	-	+	I
BH	Transp. grisácea	Bacilos finos, aislados	-	+	O
BH	Creмосa blanquecina	Bacilos medianos, aislados	-	+	I
BH	Creмосa amarilla	Bacilos finos, aislados	-	+	I
BH	Transp, blanquecina	Bacilos medianos, de a pares	-	+	O <sub>lento</sub>
BH	Creмосa amarilla	Bacilos finos, aislados	-	+	I
BH	Creмосa amarilla	Bacilos finos, en cadenas cortas	-	-	I
BH	Creмосa ,amarilla	Bacilos finos, largas cadenas	-	-	I
BDHC	Transp. grisácea	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BDHC	Transp. verdosa	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BDHC	Transp. grisácea	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BDHC	Transp. grisácea	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BDHC	Transp. verdosa	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BDHC	Transp. grisácea	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BDHC	Transp. grisácea	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BDHC	Transp. grisácea	Bacilos de a pares y aislados	-	+	I
BDHC	Transp. grisácea	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BDHC	Transp. verdosa	Bacilos de a pares y aislados	-	+	I
BDHC	Transp. verdosa	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BDHC	Creмосa blanquecina	Bacilos finos, cadenas ramificadas	+	-	I
BDHC	Puntiforme blanquecina	Bacilos finos, largas cadenas	+	-	I
BDHC	Creмосa grisácea	Bacilos finos, aislados	+	-	I
BDHC	Creмосa blanquecina	Bacilos finos, aislados	+	-	I
BDHC	Creмосa blanquecina	Bacilos finos, aislados	+	-	I

Referencias: nd, no determinado; Transp., transparente; Mov., movilidad.

Los cultivos Gram-negativos son analizados mediante el sistema de identificación API-20ne. Posteriormente son identificados mediante la comparación con los datos de las cepas de referencia del sistema comercial. La **Figura VI-3** (ver hoja plegada) muestra el dendrograma obtenido del análisis comparativo de los cultivos representativos de la población BH y la población BDHC con las cepas de referencia. Para la identificación al nivel de género se considera un porcentaje de semejanza entre los cultivos y las cepas de referencia igual o mayor al 65%.

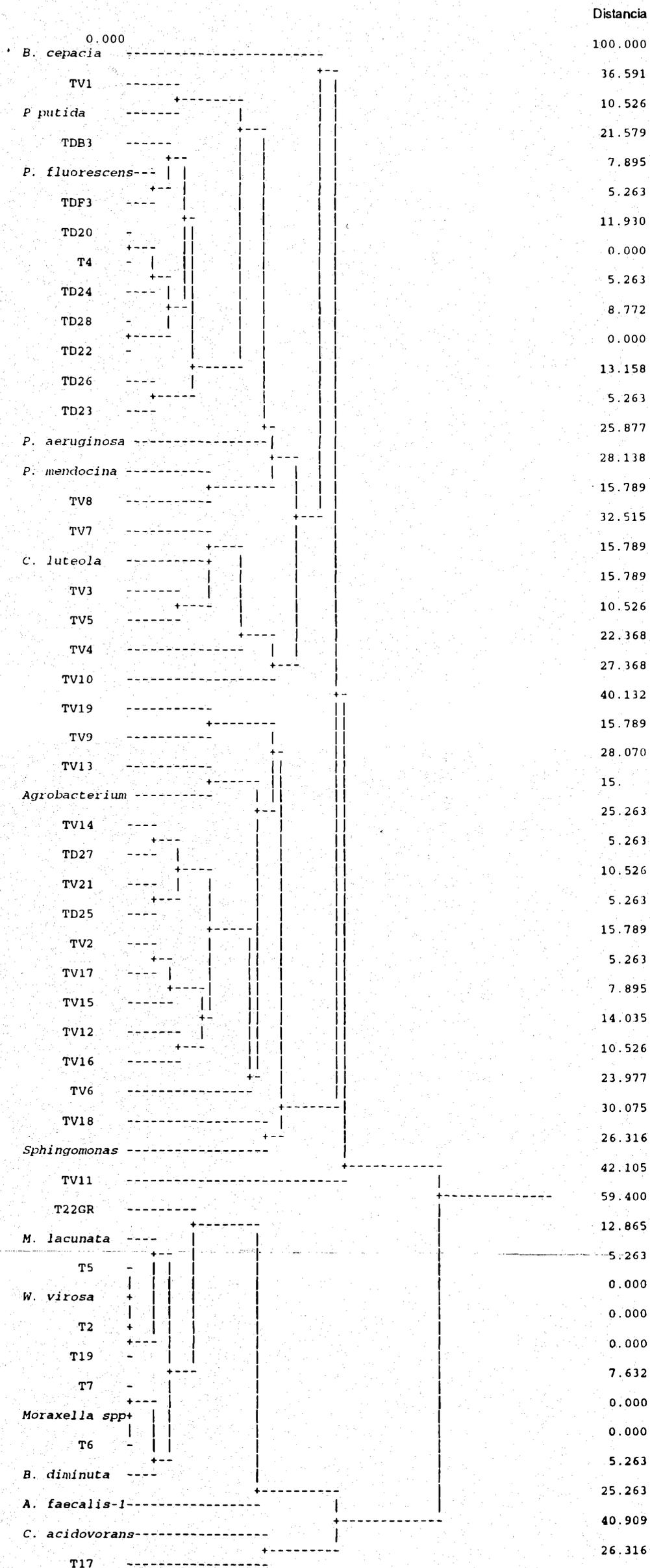


Figura VI-3 : Dendrograma derivado del agrupamiento por ligamiento promedio no ponderado de los coeficientes de similitud ( $S_m$ ) obtenidos mediante la comparación entre los 38 cultivos no fermentadores representativos de la Población BH y BDHC aislados del suelo Control (21 días) y las cepas de referencia. Distancia en porcentaje de disimilitud.

La Tabla VI-2 presenta los resultados de la identificación presuntiva al nivel de género de los cultivos representativos de la población BH y su abundancia relativa. Los cultivos Gram-negativos representativos de la población BDHC corresponden a los géneros *Pseudomonas* (8) y *Agrobacterium* (3).

Los cultivos Gram-positivos se analizan teniendo en cuenta al aspecto macroscópico de las colonias, la morfología bacteriana, la reacción ante la coloración de Gram, movilidad y el tipo de metabolismo según la reacción en el medio de Hugh y Leifson suplementado con glucosa al 1%. Su clasificación se realiza tomando en cuenta el aspecto macroscópico de las colonias y la morfología de las células, ordenándolos en 6 grupos: cocos, bacilos regulares, bacilos regulares formadores de esporas, bacilos regulares filamentosos, bacilos pleomórficos y *Streptomyces*.

**Tabla VI-2:** Abundancia relativa de géneros y grupos bacterianos de la población BH representativos del suelo Control en el día 21 de tratamiento.

Grupo Gram-negativo		Grupo Gram-positivo	
Géneros	Abundancia (%)	Grupos	Abundancia (%)
<i>Agrobacterium</i>	15	Bacilos regulares	21
<i>Chryseomonas</i>	8	Bacilos pleomorfos	10,4
<i>Pseudomonas</i>	7	Bacilos esporulados	6
<i>Weeksella</i>	4,5	Bacilos filamentosos	3,2
<i>Moraxella</i>	3	Cocos	8,2
<i>Brevundimonas</i>	2	<i>Streptomyces</i>	8,2
<i>Sphingomonas</i>	2		
<i>Comamonas</i>	1,5		

#### **VI.1.1.a.2 Cultivos predominantes del sistema API-2,5% a los 21 días.**

A partir de 75 cultivos primarios aislados, son recuperados luego de los sucesivos aislamientos 70 cultivos pertenecientes a las poblaciones BH y BDHC.

La Tabla VI-3 muestra una primera descripción de los cultivos representativos del sistema API-2,5%.

En la población BH se detecta un 60% de Gram-positivos y un 40% de Gram-negativos, mientras que en la población BDCH todos los cultivos son Gram-negativos.

**Tabla VI-3:** Descripción macro-microscópica de los cultivos representativos de las poblaciones BH y BDHC del sistema API-2,5% a los 21 días de tratamiento.

Población	Macroscópica	Microscópica	Gram	Mov.	OF-glu
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos medianos, de a pares	-	+	O
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	-	-	I
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	-	-	I
BH	Cremosa amarilla	Bacilos pequeños, de a pares	-	+	I

BH	Cremosa blanquecina	Bacilos medianos, de a pares	-	+	I
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	-	+	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos pequeños, aislados	-	+	O
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos pequeños, aislados	-	+	O
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos finos, largos, ramificados	-	-	I
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos finos, pares y aislados	-	-	O
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos medianos, de a pares	-	+	O
BH	Transp. amarillenta	Bacilos medianos, de a pares	-	+	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos medianos, de a pares	-	+	O
BH	Cremosa verdosa	Bacilos medianos, de a pares	-	+	O
BH	Cremosa grisácea	Bacilos medianos, de a pares	-	+	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos medianos, de a pares	-	+	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos medianos, de a pares	-	+	O
BH	Transp. grisácea	Bacilos medianos, de a pares	-	+	O
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	-	+	I
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos medianos, de a pares	-	+	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos medianos, de a pares	-	+	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos medianos, de a pares	-	+	O
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	-	+	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos medianos, de a pares	-	+	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos medianos, de a pares	-	+	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos medianos, de a pares	-	+	I
BH	Cremosa amarilla	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	F
BH	Cremosa blanquecina	Cocos en masas	+	-	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	O
BH	Cremosa blanquecina	Cocos en masas	+	-	I
BH	Cremosa rosada	Bacilos medianos aislados	+	-	I
BH	Cremosa rosa	Bacilos pleomórficos, pequeños	+	-	I
BH	Puntiforme blanquecina	Cocos en diplos	+	-	I
BH	Puntiforme rosa	Bacilos pleomórficos, garrotes	+	-	I
BH	Cremosa amarilla	Cocos en masas	+	-	F
BH	Cremosa blanquecina	Cocos, cadenas cortas	+	-	I
BH	Cremosa rosada	Bacilos medianos aislados	+	-	I
BH	Cremosa blanquecina	Cocos en masas	+	-	I
BH	Cremosa blanquecina	Cocos en masas	+	-	I
BH	Cremosa rosa	Bacilos y cocoides	+	-	I
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos pleomórficos pequeños	+	-	O <sub>lento</sub>
BH	Cremosa naranja	Bacilos cortos aislados	+	-	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos finos y cocoides	+	-	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos cortos aislados	+	-	I
BH	Cremosa naranja	Bacilos medianos aislados	+	-	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos cortos aislados	+	+	I
BH	Cremosa naranja	Bacilos medianos aislados	+	-	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos cortos aislados	+	-	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos cortos aislados	+	-	I
BH	Cremosa naranja	Bacilos medianos aislados	+	-	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos cortos aislados	+	-	I
BH	Cremosa amarilla	Bacilos medianos aislados	+	-	I
BH	Cremosa rosada	Bacilos medianos aislados	+	-	I
BH	Cremosa amarilla	Bacilos pequeños en cadenas	+	-	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos medianos aislados	+	-	I
BH	Puntiforme rosada	Bacilos pleomórficos, garrotes	+	-	I
BH	Cremosa rosa	Bacilos pleomórficos, pequeños	+	-	I
BH	Cremosa naranja	Bacilos pleomórficos, en v	+	-	I
BH	Puntiforme blanquecina	Cocos en diplos	+	-	I

BH	Cremosa blanquecina	Cocos en masas	+	+	
BH	Cremosa rosa	Bacilos y cocoides	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	O
BH	Cremosa amarilla	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	
BH	Cremosa naranja	Bacilos gruesos y cocoides	+	-	
BH	Cremosa naranja	Bacilos gruesos y cocoides	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	+	+	O <sub>lento</sub>
BH	Cremosa rosada	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	
BDHC	Cremosa blanquecina	Bacilos medianos aislados	-	+	
BDHC	Cremosa amarillenta	Bacilos medianos, de a pares	-	+	
BDHC	Cremosa verdosa	Bacilos medianos, de a pares	-	+	
BDHC	Transp. amarillenta	Bacilos medianos, de a pares	-	+	
BDHC	Cremosa blanquecina	Bacilos medianos, de a pares	-	+	
BDHC	Cremosa amarillenta	Bacilos medianos, de a pares	-	+	
BDHC	Transp. amarillenta	Bacilos medianos, de a pares	-	+	
BDHC	Cremosa blanquecina	Bacilos medianos, de a pares	-	+	
BDHC	Cremosa amarillenta	Bacilo pequeño aislado	-	+	
BDHC	Cremosa blanquecina	Bacilo pequeño aislado	-	+	

Referencias: nd, no determinado; Transp., transparente; Mov., movilidad.

Siguiendo el mismo procedimiento descrito para el sistema de suelo, en la **Figura VI-4** (ver hoja plegada) se muestra el dendrograma que describe la relación entre los cultivos predominantes del sistema API-2,5% y las cepas de referencia.

A continuación la Tabla VI-4 presenta la abundancia relativa de los géneros de los cultivos aislados como población BH del sistema contaminado a los 21 días del tratamiento.

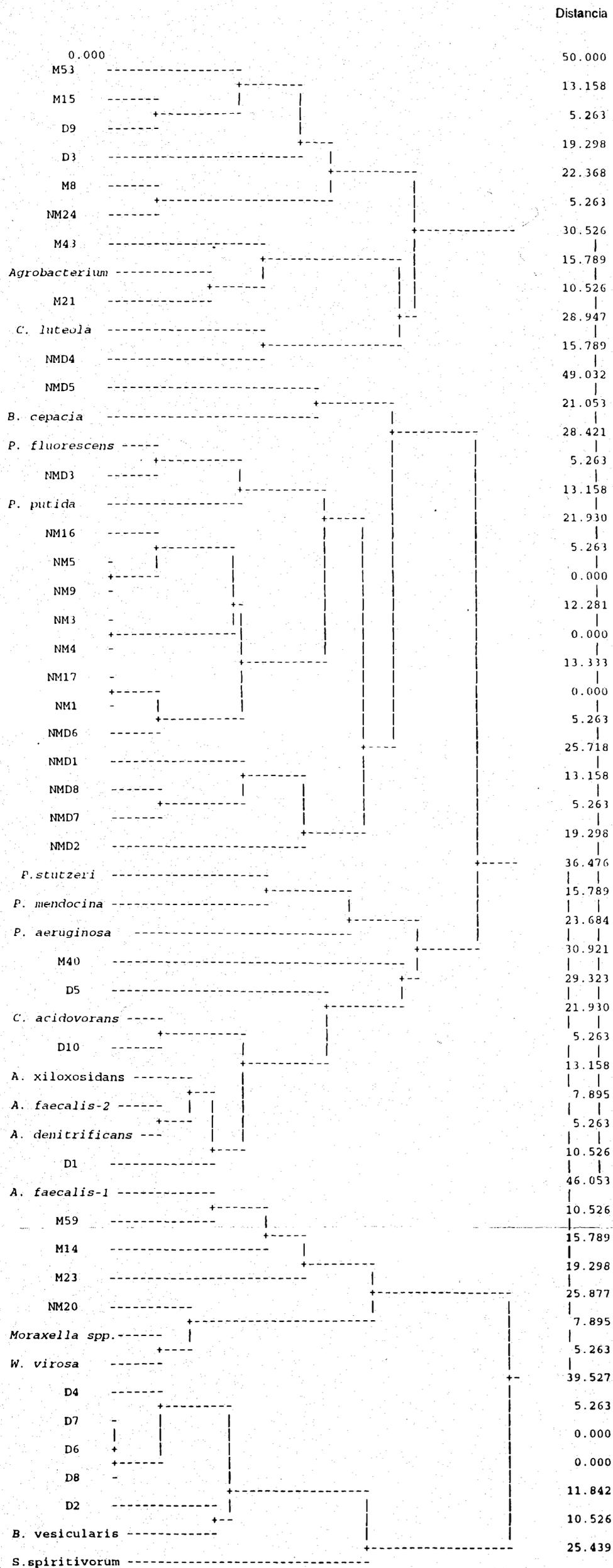
La población BDHC queda representada por 10 cultivos Gram-negativos identificados como *Pseudomonas* (6), *Brevundimonas* (2), *Burkholderia* (1) y *Chryseomonas* (1).

**Tabla VI-4:** Abundancia relativa de géneros y grupos bacterianos representativos de la población BH del sistema API-2,5% en el día 21 del tratamiento.

Grupo Gram-negativo		Grupo Gram-positivo	
Géneros	Abundancia (%)	Grupos	Abundancia (%)
<i>Pseudomonas</i>	10,5	Bacilos regulares	22
<i>Chryseomonas</i>	9	Bacilos pleomorfos	10
Alcalígenes	7,5	Bacilos esporulados	-
<i>Brevundimonas</i>	4,5	Bacilos filamentosos	16
<i>Comamonas</i>	3	Cocos	13
<i>Agrobacterium</i>	3	<i>Streptomyces</i>	-
<i>Moraxella</i>	1,5		

### VI.1.1.a.3 Cultivos predominantes del sistema API-5% a los 21 días.

A partir de 71 cultivos primarios aislados, son recuperados luego de los sucesivos aislamientos 68 cultivos pertenecientes a las poblaciones BH y BDHC.



**Figura VI-4 :** Dendrograma derivado del agrupamiento por ligamiento promedio no ponderado de los coeficientes de similitud ( $S_{ij}$ ) obtenidos mediante la comparación entre los 36 cultivos no fermentadores representativos de la Población BH y BDHC aislados del sistema API-2,5% (21 días) y las cepas de referencia. Distancia en porcentaje de disimilitud.

La Tabla V-5 muestra una primera descripción de los cultivos representativos del sistema API-5%. En la población BH se detectan un 53% de Gram-positivos y un 47% de Gram-negativos, mientras que en la población BDHC todos los cultivos son Gram-negativos.

**Tabla VI-5:** Descripción macro-microscópica de los cultivos representativos de las poblaciones BH y BDHC del sistema API-5% a los 21 días de tratamiento.

<i>Población</i>	<i>Macroscópica</i>	<i>Microscópica</i>	<i>Gram</i>	<i>Mov.</i>	<i>OF-glu</i>
BH	Cremosa, rosada	Cocos en cadenas	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos cortos, aislados	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos cortos, aislados	+	-	
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos pleomórficos, aislados	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos pequeños aislados	+	-	
BH	Puntiforme amarillenta	Bacilos delgados, aislados	+	-	
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	
BH	Transp. grisácea	Bacilos pequeños aislados	+	+	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos, de a pares	+	-	O
BH	Transp. grisácea	Bacilos pequeños aislados	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	
BH	Puntiforme amarillenta	Bacilos cortos, aislados	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Cocos de a pares	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	O
BH	Mucoide blanquecina	Cocos, pares y tetradas	+	-	
BH	Rugosa blanquecina	Bacilos filamentosos	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos pequeños pleomórficos	+	-	O
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	
BH	Cremosa amarillenta	Cocos en masas	+	-	
BH	Cremosa amarilla	Bacilos cocoides aislados	+	-	
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos cocoides aislados	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos, de a pares	+	-	
BH	Puntiforme amarillenta	Bacilos cortos, aislados	+	-	
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos pequeños pleomórficos	+	-	
BH	Rugosa blanquecina	Bacilos filamentosos	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	
BH	Cremosa rosada	Bacilos pequeños pleomórficos	+	-	
BH	Puntiforme rosada	Bacilos pleomórficos, de a pares	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos filamentosos	+	-	
BH	Cremosa grisácea	Bacilos aislados	-	+	
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos aislados	-	+	
BH	Mucoide naranja	Bacilos cortos, aislados	-	+	O
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos filamentosos y cocoides	-	+	O
BH	Cremosa grisácea	Bacilos cortos, aislados	-	-	O
BH	Transp. grisácea	Bacilos cortos, aislados	-	-	
BH	Cremosa grisácea	Bacilos cortos, aislados	-	+	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	-	-	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos cortos, aislados	-	-	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	-	-	
BH	Transp. amarillenta	Bacilos filamentosos y cocoides	-	-	O
BH	Transp. grisácea	Bacilos cortos, aislados	-	+	O
BH	Transp. blanquecina	Bacilos medianos aislados	-	+	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos de a pares	-	+	O
BH	Membranosa blanq.	Bacilos de a pares	-	+	O <sub>lento</sub>

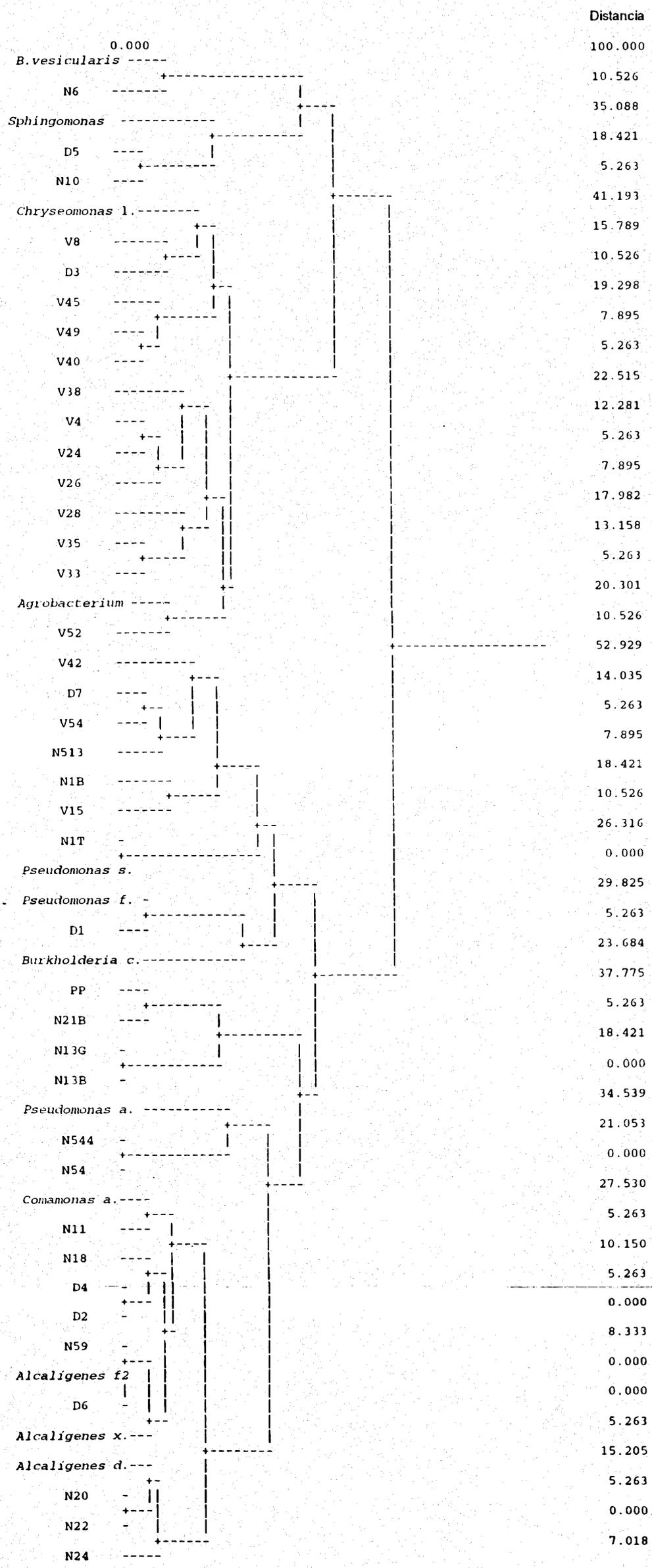


Figura VI-5: Dendrograma derivado del agrupamiento por ligamiento promedio no ponderado de los coeficientes de similitud ( $S_m$ ) obtenidos mediante la comparación de los 48 cultivos no fermentadores representativos de la Población BH y BDHC del API-5% (21 días) y las cepas de referencia. Distancia en porcentaje de disimilitud.

BH	Cremosa amarillenta	Bacilos aislados	-	-	O <sub>lento</sub>
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos aislados	-	-	O
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	-	-	I
BH	Transp. blanquecina	Bacilos aislados	-	+	O
BH	Transp. grisácea	Bacilos aislados	-	+	O
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos pequeños y filamentos	-	-	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos cocoides aislados	-	-	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos pequeños y filamentos	-	-	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos aislados y de a pares	-	-	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos aislados y de a pares	-	-	I
BH	Transp. Grisácea	Bacilos pequeños y filamentos	-	-	I
BH	Transp. Grisácea	Bacilos aislados y filamentos	-	+	I
BDHC	Transp. grisácea	Pequeños bacilos aislados	-	-	I
BDHC	Transp. grisácea	Pequeños bacilos aislados	-	-	I
BDHC	Cremosa blanquecina	Pequeños bacilos aislados	-	-	I
BDHC	Cremosa blanquecina	Bacilos pequeños y filamentos	-	+	O <sub>lento</sub>
BDHC	Transp. grisácea	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BDHC	Cremosa grisácea	Bacilos aislados	-	+	I
BDHC	Transp. Grisácea	Bacilos aislados y filamentos	-	+	I
BDHC	Cremosa grisácea	Bacilos aislados	-	+	O
BDHC	Transp. grisácea	Bacilos pequeños aislados	-	+	O
BDHC	Transp. grisácea	Pequeños bacilos aislados	-	-	I
BDHC	Cremosa grisácea	Bacilos aislados	-	+	I

Referencias: nd, no determinado; Transp., transparente; Mov., movilidad.

Los cultivos Gram-negativos son identificados mediante la comparación con las cepas de referencia del sistema API-20ne como lo muestra el dendrograma de la **Figura VI-5** (ver hoja plegada).

La Tabla VI-6 presenta la abundancia relativa de los cultivos Gram-negativos de la población BH del sistema API-5% a los 21 días de tratamiento.

La población BDHC queda representada por 11 cultivos Gram-negativos identificados como *Pseudomonas* (5), *Comamonas* (2), *Sphingomonas* (1), *Alcaligenes* (2) y *Chryseomonas* (1).

**Tabla VI-6:** Abundancia relativa de géneros y grupos bacterianos representativos de la población BH del sistema API-5% en el día 21 del tratamiento.

Grupos Gram-negativos		Grupos Gram-positivos	
Géneros	Abundancia (%)	Grupo	Abundancia (%)
<i>Chryseomonas</i>	19	Bacilos regulares	21
<i>Pseudomonas</i>	14	Bacilos pleomorfos	9
<i>Alcaligenes</i>	5	Bacilos esporulados	-
<i>Comamonas</i>	3	Bacilos filamentosos	16
<i>Sphingomonas</i>	2	Cocos	7
<i>Brevundimonas</i>	2	<i>Streptomyces</i>	-
<i>Agrobacterium</i>	2		

**VI.1.1.a.4 Cultivos predominantes del sistema API-10% a los 21 días.**

A partir de 60 cultivos primarios aislados, son recuperados luego de los sucesivos aislamientos 51 cultivos pertenecientes a las poblaciones BH y BDHC.

La Tabla VI-7 muestra una primera descripción de los cultivos representativos del sistema API-10%. En la población BH se detecta un 63% de Gram-positivos y un 37% de Gram-negativos, mientras que en la población BDHC todos los cultivos son Gram-negativos.

**Tabla VI-7:** Descripción macro-microscópica de los cultivos representativos de las poblaciones BH y BDHC del sistema API-10% a los 35 días de tratamiento.

<i>Población</i>	<i>Macro</i>	<i>Micro</i>	<i>Gram</i>	<i>Mov.</i>	<i>OF-glu</i>
BH	Cremosa rosada	Cocos en racimos	+	-	
BH	Transp. puntiforme	Bacilos pleomórficos, cadenas	+	-	
BH	Mucoide blanquecina	Cocos en racimos	+	-	
BH	Puntiforme amarilla	Cocos en racimos	+	-	
BH	Mucoide naranja	Bacilos filamentosos y cocoides	+	+	O
BH	Puntiforme amarilla	Cocos en masas	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Pequeños bacilos aislados	+	-	
BH	Cremosa naranja	Bacilos pleomórficos y cocoides	+	-	
BH	Puntiforme amarilla	Cocos en racimos	+	-	
BH	Cremosa naranja	Bacilos de a pares y aislados	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos de a pares y aislados	+	-	
BH	Cremosa rosada	Bacilos cortos y aislados	+	-	
BH	Cremosa rosada	Bacilos pleomórficos	+	-	
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos pequeños, aislados	+	+	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	
BH	Cremosa grisácea	Bacilos pequeños, aislados	-	+	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos de a pares y aislados	-	+	
BH	Transp. grisácea	Bacilos pequeños, aislados	-	+	O
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos filamentosos y cocoides	-	-	
BH	Transp. verdosa	Bacilos medianos aislados	-	+	O
BH	Cremosa grisácea	Bacilos pequeños, aislados	-	+	O
BH	Transp. verdosa	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	-	-	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos pequeños, aislados	-	+	O
BH	Transp. parda	Bacilos finos aislados	-	+	O
BH	Cremosa blanquecina	Pequeños bacilos aislados	-	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos finos aislados	-	+	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos finos aislados	-	+	O
BH	Puntiforme grisácea	Bacilos finos aislados	-	+	
BH	Cremosa naranja	Pequeños bacilos aislados	-	+	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos finos aislados	-	+	O
BH	Mucoide amarillenta	Bacilos en cadenas y aislados	-	+	O
BH	Cremosa blanquecina	Pequeños bacilos aislados	-	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	-	-	
BH	Transp. Blanquecina	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O <sub>lento</sub>
BH	Mucoide amarillenta	Bacilos de a pares y aislados	-	+	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	-	-	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos cortos, largas cadenas	-	-	
BH	Cremosa amarillenta	Pequeños bacilos aislados	-	+	O
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos cortos, largas cadenas	-	-	

BH	Transp. Amarillenta	Bacilos de a pares y aislados	-	+	
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos en cadenas y cocoides	-	-	O
BDHC	Transp. Amarillenta	Bacilos de a pares y aislados	-	+	
BDHC	Transp. Grisácea	Bacilos de a pares y aislados	-	+	
BDHC	Cremosa blanquecina	Bacilos de a pares y aislados	-	+	
BDHC	Cremosa blanquecina	Pequeños bacilos aislados	-	+	
BDHC	Transp. verdosa	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BDHC	Cremosa blanquecina	Pequeños bacilos aislados	-	+	O
BDHC	Cremosa amarillenta	Bacilos pequeños, de a pares	-	-	O
BDHC	Cremosa amarillenta	Pequeños bacilos aislados	-	+	O
BDHC	Cremosa blanquecina	Pequeños bacilos aislados	-	-	
BDHC	Transp. grisácea	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O

Referencias: nd, no determinado; Transp., transparente; Mov., movilidad.

Los cultivos Gram-negativos son identificados mediante la comparación con las cepas de referencia del sistema API-20ne como lo muestra el dendrograma de la **Figura VI-6** (ver hoja plegada). La Tabla VI-8, presenta la abundancia relativa de los géneros Gram-negativos representativos la población BH del sistema API-10% a los 35 días de tratamiento. La población BDHC queda representada por 10 cultivos Gram-negativos identificados como *Pseudomonas* (5), *Burkholderia* (3), *Alcaligenes* (1) y *Stenotrophomonas* (1).

**Tabla VI-8:** Abundancia relativa de géneros y grupos bacteriano representativos de la población BH del sistema API-10% en el día 21 del tratamiento.

Grupo Gram-negativo		Grupo Gram-positivo	
Géneros	Abundancia (%)	Grupos	Abundancia (%)
<i>Pseudomonas</i>	37	Bacilos regulares	12
<i>Alcaligenes</i>	7	Bacilos pleomorfos	7,2
<i>Chryseomonas</i>	5	Bacilos esporulados	-
<i>Sphingomonas</i>	2,5	Bacilos filamentosos	4,8
<i>Moraxella</i>	2,5	Cocos	12
<i>Stenotrophomonas</i> ( <i>Xantomonas</i> )	2,5	<i>Streptomyces</i>	-
<i>Burkholderia</i>	7,5		

La Figura VI-7 muestra en forma comparativa los cambios producidos debido a la aplicación de concentraciones crecientes del residuo sobre las poblaciones bacterianas del suelo, representadas por los géneros dominantes.

En ella se grafica la abundancia de géneros de la población BH y BDHC predominantes en cada sistema contaminado, considerando que en este período toda la población BH es degradadora de hidrocarburos.

Según lo determinado en el suelo Control existe un predominio de géneros Gram-positivos frente a los Gram-negativos (57% / 43%).

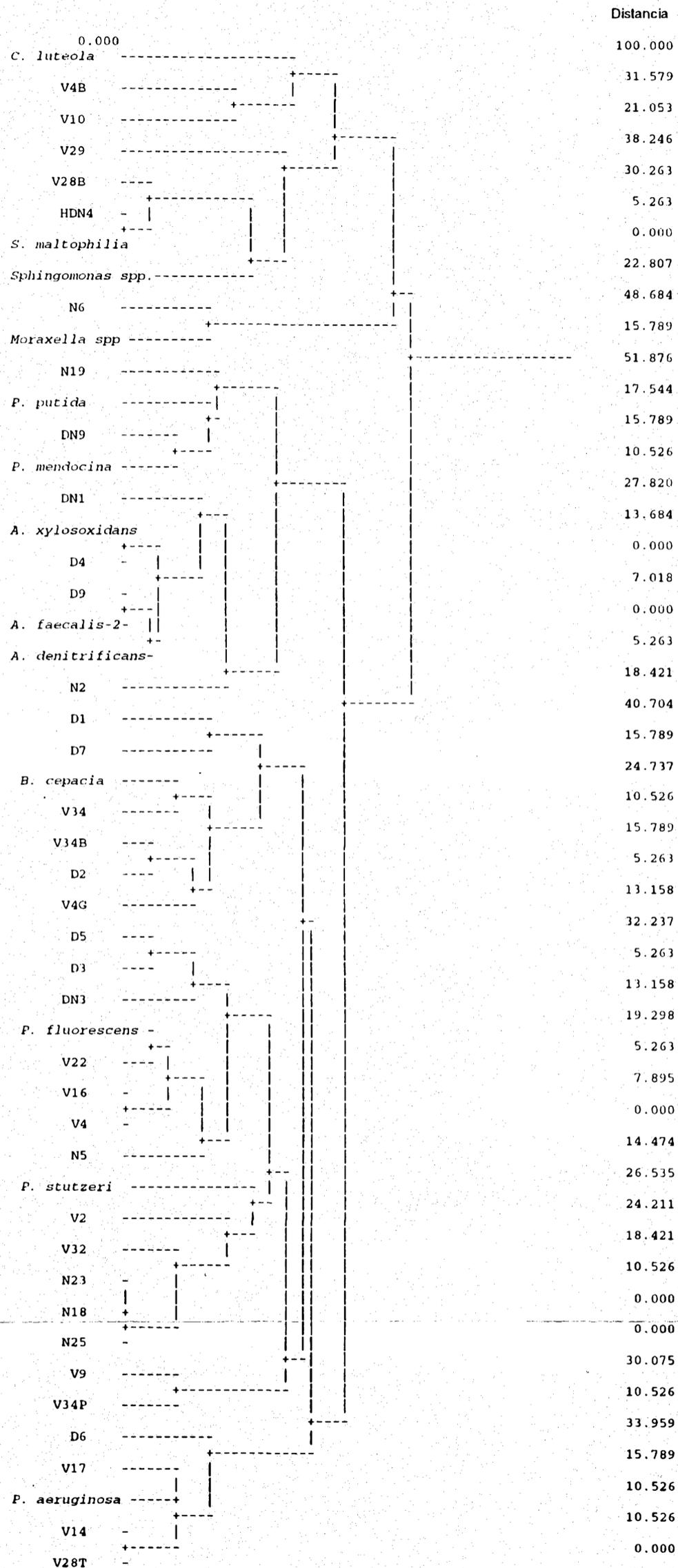


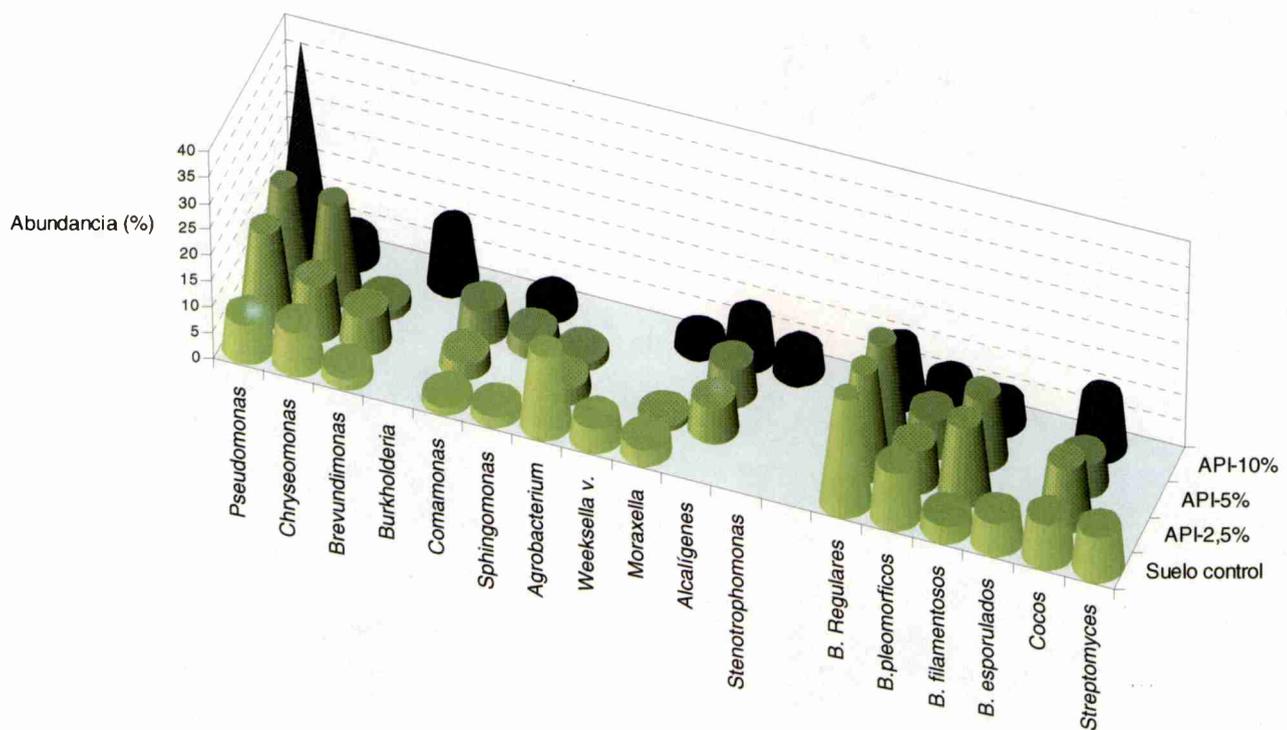
Figura VI-6: Dendrograma derivado del agrupamiento por ligamiento promedio no ponderado de los coeficientes de similitud ( $S_m$ ) obtenidos mediante la comparación de los 36 cultivos no fermentadores representativos de la Población BH y BDHC aislados del sistema API-10% (21 días) y las cepas de referencia. Distancia en porcentaje de disimilitud.

La composición taxonómica de la comunidad Gram-negativa está representada por los géneros *Agrobacterium* (15%), *Chryseomonas* (8%) y *Pseudomonas* (7%). La Gram-positiva es dominada por el grupo de bacilos regulares (21%).

Se aprecia en la Figura VI-7, que el incremento en la concentración de residuo aplicado produce un incremento en el género *Pseudomonas*. También se observa una respuesta semejante del género *Chryseomonas* hasta el 5% de residuo aplicado. Este género se caracteriza por asimilar gran cantidad de sustratos aunque carece de la enzima oxidasa presente en *Pseudomonas*.

La relación Gram-positivo a Gram-negativo en la población BH acusa el aumento en la abundancia de *Pseudomonas*, pero solo el API-10% invierte esta relación respecto del suelo Control. En este sistema se determina la presencia de dos géneros no detectados a concentraciones más bajas del residuo, *Burkholderia* y *Stenotrophomonas*.

En cuanto a los cultivos representativos de la población BDHC recuperados de los tubos del NMP se observa que todos corresponden al grupo de los Gram-negativos con el predominio del género *Pseudomonas*, que es aislado a partir de los tres sistemas.



**Figura VI-7:** Abundancia de géneros predominantes determinados en los sistemas de tierra Control y tierras contaminadas con el residuo API a los 21 días de tratamiento.

**Tabla VI-9:** Abundancia de géneros Gram-positivos vs Gram-negativos representativos de la población BH en los sistemas contaminados y en la tierra a los 21 días del tratamiento.

Abundancia (%)	Control	API-2,5%	API-5%	API-10%
Gram-positivos	57	61	53	36
Gram-negativos	43	39	47	64

#### VI.1.1.b Identificación de los cultivos predominantes de los sistemas de suelo contaminado y suelo control al finalizar el tratamiento

A los 360 días de incubación de los sistemas se realiza el aislamiento de las colonias obtenidas en superficie de R2-agar (Población BH) y de los tubos desarrollados según la técnica del NMP (Población BDHC). En ambos casos se utilizan las mayores diluciones, de esta manera los cultivos obtenidos son considerados mayoritarios y representativos del sistema.

En este período la población BH se encuentra en niveles superiores a la población BDHC, en todas las concentraciones estudiadas.

Los tres sistemas mantienen un nivel de población degradadora superior al sistema Control.

##### VI.1.1.b.1 Cultivos predominantes del sistema Control a los 360 días.

Son aislados un total de 70 cultivos primarios. Luego de los sucesivos aislamientos hasta obtener el cultivo puro son recuperados 61. La Tabla muestra una primera descripción de los cultivos del suelo limpio. La población BH queda representada por un 63% de Gram-positivos y un 37% de Gram-negativos. En la población BDHC se detectan 2 cultivos Gram-positivos y 5 Gram-negativos.

**Tabla VI-9:** Descripción macro-microscópica de los cultivos representativos de las poblaciones BH y BDHC del suelo Control a los 360 días de tratamiento.

Población	Macro	Micro	Gram	Mov.	OF-glu
BH	Creмоса blanquecina	Bacilos en cadenas	+	+	I
BH	Desarrollo pulverulento	Streptomyces	+	nd	Nd
BH	Creмоса blanquecina	Bacilos en cadenas y esporos	+	+	I
BH	Creмоса blanquecina	Bacilos en cadenas y esporos	+	+	I
BH	Creмоса blanquecina	Bacilos cortos aislados	+	+	I
BH	Transp. amarilla	Bacilos finos, cadenas y aislados	+	+	I
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	I
BH	Cerosa grisácea	Bacilos en cadenas y esporos	+	+	I
BH	Creмоса blanquecina	Bacilos en cadenas y esporos	+	+	I
BH	Desarrollo pulverulento	Streptomyces	+	nd	Nd
BH	Desarrollo pulverulento	Streptomyces	+	nd	Nd

BH	Desarrollo pulverulento	Streptomyces	+	nd	Nd
BH	Desarrollo pulverulento	Streptomyces	+	nd	Nd
BH	Cremosa blanquecina	Cocos en masas	+	-	O
BH	Cremosa rosada	Cocos en masas	+	-	I
BH	Puntiforme amarillenta	Bacilos pequeños aislados	+	-	I
BH	Cremosa grisácea	Bacilos largos y cocoides	+	+	I
BH	Transp. amarillenta	Bacilos finos, cadenas y aislados	+	+	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas	+	-	I
BH	Cremosa naranja	Bacilos pleomórficos de a pares	+	-	I
BH	Puntiforme blanca	Bacilos pleomórficos	+	-	I
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	I
BH	Puntiforme rosada	Bacilos finos, cadenas y cocoides	+	-	I
BH	Desarrollo micoide	Bacilos en cadenas y esporos	+	+	O
BH	Desarrollo micoide	Bacilos en cadenas y esporos	+	+	I
BH	Cremosa grisácea	Bacilos en cadenas y esporos	+	+	I
BH	Desarrollo pulverulento	Streptomyces	+	nd	nd
BH	Desarrollo pulverulento	Streptomyces	+	nd	nd
BH	Desarrollo pulverulento	Streptomyces	+	nd	nd
BH	Desarrollo pulverulento	Streptomyces	+	nd	nd
BH	Cremosa rosada	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	I
BH	Transp. verdosa	Bacilos aislados	-	+	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos finos aislados	-	+	I
BH	Transp. verdosa	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BH	Transp. grisácea	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos finos aislados	-	+	I
BH	Transp. amarillenta	Bacilos filamentosos y cocoides	-	+	O
BH	Transp. grisácea	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos finos aislados	-	+	I
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos finos aislados	-	+	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos finos aislados	-	+	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos finos aislados	-	+	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos finos aislados	-	+	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos finos aislados	-	+	I
BH	Transp. grisácea	Bacilos cortos y filamentos	-	-	I
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos largos de a pares	-	+	O
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos largos de a pares	-	+	I
BH	Transp. grisácea	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos cortos y filamentos	-	+	I
BH	Cremosa rosada	Bacilos cortos y filamentos	-	+	I
BH	Cremosa rosada	Bacilos cortos y filamentos	-	+	I
BDHC	Transp. grisácea	Bacilos de a pares y aislados	-	+	Olento
BDHC	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas y cocoides	-	+	I
BDHC	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas y cocoides	-	+	I
BDHC	Transp. blanquecina	Bacilos en cadenas y cocoides	-	+	I
BDHC	Cremosa amarillenta	Bacilos cortos de a pares	-	+	I
BDHC	Transp. grisácea	Bacilos filamentosos y cocoides	+	+	Olento
BDHC	Cremosa blanquecina	Bacilos pequeños aislados	+	+	Olento

Referencias: nd, no determinado; Transp., transparente; Mov., movilidad.

La **Figura VI-8** (ver hoja plegada) muestra el dendrograma resultante del análisis comparativo utilizando como variables los perfiles de los cultivos Gram-negativos de las poblaciones BH y BDCH del suelo control y de las cepas de referencia.

La Tabla VI-10 presenta la abundancia relativa de los géneros Gram-negativos representativos la población BH del sistema Control a los 360 días de tratamiento. Los 5 cultivos Gram-negativos representativos de la población BDHC son identificados como *Alcalígenes* (3) *Pseudomonas* (1).

**Tabla VI-10:** Abundancia relativa de géneros y grupos bacterianos representativos de la población BH del sistema Control en el día 360 del tratamiento.

Grupo Gram-negativo		Grupo Gram-positivo	
Géneros	Abundancia (%)	Grupos	Abundancia (%)
<i>Pseudomonas</i>	11	Bacilos regulares	13
<i>Alcalígenes</i>	8	Bacilos pleomorfos	4
<i>Chryseomonas</i>	6	Bacilos filamentosos	13
<i>Stenotrophomonas</i> ( <i>Xantomonas</i> )	7	Bacilos esporulados	12
<i>Agrobacterium</i>	5	Cocos	4
		<i>Streptomyces</i>	17

El grupo de microorganismos Gram-positivos del suelo Control conserva el predominio de Gram-positivos sobre los Gram-negativos.

#### **VI.1.1.b.2 Cultivos representativos del sistema API—2,5% a los 360 días.**

A partir de 60 cultivos primarios aislados, son recuperados luego de los sucesivos aislamientos 54 cultivos pertenecientes a las poblaciones BH y BDHC.

La Tabla VI-11 muestra una primera descripción de los cultivos representativos del sistema API-2,5%.

En la población BH se detecta un 57% de Gram-positivos y un 43% de Gram-negativos. La población BDCH esta representada por 7 cultivos, un bacilo pleomórfico Gram-positivo y 6 bacilos Gram-negativos.

**Tabla VI-11:** Descripción macro-microscópica de los cultivos representativos de las poblaciones BH y BDHC del sistema API-2,5% a los 360 días de tratamiento.

Población	Macro	Micro	Gram	Mov.	OF-glu
BH	Transp. amarilla	Pequeños bacilos aislados	+	+	
BH	Transp. grisacea	Pequeños bacilos aislados	+	+	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos esporulados	+	+	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos esporulados	+	+	
BH	Cremosa beige	Bacilos esporulados	+	+	
BH	Desarrollo pulverulento	<i>Streptomyces</i>	+	nd	nd
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos en largas cadenas	+	+	

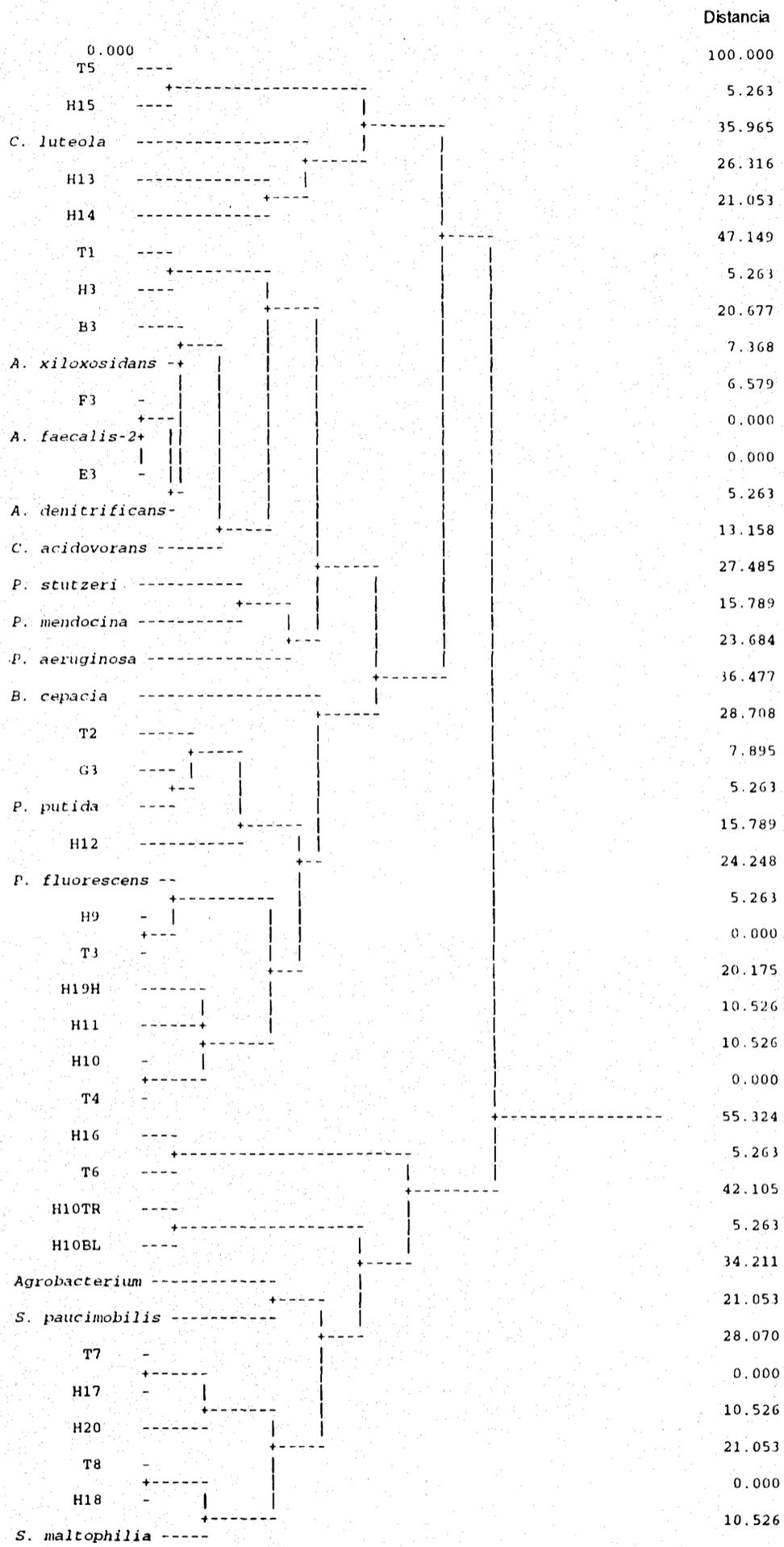


Figura VI-8 : Dendrograma derivado del agrupamiento por ligamiento promedio no ponderado de los coeficientes de similitud ( $S_m$ ) obtenidos mediante la comparación de los 27 cultivos no fermentadores representativos de la Población BH y BDHC aislados del suelo Control a los 360 días y las cepas de referencia. Distancia en porcentaje de disimilitud.

BH	Mucoide blanquecina	Bacilos en cadenas	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos esporulados	+	-	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos cortos aislados	+	+	
BDHC	Cremosa naranja	Bacilos pleomórficos	+	+	F
BH	Membranosa blanquecina	Bacilos gruesos aislados	+	-	
BH	Desarrollo micoide	Bacilos esporulados	+	+	
BH	Cremosa amarilla	Bacilos finos aislados	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos cortos aislados	+	-	
BH	Puntiforme blanquecina	Bacilos cortos aislados	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos esporulados	+	+	
BH	Puntiforme amarilla	Cocos en masas	+	-	
BH	Cremosa amarilla	Cocos en masas	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Cocos en cortas cadenas	+	-	O
BH	Desarrollo pulverulento	Streptomyces	+	nd	nd
BH	Membranosa blanquecina	Pequeños bacilos pleomorfos	+	-	
BH	Mucoide blanquecina	Pequeños bacilos pleomorfos	+	-	
BH	Transp. amarilla	Bacilos pleomorfos aislados	+	-	
BH	Mucoide transp.	Bacilos pleomorfos aislados	+	-	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos filamentosos	+	-	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos filamentosos	+	-	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos filamentosos	+	-	
BH	Transp. grisácea	Bacilos pequeños	-	+	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos pequeños	-	-	
BH	Cremosa amarilla	Bacilos de a pares y aislados	-	+	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos cortos y filamentos	-	-	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos cortos y filamentos	-	+	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos cortos y filamentos	-	-	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos cortos y filamentos	-	-	
BH	Cremosa amarilla	Bacilos cortos aislados	-	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos cortos aislados	-	-	
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos pequeños aislados	-	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos pequeños aislados	-	-	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos cortos aislados	-	-	
BH	Puntiforme gris	Pequeños bacilos aislados	-	+	O
BH	Transp. amarillenta	Pequeños bacilos aislados	-	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos aislados y filamentos	-	+	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos aislados y filamentos	-	+	
BH	Mucoide blanquecina	Pequeños bacilos aislados	-	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos aislados y filamentos	-	-	
BH	Transp. amarillenta	Bacilos aislados y de a pares	-	+	
BH	Transp. grisacea	Bacilos aislados y de a pares	-	+	
BDHC	Mucoide blanquecina	Bacilos largos y cocoides	-	-	
BDHC	Puntiforme blanquecina	Bacilos cortos en cadenas	-	+	O
BDHC	Mucoide blanquecina	Bacilos en cadenas	-	-	O
BDHC	Transp. blanquecina	Bacilos en cadenas	-	+	O
BDHC	Mucoide blanquecina	Bacilos aislados y filamentos	-	-	O
BDHC	Mucoide blanquecina	Bacilos aislados y filamentos	-	-	

Referencias: nd, no determinado; Transp., transparente; Mov., movilidad.

La **Figura VI-9** (ver hoja plegada) muestra el dendrograma resultante del análisis comparativo utilizando como variables los perfiles de los cultivos Gram-negativos del sistema API-2,5% a los 360 días y de las cepas de referencia.

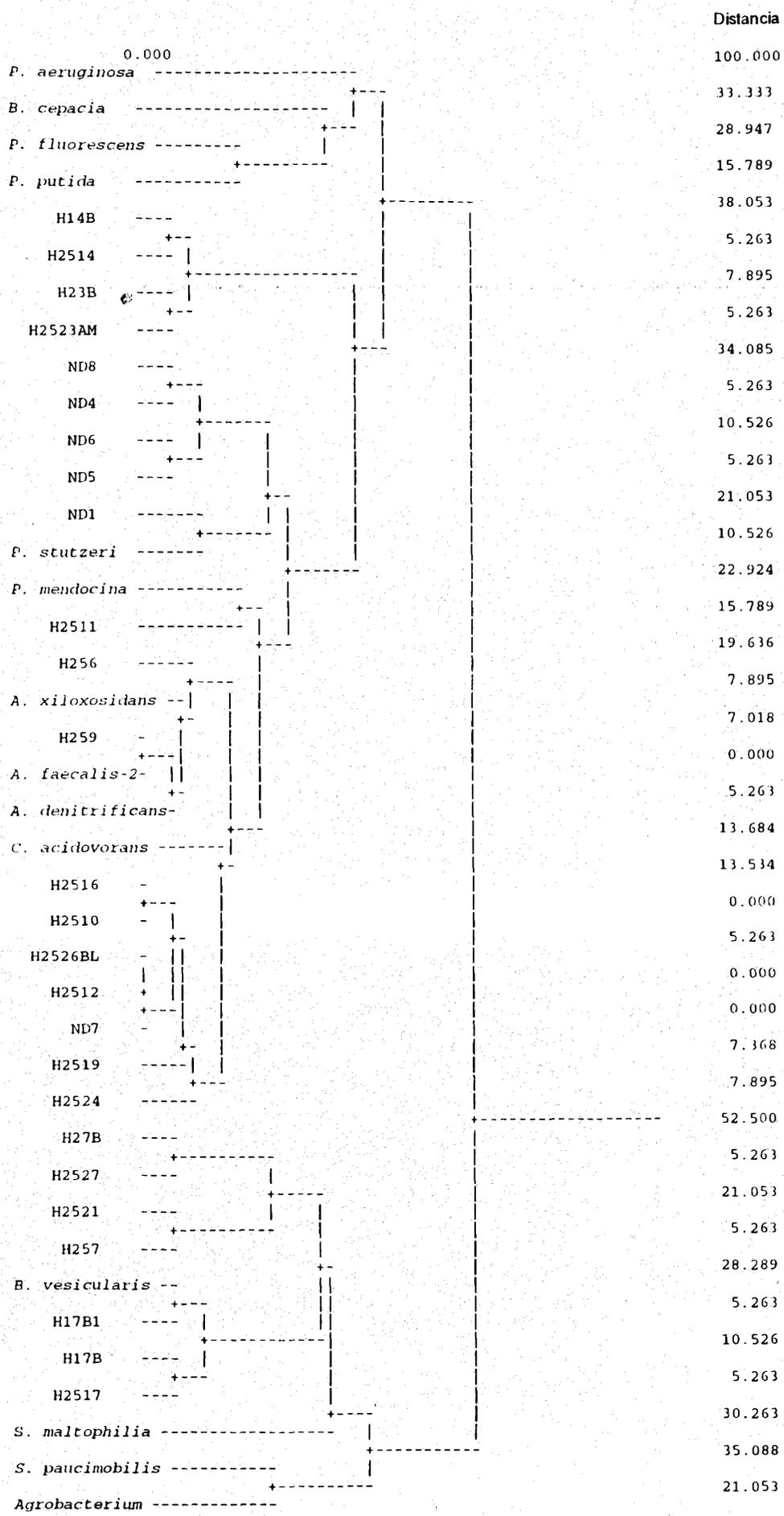


Figura VI-9: Dendrograma derivado del agrupamiento por ligamiento promedio no ponderado de los coeficientes de similitud ( $S_w$ ) obtenidos mediante la comparación de los 26 cultivos no fermentadores representativos de la Población BH y BDHC aislados del sistema API-2.5% los 360 días y las cepas de referencia. Distancia en porcentaje de disimilitud.

La Tabla VI-12 presenta la abundancia relativa de los géneros Gram-negativos representativos la población BH del sistema control a los 360 días de tratamiento. Los cultivos Gram-negativos de la población BDHC son identificados como *Pseudomonas* (4), *Alcaligenes* (1) y *Comamonas* (1).

**Tabla VI-12:** Abundancia relativa de géneros y grupos bacterianos representativos de la población BH del sistema API-2,5% en el día 360 de tratamiento.

Grupo Gram-negativo		Grupo Gram-positivo	
Géneros	Abundancia (%)	Grupos	Abundancia (%)
<i>Comamonas</i>	13	Bacilos regulares	20
<i>Pseudomonas</i>	11	Bacilos pleomorfos	8
<i>Stenotrophomonas</i> ( <i>Xantomonas</i> )	9	Bacilos filamentosos	6
<i>Alcaligenes</i>	4	Bacilos esporulados	13
<i>Brevundimonas</i>	6	Cocos	6
		<i>Streptomyces</i>	4

#### VI.1.1.b.3 Cultivos representativos del sistema API - 5% a los 360 días.

A partir de 71 cultivos primarios aislados, son recuperados luego de los sucesivos aislamientos 60 cultivos pertenecientes a las poblaciones BH y BDHC.

La Tabla VI-13 muestra una primera descripción de los cultivos representativos del sistema API-5%. Se registran un 61% de Gram-positivos y un 39% de Gram-negativos.

La población BDCH esta representada por 9 cultivos Gram-negativos.

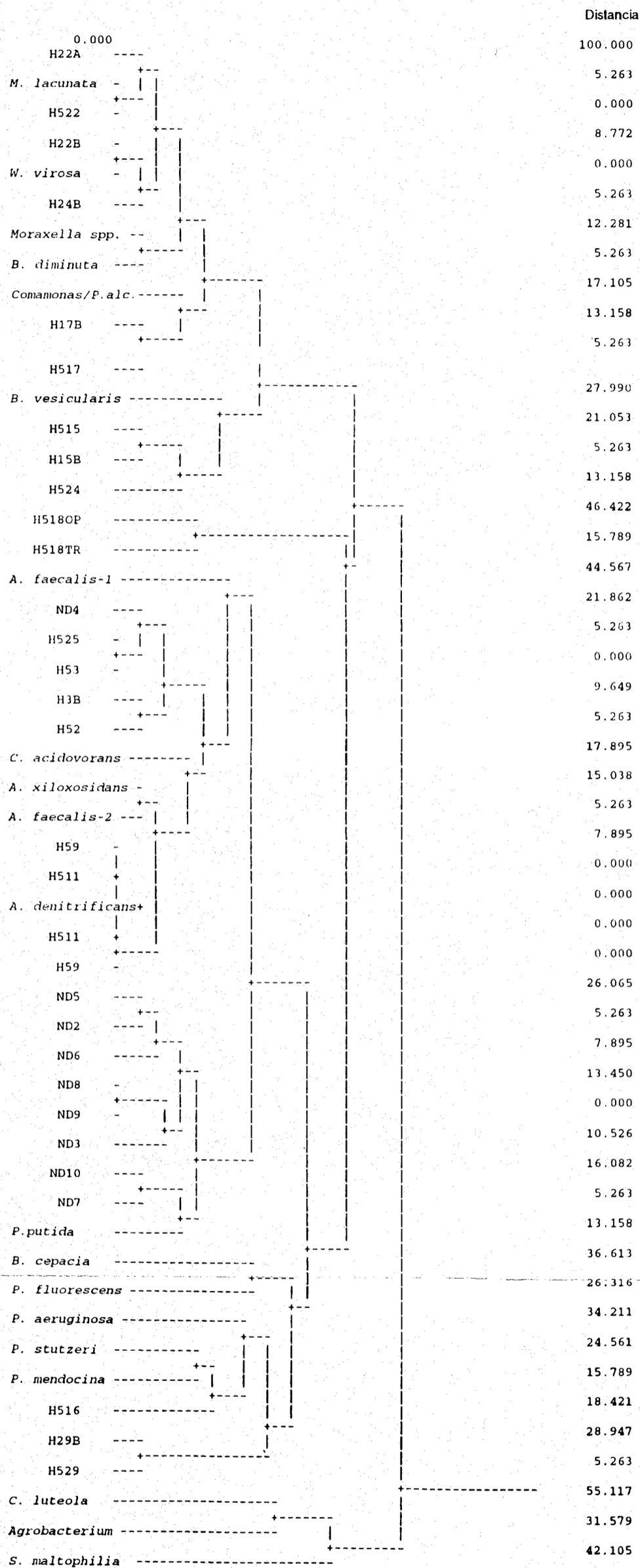
**Tabla VI-13:** Descripción macro-microscópica de los cultivos representativos de las poblaciones BH y BDHC del sistema API-5% a los 360 días de tratamiento.

Población	Macro	Micro	Gram	Mov.	OF-glu
BH	Transp. amarilla	Bacilos finos y aislados	-	+	O
BH	Cremosa opaca	Bacilos en cadenas y cocoides	-	-	O
BH	Transp. amarilla	Bacilos finos aislados	-	+	I
BH	Cremosa amarilla	Bacilos de a pares y aislados	-	-	I
BH	Transp. amarilla	Bacilos de a pares y aislados	-	+	I
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos de a pares y aislados	-	-	O
BH	Transp. amarilla	Bacilos finos y aislados	-	+	I
BH	Transp. amarilla	Bacilos finos y aislados	-	-	I
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos en cadenas y cocoides	-	-	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos de a pares y aislados	-	+	I
BH	Transp. amarilla	Bacilos finos y aislados	-	-	I
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos en cadenas y cocoides	-	-	O
BH	Transp. amarillo	Bacilos finos y aislados	-	+	I
BH	Transp. amarilla	Bacilos finos y aislados	-	-	I
BH	Transp. amarilla	Bacilos finos y aislados	-	-	I
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas y cocoides	-	-	I

BH	Transp. amarilla	Bacilos finos aislados	-	+	
BH	Transp. amarilla	Bacilos finos y aislados	-	+	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos pequeños, finos, aislados	-	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos pequeños aislados	-	-	
BDHC	Cremosa blanquecina	Bacilos aislados y de a pares	-	+	
BDHC	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas y cocoides	-	+	O
BDHC	Mucoide blanquecina	Bacilos en cadenas y cocoides	-	+	O
BDHC	Cremosa blanquecina	Bacilos aislados y de a pares	-	+	O
BDHC	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas y cocoides	-	+	O <sub>lento</sub>
BDHC	Puntiforme amarilla	Bacilos finos aislados	-	+	
BDHC	Mucoide blanquecina	Bacilos en cadenas y cocoides	-	-	O
BDHC	Mucoide blanquecina	Bacilos en cadenas y aislados	-	+	O
BDHC	Puntiforme blanquecina	Bacilos finos aislados	-	+	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas y cocoides	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos aislados	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos gruesos de a pares	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos gruesos de a pares	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos gruesos de a pares	+	-	
BH	Transp. grisácea	Bacilos en cadenas y cocoides	+	-	
BH	Cremosa naranja	Bacilos en cadenas, formas v	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Cocos en diplos y aislados	+	-	F
BH	Cremosa blanquecina	Cocos en racimos	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos esporulados	+	+	F
BH	Cremosa naranja	Bacilos filamentosos y cocoides	+	-	
BH	Cremosa amarilla	Cocos en racimos	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos gruesos esporulados	+	-	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos gruesos esporulados	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas, esporulados	+	+	F
BH	Cerosa grisácea	Bacilos en cadenas, esporulados	+	+	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas, esporulados	+	+	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas, esporulados	+	+	F
BH	Cerosa grisácea	Bacilos en cadenas, esporulados	+	+	
BH	Cerosa grisácea	Bacilos en cadenas, esporulados	+	+	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas, esporulados	+	+	
BH	Desarrollo micoide	Bacilos en cadenas, esporulados	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas, esporulados	+	+	
BH	Desarrollo micoide	Bacilos en cadenas, esporulados	+	-	F
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas, esporulados	+	+	
BH	Desarrollo micoide	Bacilos en cadenas, esporulados	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas, esporulados	+	+	F
BH	Desarrollo micoide	Bacilos en cadenas, esporulados	+	-	
BH	Desarrollo micoide	Bacilos en cadenas, esporulados	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas, esporulados	+	+	
BH	Desarrollo micoide	Bacilos en cadenas, esporulados	+	-	

Referencias: nd, no determinado; Transp., transparente; Mov., movilidad.

La **Figura VI-10** (ver hoja plegada) muestra el dendrograma resultante del análisis comparativo utilizando como variables los perfiles de los cultivos Gram-negativos del sistema API-5% a los 360 días y de las cepas de referencia.



**Figura VI-10:** Dendrograma derivado del agrupamiento por ligamiento promedio no ponderado de los coeficientes de similitud ( $S_m$ ) obtenidos mediante la comparación de los 29 cultivos no fermentadores representativos de la Población BH y BDHC aislados del sistema API-5% los 360 días y las cepas de referencia. Distancia en porcentaje de disimilitud.

La Tabla VI-14 muestra la abundancia relativa de los géneros Gram-negativos representativos la población BH del sistema control a los 360 días de tratamiento. Los cultivos Gram-negativos de la población BDHC son identificados como *Pseudomonas* (8) y *Alcaligenes* (1).

**Tabla VI-14:** Abundancia relativa de géneros y grupos bacterianos representativos de la población BH del sistema API-5% en el día 360 del tratamiento.

Grupo Gram-negativo		Grupo Gram-positivo	
Géneros	Abundancia (%)	Grupos	Abundancia (%)
<i>Pseudomonas</i>	10	Bacilos regulares	8
<i>Comamonas</i>	8	Bacilos pleomorfos	2
<i>Brevundimonas</i>	6,4	Bacilos filamentosos	6
<i>Comamonas /P. alcaligenes</i>	4,3	Bacilos esporulados	35
<i>Weeksella</i>	4,3	Cocos	6
<i>Moraxella</i>	4	<i>Streptomyces</i>	4
<i>Alcaligenes</i>	2		

#### VI.1.1.b.4 Cultivos representativos del sistema API - 10% a los 360 días.

A partir de 71 cultivos primarios aislados, son recuperados luego de los sucesivos aislamientos 68 cultivos pertenecientes a las poblaciones BH y BDHC.

La Tabla VI-15 muestra una primera descripción de los cultivos representativos del sistema API-10%. Se registran un 64% de Gram-positivos y un 36% de Gram-negativos en la población heterótrofa. Todos los cultivos representativos de la población BDHC son Gram-negativos.

**Tabla VI-15:** Descripción macro-microscópica de los cultivos representativos de las poblaciones BH y BDHC del sistema API-10% a los 360 días de tratamiento.

Población	Macroscópica	Microscópica	Gram	Mov.	OF-glu
BH	Cremosa-oscura-oscuro	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	
BH	Cremosa-opaca-oscuro	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	
BH	Cerosa blanquecina	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	
BH	Cremosa opaca-oscuro	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	
BH	Cerosa blanquecina	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	
BH	Cerosa blanquecina	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	
BH	Cerosa blanquecina	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	
BH	Desarrollo micoide	Bacilos esporulados	+	-	O
BH	Cremosa opaca	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	
BH	Cremosa opaca	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	
BH	Cremosa opaca	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	
BH	Desarrollo micoide	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	O
BH	Cremosa opaca	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	
BH	Cremosa opaca	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	O
BH	Cremosa opaca	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	
BH	Cremosa opaca	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	
BH	Cremosa opaca	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	
BH	Mucoide blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	+	+	O

BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	O
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	O
BH	Cremosa blanquecina	Cocos en masas	+	-	O
BH	Transp. grisáceo	Bacilos cortos aislados	+	-	
BH	Cerosa blanquecina	Bacilos en cadenas esporulados	+	+	O
BH	Puntiforme blanquecina	Cocoides aislados	+	-	
BH	Transp. grisáceo	Cocoides aislados	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas y aislados	+	+	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos cortos aislados	+	-	
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos cortos aislados	+	-	
BH	Cremosa blanquecina	Cocoides aislados	+	+	
BH	Puntiforme rosada	Cocos en racimos	+	-	
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos cortos aislados	+	-	
BH	Transp. amarillenta	Bacilos cortos finos y aislados	-	+	
BH	Transp. amarillenta	Bacilos cortos finos y aislados	-	+	
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos de a pares y aislados	-	+	
BH	Puntiforme amarillenta	Bacilos finos y largos	-	+	
BH	Cremosa amarilla	Bacilos cortos aislados	-	-	O
BH	Puntiforme amarillenta	Bacilos finos y largos	-	+	
BH	Cremosa amarillenta	Bacilos de a pares y aislados	-	+	
BH	Transp. amarillenta	Bacilos de a pares y aislados	-	+	
BH	Transp. grisáceo	Bacilos cortos aislados	-	-	
BH	Transp. grisáceo	Bacilos cortos aislados	-	-	
BH	Transp. amarilla	Bacilos finos aislados	-	-	
BH	Mucoide amarillenta	Bacilos filamentosos y cocoides	-	+	
BH	Transp. amarillenta	Bacilos finos aislados	-	+	O
BH	Transp. amarillenta	Bacilos en cadenas y aislados	-	+	O
BH	Transp. amarillenta	Bacilos en cadenas y aislados	-	+	O
BH	Transp. amarillenta	Bacilos de a pares y aislados	-	-	
BH	Transp. amarillenta	Bacilos finos aislados	-	+	
BH	Transp. amarillenta	Bacilos finos aislados	-	-	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos en cadenas y aislados	-	+	
BH	Cremosa blanquecina	Bacilos de a pares y aislados	-	+	
BDHC	Cremosa amarillenta	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O <sub>lento</sub>
BDHC	Puntiforme grisácea	Bacilos cortos aislados	-	-	O
BDHC	Cremosa blanquecina	Bacilos filamentosos y cocoides	-	+	
BDHC	Mucoide blanquecina	Bacilos en cadenas y cocoides	-	+	
BDHC	Cremosa blanquecina	Cocoides aislados	-	+	
BDHC	Cremosa amarillenta	Bacilos cortos aislados	-	+	O
BDHC	Transp. grisáceo	Bacilos cortos aislados	-	+	O
BDHC	Transp. grisáceo	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BDHC	Transp. grisáceo	Bacilos de a pares y aislados	-	+	O
BDHC	Transp. grisáceo	Bacilos cortos aislados	-	+	O
BDHC	Transp. grisáceo	Bacilos cortos aislados	-	+	O

Referencias: nd, no determinado; Transp., transparente; Mov., movilidad.

La **Figura VI-11** (ver hoja plegada) muestra el dendrograma resultante del análisis comparativo utilizando como variables los perfiles de los cultivos Gram-negativos del sistema API-10% a los 360 días y de las cepas de referencia.

En el dendrograma se observa un agrupamiento de 8 cultivos sin incluir cepas de referencia, impidiendo la asignación de un género. Se aproxima la clasificación aplicando el  $S_{sm}$  entre los

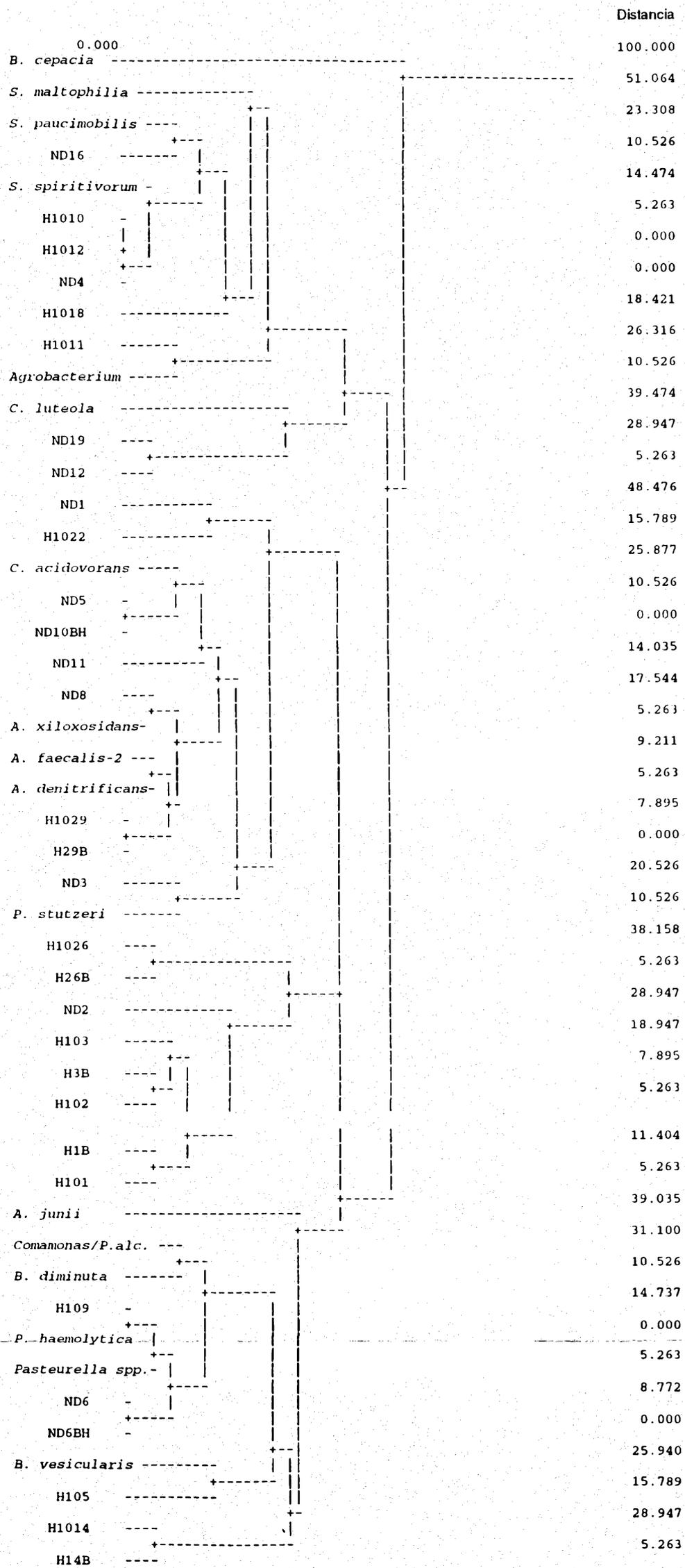


Figura VI-11 : Dendrograma derivado del agrupamiento por ligamiento promedio no ponderado de los coeficientes de similitud ( $S_m$ ) obtenidos mediante la comparación de los cultivos no fermentadores representativos de la Población BH y BDHC aislados del sistema API-10% a los 360 días y las cepas de referencia. Distancia en porcentaje de disimilitud.

cultivos del agrupamiento y las cepas de referencia, resultando ser el género *Moraxella* el que diera mayor  $S_{sm}$  con cada cultivo del agrupamiento.

El total de cultivos Gram-negativos analizados resultan estar muy relacionados, todos los subgrupos se asemejan finalmente en un 51%.

La Tabla VI-16 muestra la abundancia relativa de los géneros Gram-negativos representativos la población BH del sistema control a los 360 días de tratamiento.

Los 11 cultivos representativos de la población BDHC son identificados como *Pseudomonas* (2), *Brevundimonas* (1), *Sphingobacterium* (1), *Sphingomonas* (1), *Pasteurella* (2), *Chryseomonas* (2), *Alcaligenes* (1) y *Acinetobacter* (1).

**Tabla VI-16:** Abundancia relativa de géneros y grupos bacterianos de la población BH representativa del sistema API-10% en el día 360 del tratamiento.

Grupo Gram-negativo		Grupo Gram-positivo	
Géneros	Abundancia (%)	Grupos	Abundancia (%)
<i>Moraxella</i>	9	Bacilos regulares	16
<i>Pseudomonas</i>	6	Bacilos pleomorfos	-
<i>Alcaligenes</i>	4	Bacilos filamentosos	2
<i>Acinetobacter</i>	4	Bacilos esporulados	34
<i>Pasteurella</i>	4	Cocos	5
<i>Sphingobacterium</i>	4	<i>Streptomyces</i>	5
<i>Stenotrophomonas</i>	2		
<i>Comamonas</i>	2		
<i>Brevundimonas</i>	2		
<i>Agrobacterium</i>	2		

La Figura VI-12 muestra en forma comparativa la abundancia de cultivos predominantes determinados en los sistemas al finalizar el tratamiento en comparación con los determinados en el suelo Control en el mismo período. En ella se aprecia que el suelo no contaminado conserva el predominio de cultivos Gram-positivos (63%) en la población BH. Su composición taxonómica está dada principalmente por los siguientes grupos: *Streptomyces* (17%), *Bacillus* (13%) y bacilos regulares filamentosos (13%), en proporciones semejantes.

De acuerdo con los resultados se observa que todos los sistemas contaminados recuperan el predominio del grupo Gram-positivo en las respectivas poblaciones BH, Tabla VI-17.

**Tabla VI-17:** Abundancia de géneros Gram-positivos vs. Gram-negativos en los sistemas de suelo a los 360 días del tratamiento.

Abundancia (%)	Control	API-2,5%	API-5%	API-10%
Gram-positivos	63	57	61	62
Gram-negativos	37	43	39	38

Sin embargo la composición de grupos dominantes ha cambiado respecto a la determinada al comienzo del proceso de biorremediación.

Según se observa en la Figura VI-12, el género *Bacillus* es el grupo dominante de la población BH en los sistemas más contaminados, API-5% y API-10%.

En el grupo Gram-negativo se observa una disminución en la abundancia del género *Pseudomonas* y una mayor diversidad de géneros en total.

Respecto de la población BDHC, del suelo Control y del sistema API-2,5% se aísla al menos 1 cultivo Gram-positivo a partir de las mayores diluciones del NMP. Mientras que en los sistemas API-5% y API-10% los aislamientos son todos Gram-negativos.

Los géneros degradadores más abundantes son *Pseudomonas* y *Alcalígenes*.

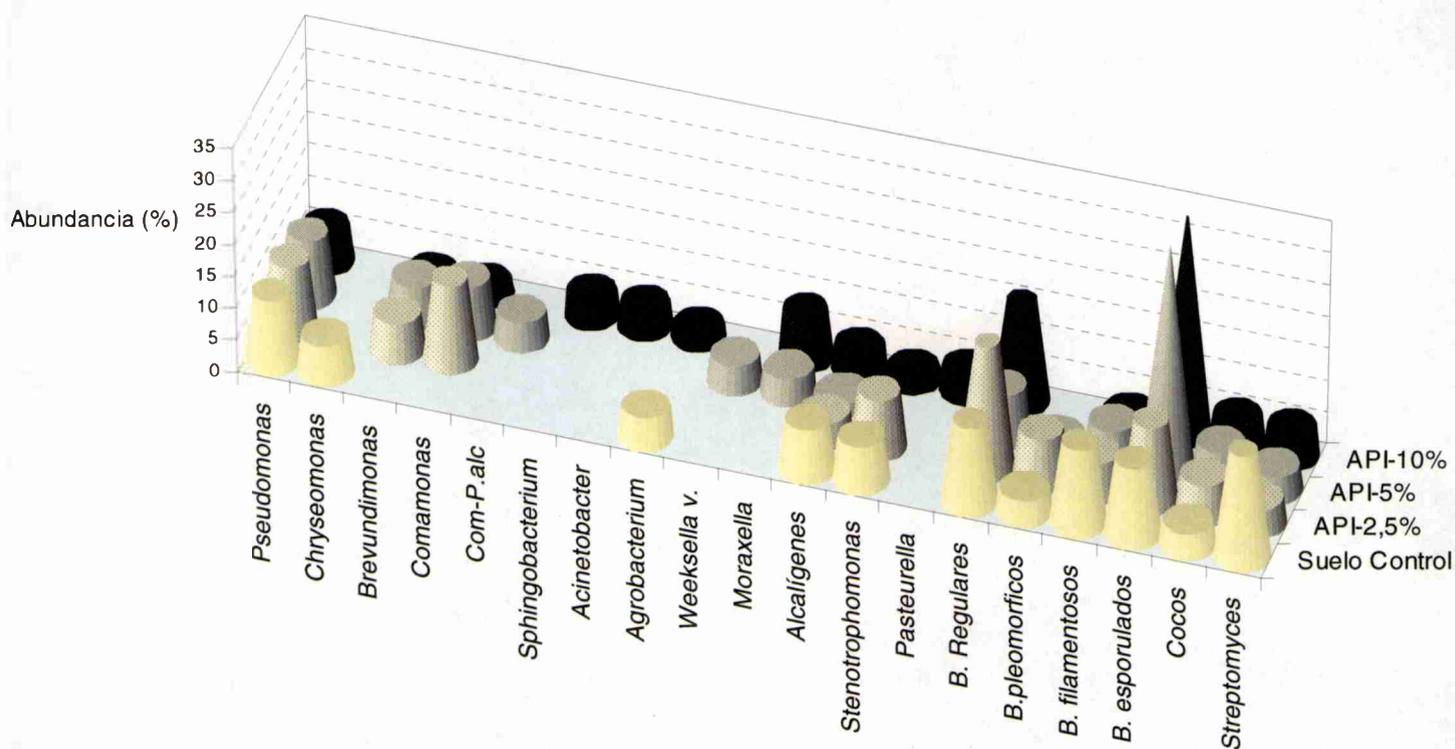
Particularmente los representativos del sistema API-10% demuestran una mayor variedad de géneros *Pseudomonas*, *Alcalígenes*, *Comamonas*, *Pasteurella*, *Brevundimonas*, *Sphingomonas*, *Sphingobacterium* y *Chryseomonas*.

El descenso observado *Pseudomonas* está indicando la baja concentración de sustratos fácilmente asimilables en el sistema. Este microorganismo considerado estratega-r, disminuye considerablemente su abundancia en el sistema por la imposibilidad de multiplicarse a su máxima velocidad de crecimiento ante la escasez de nutrientes disponibles.

El predominio del género *Bacillus* en los sistemas API-5% y API-10% podría explicarse en principio a través de la capacidad de desarrollar rápidamente ante sustrato asimilable, característica que lo ubica en el grupo de los estrategas-r (Atlas y Bartha, 1998), y luego hacia el final del tratamiento permanecer aumentado debido a su capacidad de esporular en un ambiente adverso. Otra causa de su abundancia relativa podría atribuirse a la propiedad de este género de producir enzimas que pueden contribuir a la degradación y asimilación de sustancias complejas de alto peso molecular, necesarias para mantenerse en número elevado dentro de la comunidad.

Particularmente en el sistema API-10%, se aíslan cultivos pertenecientes a tres géneros que no se encuentran en los sistemas menos contaminados, *Sphingobacterium*, *Acinetobacter* y *Pasteurella*. Según los perfiles de identificación del sistema utilizado API-20ne de bioMerieux, los cultivos pertenecientes a estos géneros utilizaron como fuente de C asimilable solo tres ó cuatro de los 12 sustratos testeados. La disminución en la capacidad de asimilar sustratos

simples podría ser una señal del efecto que produce la selección ejercida por la mayor concentración del barro aplicado.



**Figura VI-12 :** Abundancia de géneros predominantes determinados en los sistemas de tierra Control y tierras contaminadas con API, cuando los sistemas han estabilizado sus niveles residuales de hidrocarburos (360 días).

#### VI.1.1.c Evaluación de los cambios producidos en la estructura de la comunidad microbiana.

Una forma de establecer relaciones entre las diferentes comunidades representativas de cada sistema de suelo es mediante la comparación de sus integrantes a través de un *Coefficiente de Similitud* denominado *Sp*.

Mediante su aplicación se pretende evaluar el efecto de la concentración de residuo y del tratamiento sobre la comunidad bacteriana cultivable del suelo.

El análisis se realiza aplicando un simple modelo matemático desarrollado por Kuhn y col., 1991, en el estudio de enterobacterias aisladas de muestras de agua.

El coeficiente  $S_p$  depende de la proporción de aislamientos iguales entre dos comunidades. Cuando se comparan dos comunidades con fenotipos diferentes el  $S_p$  da un valor bajo, tendiente a 0 si son completamente diferentes.

Si las comunidades comparadas tienen una alta proporción de fenotipos iguales, el valor será mayor, tendiente a 1 en el caso de ser iguales.

### Cálculos del coeficiente de similitud ( $S_p$ ).

$$S_p = \frac{S_x - S_y}{2} \quad \text{con} \quad S_x = \frac{\sum q_{xy}}{N_x} \quad S_y = \frac{\sum q_{yi}}{N_y}$$

$S_x$ , mide la similitud de la población x en la población y.

$S_y$ , mide la similitud de la población y en la población x

$N_x$ ,  $N_y$ , es el número total de aislamientos muestreados en la población x y en la población y, respectivamente.

$p_{xi}$ , es la proporción de aislamientos idénticos a  $i$  en la población x.

$p_{yi}$ , es la proporción de aislamientos idénticos a  $i$  en la población y.

$q_{xi}$ , es el cociente entre la proporción del aislamiento- $i$  en la población x respecto de la

proporción del aislamiento- $i$  en la población y,  $q_{xi} = \frac{p_{xi}}{p_{yi}}$

La letra  $i$ , representa el número de aislamiento en cada sistema y toma valores desde 1 hasta  $N_x$  y  $N_y$ , respectivamente.

A manera de ejemplo se describe el procedimiento para el cálculo de  $S_p$  entre dos hipotéticas comunidades x e y.

Aislamientos en la comunidad x = A, A, A, B y C

Aislamientos en la comunidad y = A, B, B, C y D

Ambas comunidades tienen el mismo número de cultivos,  $N = 5$ .

**Tabla VI-18:** Descripción de los cálculos para la determinación del  $S_p$  entre la comunidad x y la comunidad y.

Parámetros	Comunidad x					Parámetros	Comunidad y				
	A	A	A	B	C		A	B	B	D	E
$p_{xi}$	3/5	3/5	3/5	1/5	1/5	$p_{yi}$	1/5	2/5	2/5	1/5	1/5
$p_{yi}$	1/5	1/5	1/5	2/5	0	$p_{xi}$	3/5	1/5	1/5	0	0
$q_{xi}$	1/3	1/3	1/3	1/2	0	$q_{yi}$	1/3	1/2	1/2	0	0

Según el modelo propuesto el cociente  $q_{xi} = \frac{p_{xi}}{p_{yi}}$ , debe ser siempre menor que 1;

si  $q_{xi}$  es mayor que 1, entonces  $q_{xi} = 1/q_{xi}$

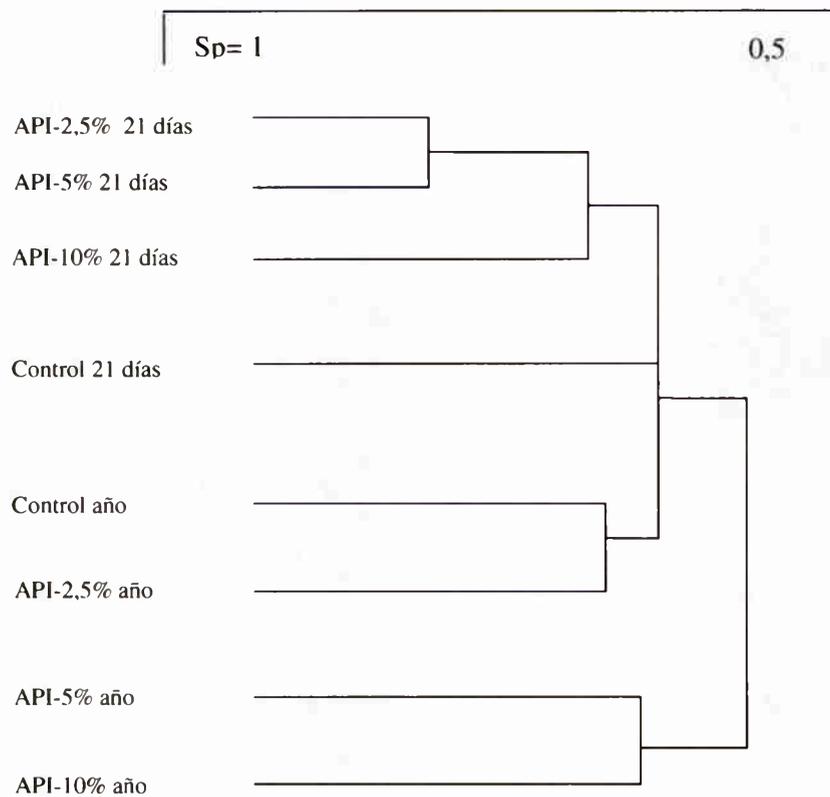
Para el cálculo del coeficiente  $S_p$  entre las comunidades de dos sistemas de suelo se considera la abundancia de cada género representativo de cada sistema.

Entonces se calcula la proporción de géneros aislados en un primer sistema y la proporción de éstos que fueron aislados en el otro sistema. Luego se hace lo mismo desde el segundo sistema. Siguiendo el procedimiento indicado en la Tabla VI-18 se obtienen los coeficientes de similitud del primer sistema en el segundo y viceversa.

El promedio de ambos da el coeficiente de similitud  $S_p$  entre los dos sistemas analizados.

De ésta manera se realizan todas las comparaciones entre los ocho sistemas y luego se aplica el método de ligamiento promedio no ponderado con la intención de describir gráficamente la relación entre todos los sistemas.

El dendrograma de la Figura VI-13 muestra la forma en que se relacionan los sistemas contaminados entre sí y con el Control, durante el tratamiento.



**Figura VI-13:** Dendrograma derivado del ligamiento promedio no ponderado de los coeficientes de similitud  $S_p$  obtenidos por comparación entre los aislamientos representativos de los sistemas de suelo contaminados al día 21 y 360, y los sistemas control en los mismos períodos.

Analizando el dendrograma de la Figura VI-13 se observa que los sistemas contaminados en el período de establecimiento de la población degradadora (21 días) forman un primer cluster (0,59) indicando que comparten una gran proporción de grupos bacterianos, diferentes del sistema Control.

Luego de un año de tratamiento las comunidades de los sistemas contaminados están dominadas por poblaciones bacterianas diferentes a las predominantes en la etapa temprana, y al suelo limpio.

El sistema API-2,5% muestra cierto grado de semejanza con el sistema Control al final del tratamiento. Mientras que las comunidades de los sistemas más contaminados, 5% y 10%, forman un cluster separado del resto. Ambas comunidades son semejantes y denotan la influencia del género *Bacillus* como población mayoritaria.

#### **VI.1.1.d Análisis de los cambios en las capacidades metabólicas de la población bacteriana Gram-negativa.**

A través del análisis de los géneros predominantes, se observó que una baja contaminación del residuo API podría ser biorremediada en el término de un año y que concentraciones altas en el mismo tiempo de tratamiento, no logran restablecer los géneros predominantes del suelo original, no contaminado.

Particularmente se evidenció que durante la etapa temprana del tratamiento, la presencia del residuo produce un enriquecimiento selectivo en la población bacteriana Gram-negativa del suelo. Usualmente ha sido observado que las bacterias Gram-negativas son dominantes en los ambientes contaminados con hidrocarburos (Macnaughton y col., 1999). Entonces, los cambios detectados en esta población pueden ser considerados relevantes en los sistemas.

Por otro lado, considerando que géneros predominantes en los sistemas más contaminados al finalizar el tratamiento, pueden prevalecer debido a la capacidad de desarrollar formas esporuladas de resistencia, una mayor información respecto de las propiedades fisiológicas de los sistemas podría obtenerse a través del análisis de las capacidades metabólicas de las poblaciones Gram-negativas finalmente establecidas.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la concentración del residuo API sobre la fracción de comunidad Gram-negativa del suelo se aplica en análisis de los componentes principales (PCA) utilizando como variables los resultados de las 19 pruebas obtenidas en la identificación de cada cultivo con el sistema API-20ne, más los resultados del tipo de metabolismo, O/F determinado en el medio de Hugh y Leifson y la movilidad.

El análisis se divide en tres etapas, con el objeto de interpretar los cambios ocurridos en la fracción de la comunidad Gram-negativa dominante.

##### *1<sup>ra</sup> Etapa*

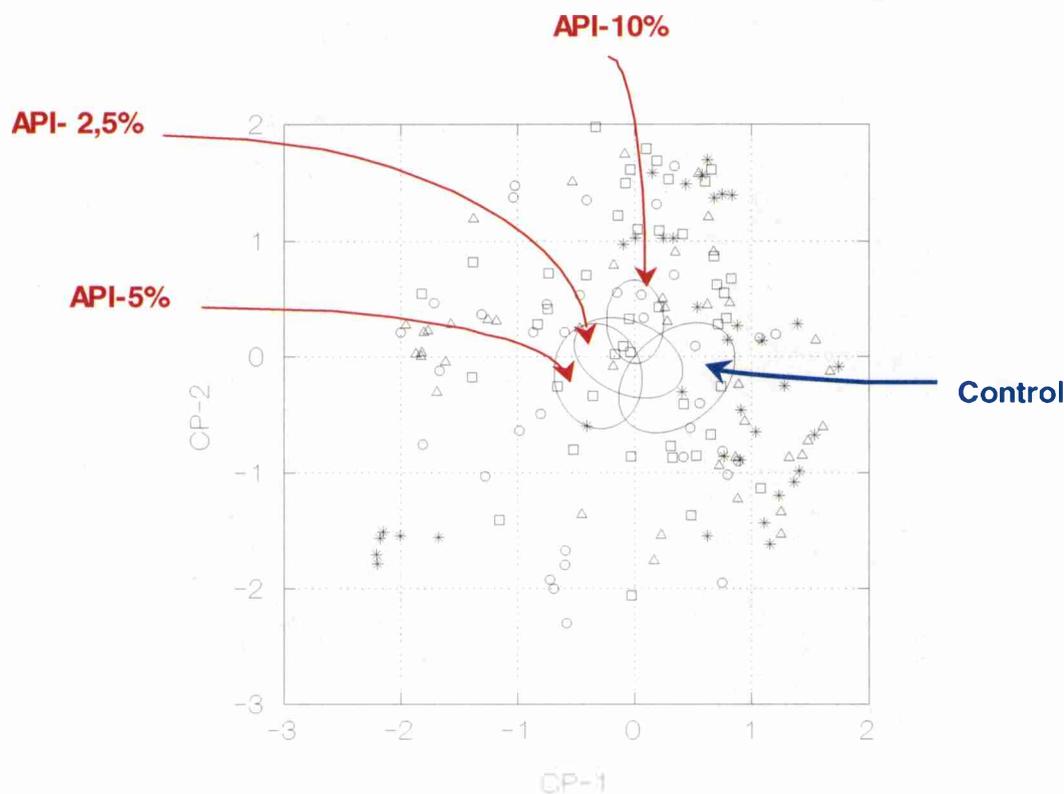
El primer análisis multivariante se aplica a los sistemas contaminados en el período de establecimiento de la población degradadora en comparación con el suelo Control, correspondiente a los 21 días de tratamiento.

La Figura VI-14 muestra el resultado del PCA comparativo expresado según los dos primeros componentes principales. Ambos componentes explican el 36% de la variación total.

El primer componente principal, CP-1 explica el 21% de la varianza del conjunto total de datos, y queda representado por la siguiente combinación de pruebas: asimilación de manosa, manitol, arabinosa, glucosa, maltosa y la capacidad de hidrólisis de -glucosidasa y -galactosidasa. Mientras que el segundo componente principal, CP-2 explica el 15% de la

varianza total y es representado por la combinación de las pruebas de asimilación de caprato y la capacidad de hidrolizar la arginina.

En la Figura VI-14, se aprecia una mayor densidad de cultivos en la región derecha según el CP-1. Las elipses representan el porcentaje bivariado del valor medio de la muestra (centroide) con un 95% de confianza. La superposición de las elipses, demuestra la semejanza entre los grupos representativos de los sistemas contaminados con el Control.



**Figura VI-14:** Relación entre las poblaciones Gram-negativas representativas de los sistemas API-2,5%; API-5%; API-10% y el sistema Control a los 21 días del tratamiento, aplicando el análisis de los Componentes Principales. Las elipses representan el porcentaje bivariado del valor medio de la muestra (centroide) con un 95% de confianza.

Referencias: Sistema Control; ○ sistema API-2,5%; △ sistema API-5% y □ sistema API-10%.

La presencia de residuo en cada sistema ha seleccionado una comunidad Gram-negativa que no difiere significativamente de la representativa del suelo limpio.

Es decir, las propiedades metabólicas de las poblaciones establecidas en la etapa temprana del tratamiento serían independientes de la concentración de residuo aplicado.

Este comportamiento estaría indicando el establecimiento de comunidades dominadas por cultivos capaces de asimilar una relativamente amplia variedad de sustratos, tanto en los sistemas contaminados como en el Control.

### *2<sup>da</sup> Etapa*

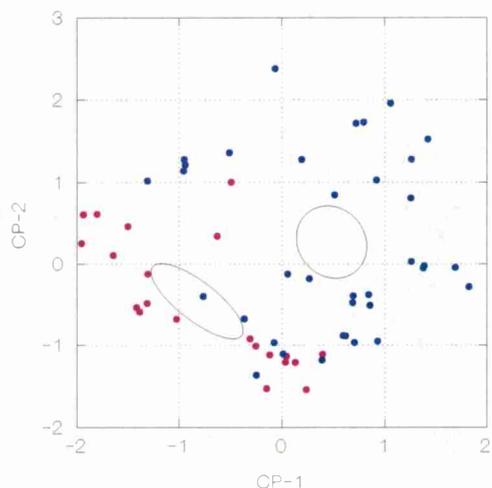
En este punto del tratamiento se han determinado dos procesos significativos: la eliminación de los compuestos fácilmente asimilables (medidos como HTCG y como FEE) y el reemplazo de una comunidad de rápido crecimiento (estrategas-r) a expensas de los compuestos del residuo fácilmente asimilables, por otra de mayor afinidad por productos de transformación de la población primaria.

Para evaluar el efecto del proceso de biorremediación sobre la comunidad Gram-negativa, se realiza un análisis comparativo entre los grupos de cultivos dominantes Gram-negativos de cada sistema a los 21 días y a los 360 días, mediante el PCA.

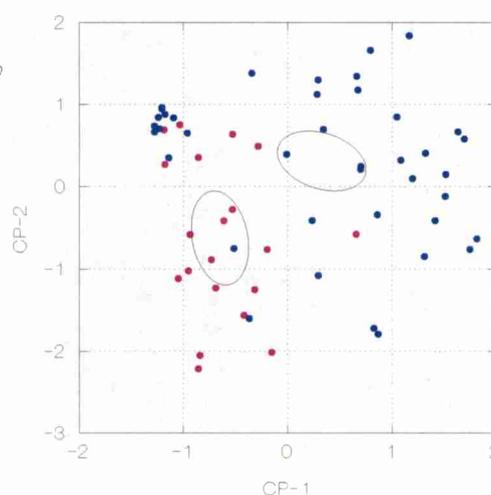
La Figura VI-15 muestra en forma individual para hacer más clara la apreciación de los cambios, el PCA entre cada sistema en el día 21 y el día 360 del tratamiento.

En el sistema API-2,5%, los dos primeros componentes explican el 44% de la variación total. El CP-1 (25% de la variación) queda representado por la asimilación de 7 sustratos: manosa, manitol, caprato, malato, citrato, fenil-acetato y gluconato. El CP-2 que explica el 19% de la variación queda representado por la asimilación de maltosa, arabinosa y la actividad de  $\beta$ -glucosidasa.

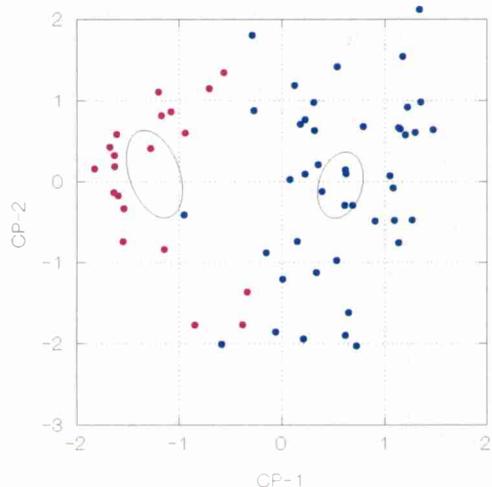
En el sistema API-5%, los dos primeros componentes principales explican el 46% de la variación total. El CP-1 (28% de la variación) queda representado por la asimilación de 5 sustratos: manosa, manitol, maltosa, arabinosa, glucosa y la actividad de  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -galactosidasa. El CP-2 que explica el 18% de la variación queda representado por la asimilación de gluconato, adipato, citrato y fenil-acetato.



Sistema API-2,5%



Sistema API-5%



Sistema API-10%

**Figura VI-15:** Relación entre la población Gram-negativa representativa de cada sistema a los 21 días en comparación con la representativa al año de tratamiento, aplicando el análisis de los componentes principales. Las elipses representan el porcentaje bivariado del valor medio de la muestra (centroide) con un 95% de confianza. Referencias: ○, cultivos del día 21 y ○, cultivos del día 360.

En el sistema API-10%, los dos primeros CP explican el 40% de la variación. El CP-1 (27% de la variación) está representado por la asimilación de 7 sustratos: manosa, manitol, glucosa, N-acetylglucosamina, glutamato, caprato y malato. El CP-2 (13% de la variación) correlaciona negativamente con la actividad  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -galactosidasa.

El resultado del PCA muestra, en los tres casos, que los grupos dominantes del día 21 y del día 360 tienen las coordenadas de sus centroides en cuadrantes diferentes.

La elipse que corresponde al sistema en el día 21 se encuentra en la zona de correlación positiva mientras que la elipse representante del sistema luego del tratamiento, resulta desplazada hacia la zona de correlación negativa con el CP-1.

Este cambio en las propiedades del grupo dominante estaría indicando la reducción de la capacidad de asimilar sustratos simples en la comunidad establecida al finalizar el tratamiento respecto de la activamente degradadora del día 21.

### *3<sup>a</sup> Etapa*

En esta última etapa, se evalúa si la comunidad Gram-negativa de los sistemas contaminados establecida al finalizar el tratamiento, recupera sus propiedades metabólicas de asimilación de los sustratos simples testeados, respecto del suelo limpio.

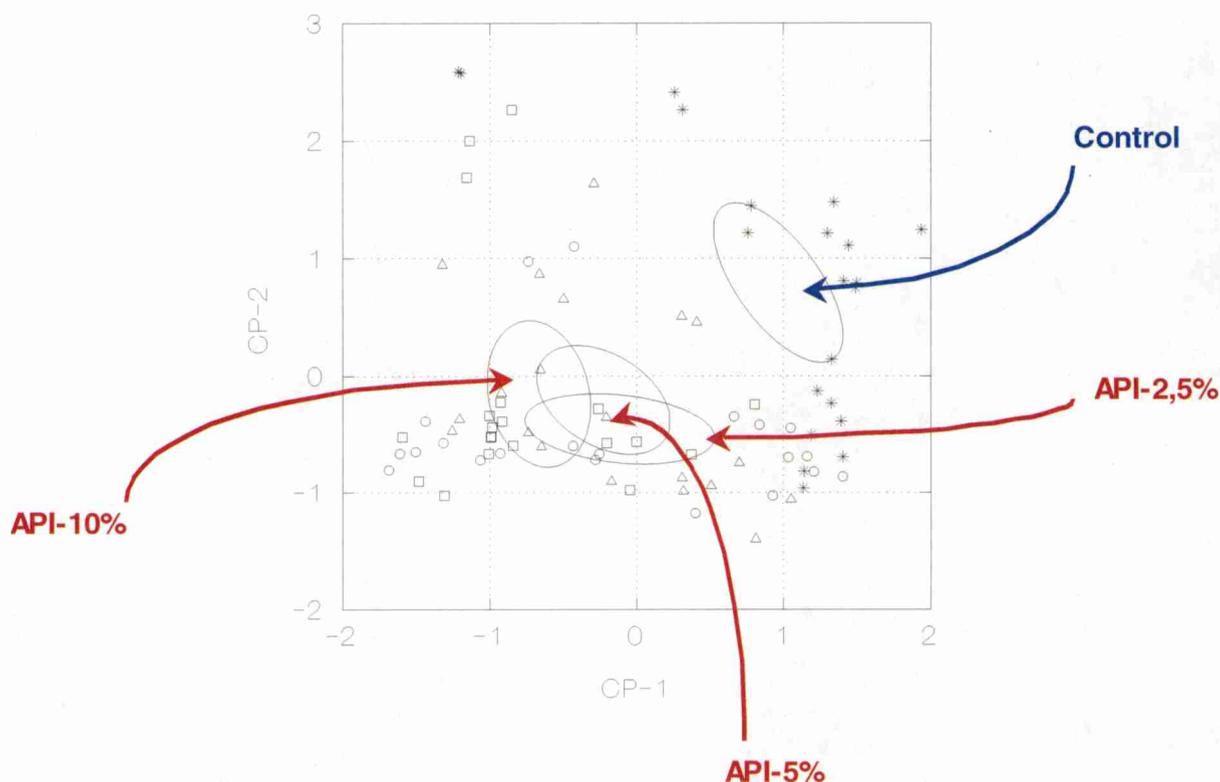
El PCA se aplica entre los grupos representativos de los sistemas contaminados al día 360 con el representativo del sistema Control en el mismo período.

La Figura VI-16 muestra el resultado del análisis según los dos primeros componentes principales.

Los primeros dos CP explican el 39% de la variación total de los datos. El CP-1 (23% de variación explicada) está fuertemente influenciado por una combinación de pruebas de asimilación de sustratos: glucosa, malato, caprato, fenil-acetato y citrato. El CP-2 (16% de la variación explicada) está formado principalmente por la combinación de las siguientes pruebas: asimilación de maltosa, manosa, glucosa, N-acetil-glucosamina, arabinosa y manitol.

Según se aprecia en la Figura VI-16, el conjunto de cultivos dominantes en los sistemas contaminados al finalizar el tratamiento se encuentran desplazados hacia la zona del cuadrante negativo, separándose del sistema Control. Este último ocupa la zona que correlaciona positivamente con el CP-1 y CP-2 lo cual indicaría que los cultivos dominantes tienen la capacidad de asimilar los diferentes sustratos probados.

No se observa diferencia significativa entre la posición de las elipses correspondientes a los sistemas contaminados. Sus centroides correlacionan negativamente con ambos componentes.



**Figura VI-16** : Relación entre las poblaciones Gram-negativas representativas de los sistemas API-2,5%; API-5%; API-10% y el sistema Control a los 360 días del tratamiento, aplicando el análisis de los Componentes Principales. Las elipses representan el porcentaje bivariado del valor medio de la muestra (centroide) con un 95% de confianza.

Referencias: Sistema Control; ○ sistema API-2,5%; △ sistema API-5% y □ sistema API-10%.

A partir de este resultado puede inferirse que durante el tratamiento, los sustratos remanentes productos del metabolismo de la población activamente degradadora y sustratos residuales de la mezcla compleja, han provocado la selección de una comunidad bacteriana diferente de la dominante en el sistema Control. Este efecto sería independiente de la concentración de residuo aplicado.

La comunidad Gram-negativa establecida finalmente en cada sistema se caracterizan por poseer un perfil de asimilación de sustratos simples reducido respecto del determinado en la comunidad Gram-negativa del suelo Control.

Es decir, el proceso de biorremediación, en las tres concentraciones estudiadas, no logra recuperar las propiedades metabólicas de la comunidad Gram-negativa original del suelo limpio.

### VI.1.1.e Análisis de los cambios en la diversidad de la población bacteriana Gram-negativa.

#### ***Índices de diversidad de especies.***

El análisis de los cambios en la estructura de la comunidad microbiana del suelo implica cambios en la diversidad. Estos cambios pueden ser medidos a través de la composición y proporción relativa de especies u otros taxones.

Existen varios índices matemáticos que expresan la riqueza y la proporción de especies dentro de una comunidad y se denominan índices de diversidad de especies.

Algunos de los índices de diversidad más ampliamente utilizados (derivados de la ecología de animales y plantas) son el índice de Shannon y el índice de Simpson.

La validez de estos índices de diversidad se fundamenta en la correcta identificación al nivel de especie, por lo tanto requieren una clara definición a este nivel.

El procedimiento consiste en determinar un gran número de características sobre los microorganismos aislados de una muestra. Luego se realiza un análisis de agrupamiento estableciendo la similitud entre los microorganismos. Finalmente los microorganismos similares son considerados pertenecientes a la misma especie basándose en un porcentaje de similitud arbitrario (*cutoff point*).

Watve y Gangal (1996) observaron este problema en la evaluación de la diversidad microbiana y plantearon que un índice de diversidad ideal debería reunir las siguientes condiciones:

- ▶ El índice debería reflejar tres dimensiones importantes de la diversidad: a) la riqueza de especies o el número de biotipos diferentes, b) su abundancia relativa y c) las diferencias o distancias taxonómicas entre los biotipos.
- ▶ El índice no debería fundamentarse en la elección arbitraria de algún parámetro, como por ejemplo el nivel de similitud al cual un grupo de aislamientos es reconocido como una especie o un biotipo. Si tal parámetro es esencial, debería ser justificado estadísticamente y el índice no debería ser sensible a pequeños cambios en este parámetro.
- ▶ El índice no debería ser desproporcionadamente sensible a posibles errores y variabilidad de los ensayos o pruebas utilizadas.
- ▶ Debido a que las muestras de comunidades microbianas son necesariamente incompletas, es decir muy pequeñas en comparación con el tamaño del ecosistema y destructivas (Kinkel y col., 1992), el índice debería estar poco influenciado por el tamaño de la muestra.

Entonces, una manera de considerar estas propiedades es la aplicación de un índice que no requiera definiciones previas de la unidad de medida a algún nivel taxonómico.

Es así como sugieren utilizar el promedio de la distancia taxonómica entre todos los pares de aislamientos como un índice de diversidad:

$$D_{\text{promedio}} = \frac{\sum d(i, j)}{S(S+1)/2}, \quad \text{Ecuación (1)}$$

donde  $d(i, j)$  es la distancia taxonómica entre el  $i$ -mo y el  $j$ -mo aislamiento y  $S$  es el número total de aislamientos.

La distancia ( $d$ ) o disimilitud puede ser definida como  $(1-S_{sm})$  para la caracterización binaria de datos, donde  $S_{sm}$  es el coeficiente de similitud entre dos aislamientos (Simple matching coefficient).

Respecto de la influencia que puede producir la cantidad de aislamientos que comprenden la muestra, un número de 20 o más aislamientos permite obtener un índice que no muestra variación con el tamaño de la muestra (van Elsas y col., 2002).

En este estudio y con la finalidad de no involucrar ningún parámetro arbitrario en la definición de las unidades taxonómicas se aplica la alternativa simple propuesta por Watve y col. 1996.

Los autores definen un índice de *Diversidad promedio* ( $D_{\text{promedio}}$ ) calculado mediante la distancia taxonómica entre pares de aislamientos.

El  $D_{\text{promedio}}$  aumenta al aumentar el número de biotipos diferentes y disminuye si existen biotipos dominantes en la comunidad, de esta forma refleja la riqueza y la abundancia relativa entre los aislamientos sin involucrar ningún parámetro arbitrario.

Así mismo, los autores introducen el concepto de *varianza* del Índice, que permitiría realizar un análisis comparativo con cierto nivel de significación entre las poblaciones estudiadas.

Esta "*varianza*" es definida como una función de la proporción de pruebas positivas obtenidas sobre el conjunto de aislamientos de cada sistema, es decir

$$f = a^2 + (1-a)^2 \quad \text{Ecuación (2)}$$

donde  $a$  = número de pruebas(+) / número total de pruebas

La Tabla VI-19 muestra los valores de los Índices de  $D_{\text{Promedio}}$  calculados según la ecuación (1) entre los cultivos dominantes Gram-negativos de cada sistema contaminado y sus controles del día 21 y del día 360 de tratamiento y los valores calculados de la *varianza* según la ecuación (2).

**Tabla VI-19:** Valores del Índice de Diversidad promedio de cultivos Gram-negativos representativos de cada sistema en el día 21 y el día 360 de tratamiento. *Varianza* estimada mediante la función *f*.

<i>Sistemas</i>	<i>21 días</i>		<i>360 días</i>	
	<i>D<sub>Promedio</sub></i>	<i>Varianza</i>	<i>D<sub>Promedio</sub></i>	<i>Varianza</i>
Control	0,38	0,51	0,39	0,51
API-2,5%	0,37	0,51	0,31	0,53
API-5%	0,38	0,50	0,34	0,54
API-10%	0,39	0,50	0,36	0,52

La Tabla VI-19 muestra que los valores del índice de  $D_{Promedio}$  calculados son semejantes entre sí, como también sus varianzas. No hay diferencia significativa entre los índices y sus varianzas al nivel de significación del 0,05.

Los índices de Diversidad promedio así obtenidos son relativamente bajos y con una moderada varianza. Pudiendo inferirse que las poblaciones Gram-negativas de los sistemas están constituidas por un relativamente bajo número de biotipos diferentes, medianamente relacionados.

De acuerdo con estos resultados, puede asumirse que:

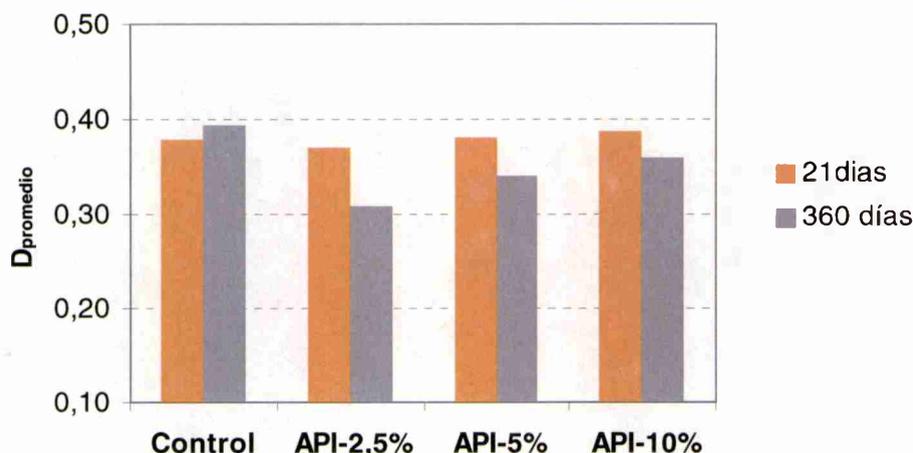
La incorporación del residuo no modifica significativamente la diversidad de esta población en el suelo, dentro del rango de concentraciones estudiadas.

La proceso de biorremediación no produce cambios significativos en la diversidad de las poblaciones Gram-negativas de los sistemas contaminados.

La diversidad de la población Gram-negativa del sistema Control no se ve modificada significativamente durante el año de tratamiento.

La Figura VI-17 muestra la representación gráfica de los valores del Índice de  $D_{promedio}$  para cada sistema de suelo al inicio y al final del tratamiento. En ella se observa que los índices de los sistemas contaminados en la etapa temprana del tratamiento son próximos al valor estimado en el suelo Control.

A pesar de demostrarse que las diferencias entre los índices no son significativas, existe una tendencia hacia valores menores como consecuencia del proceso de biorremediación en todos los sistemas. También se observa que esta diferencia disminuye al aumentar la concentración inicial del contaminante.



**Figura VI-17:** Comparación entre los Índices  $D_{\text{normalizados}}$  del Control y sistemas contaminados, en la población Gram-negativa, luego del tratamiento.

Estos resultados indican que el establecimiento de las poblaciones activamente degradadoras en la etapa temprana del tratamiento (21 días) no se vería acompañado de un cambio significativo en el índice de Diversidad, si se compara con el suelo Control.

El efecto producido por el acondicionamiento del sistema Control (conservación de la humedad, temperatura y aireado) permitiendo la biodisponibilidad de sus propios sustratos, promueve una selección sobre las bacterias Gram-negativa del suelo semejante a la producida por el residuo. De lo que se infiere que, el residuo ha producido un cambio cuantitativo, aumentando significativamente el tamaño de las poblaciones cultivables del suelo, más que un cambio cualitativo en las propiedades de sus integrantes.

Independientemente de la concentración aplicada, la presión de selección del residuo sobre la fracción cultivable del suelo estimula el desarrollo de una población Gram-negativa con capacidades metabólicas muy semejantes.

Al igual que en suelo limpio, los sistemas contaminados han permitido una mayor adaptación de las diferentes especies ante la presencia de la mezcla de sustratos incorporada. Este comportamiento es característico de los sistemas biológicamente controlados (Atlas y Bartha, 1998). Situaciones comparables han sido observadas en pozos de agua contaminada donde altos valores de recuentos de coliformes correlacionaron con altos valores en el índice de diversidad (Kuhn y col., 1991).

Al finalizar el tratamiento, las poblaciones BH permanecen significativamente aumentadas respecto del Control en los sistemas API-5% y API-10%, pero no en el API-2,5%.

En todos los sistemas se evidencia una reducción en el Índice de  $D_{\text{promedio}}$  respecto del Control.

Esta reducción en la diversidad de la población Gram-negativa se ve acompañada de una significativa disminución en la concentración compuestos asimilables (FEE y HTCG) al finalizar el tratamiento.

Dicho comportamiento puede ser atribuido a la presencia de los productos de degradación y/o aumento relativo de sustratos difícilmente degradables que producen una selección de microorganismos en la comunidad, producto de la reducción en el desarrollo de las interacciones entre especies y pérdida de ciertos biotipos dentro de la población Gram-negativa. Este efecto se vería acentuado en una población de menor tamaño como la determinada en el sistema API-2,5%.

El análisis de los cambios en los índices de diversidad de las poblaciones Gram-negativas permitió evaluar una tendencia hacia la disminución de la diversidad bacteriana como consecuencia del proceso de biorremediación, en una pequeña pero relevante población de la comunidad microbiana del suelo.

Un mayor número y/o tipo de pruebas empleadas en la determinación del perfil metabólico de los cultivos, respecto del API-20 ne, probablemente permita apreciar diferencias significativas entre la diversidad bacteriana cultivable de los diferentes sistemas en función del aumento de la concentración de residuo o del tiempo de tratamiento.

#### **VI.1.1.f Determinación de la capacidad degradadora de hidrocarburos de las poblaciones BH y BDHC.**

Con la intención de evaluar la influencia de la concentración del residuo y del tratamiento sobre el potencial degradador de hidrocarburos de las poblaciones dominantes, se determina la capacidad degradadora de hidrocarburos de los cultivos predominantes de la población BH y BDHC de los sistemas a los 21 días y a los 360 días de tratamiento.

Se ensaya la capacidad de degradar hidrocarburos del grupo alifático representado por: n-tetradecano, n-hexadecano, n-octadecano, n-eicosano y n-tetracosano en medio mineral líquido como única fuente de carbono y energía.

Debido a la composición aromática del residuo se evalúa la capacidad de degradar los siguientes PAH: naftaleno, fenantreno, dibenzotiofeno, fluoreno y pireno en medio mineral líquido como única fuente de carbono y energía.

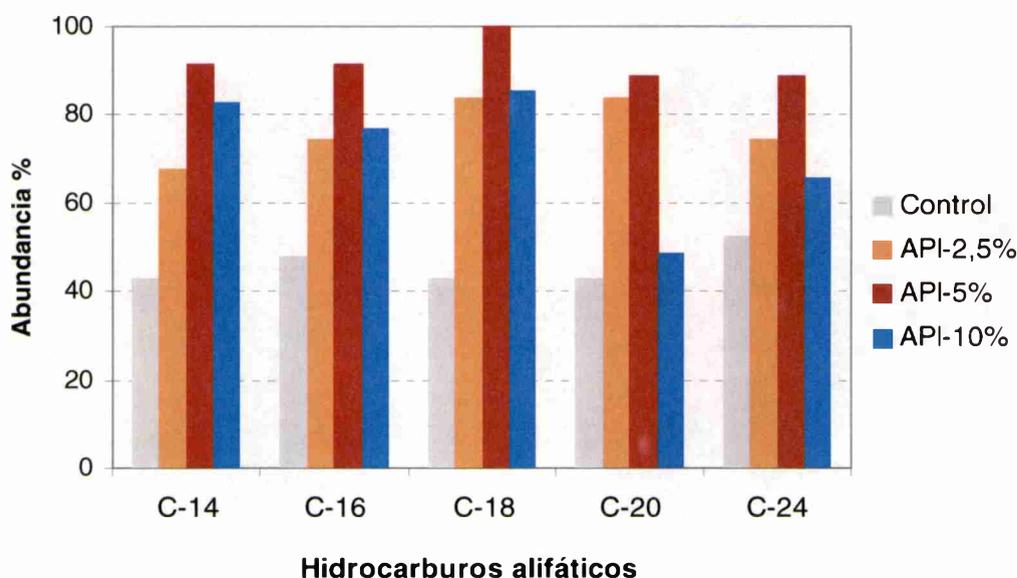
♦ **Cultivos degradadores de hidrocarburos alifáticos a los 21 días de tratamiento.**

La Figura VI-18 muestra la abundancia de cultivos degradadores de hidrocarburos alifáticos del sistema Control, API-2,5%, API-5% y API-10%.

Se muestra la abundancia de cultivos degradadores en ambas poblaciones BH y BDHC, debido a que en este período toda la población heterótrofa es degradadora de la fracción hidrocarburo del residuo.

En ella puede observarse que:

- ◆ El residuo produce un aumento en la abundancia de cultivos degradadores de hidrocarburos alifáticos respecto del suelo Control.
- ◆ Se observa que el aumento de la concentración de residuo aplicado produce un aumento en la abundancia de cultivos degradadores hasta el 5%.



**Figura VI-18:** Abundancia de cultivos degradadores de hidrocarburos alifáticos en la población bacteriana dominante de los sistemas API-2,5%, API-5% y API-10% en comparación con los del sistema Control a los 21 días de tratamiento.

♦ **Cultivos degradadores de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) a los 21 días de tratamiento.**

Las Tablas VI-21, VI-22 y VI-23 presentan los perfiles de degradación de PAH de los cultivos dominantes de los sistemas de tierra a los 21 días de tratamiento.

A partir de los cultivos aislados del sistema Control no se detecta la capacidad degradadora de PAH como única fuente de Carbono y energía.

La abundancia de cultivos degradadores de PAH es aproximadamente la misma en todos los sistemas contaminados, no observando relación con la concentración.

En el sistema API-5% se detectan cultivos degradadores de dibenzotiofeno y fenantreno.

Mientras que los dominantes en el sistema API-10% degradan principalmente fenantreno.

En los casos donde fueron obtenidos cultivos degradadores de PAH a partir de la población BDHC, éstos mostraron principalmente capacidad de degradar naftaleno.

**Tabla VI-21:** Cultivos aislados del sistema API-2,5% a los 21 días de tratamiento que muestran la capacidad de degradar al menos un PAH (Nro. total de cultivos:31)

Cultivo	Naftaleno	Bifenilo	Fluoreno	Dibenzotiofeno	Fenantreno	Pireno
BH	-	-	+	+	-	+
BH	-	-	-	-	+	-
BH	+	-	-	-	-	-
BH	-	+	+	-	+	-
BH	-	-	-	-	+	-
BH	-	-	-	-	+	-
BH	+	-	-	-	-	-
BH	-	-	+	-	-	-
BH	-	-	-	-	+	-
BH	-	-	-	-	+	-
BDHC	+	-	-	+	-	-
BDHC	+	-	-	-	+	-
BDHC	+	-	-	-	-	-

**Tabla VI-22:** Cultivos predominantes del sistema API-5% a los 21 días de tratamiento que muestran la capacidad de degradar al menos un PAH. (Nro. total de cultivos:35).

Cultivo	Naftaleno	Bifenilo	Fluoreno	Dibenzotiofeno	Fenantreno	Pireno
BH	-	-	-	+	+	+
BH	-	+	-	+	+	-
BH	-	+	-	+	+	-
BH	-	-	-	+	+	-
BH	-	-	-	+	+	-
BH	-	-	+	+	+	-
BH	-	-	-	-	+	-
BH	-	-	-	-	+	-
BH	-	+	-	+	+	-
BH	-	-	-	-	+	-

**Tabla VI-23:** Cultivos predominantes del sistema API-10% a los 21 días de tratamiento que muestran la capacidad de degradar al menos un PAH. (Nro. total de cultivos:35)

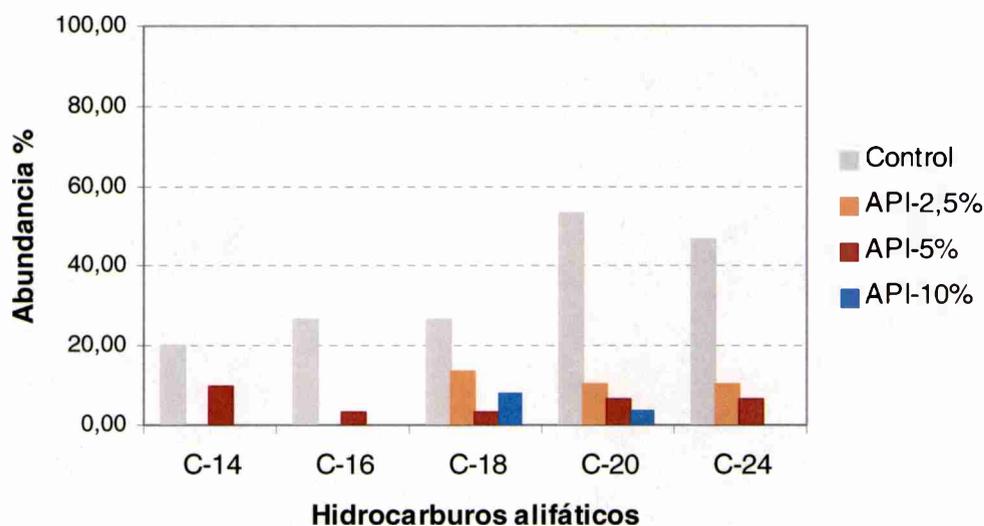
<i>Cultivo</i>	<i>Naftaleno</i>	<i>Bifenilo</i>	<i>Fluoreno</i>	<i>Dibenzotiofeno</i>	<i>Fenantreno</i>	<i>Pireno</i>
BH	-	-	-	-	+	-
BH	-	-	-	-	+	-
BH	-	-	-	-	+	-
BH	-	-	-	-	+	-
BH	-	-	-	-	+	-
BH	-	-	-	-	+	-
BH	-	-	-	-	+	-
BH	-	-	-	-	+	-
BH	-	-	-	-	+	-
BH	-	-	-	-	+	-
BH	-	+	-	-	+	-
BDHC	+	-	-	-	-	-
BDHC	+	-	-	+	-	-
BDHC	+	-	-	-	+	-

En la etapa inicial del tratamiento (21 días), las poblaciones bacterianas BH y BDHC han alcanzado sus valores máximos de recuento y son activamente degradadoras de hidrocarburos. Estas poblaciones se han enriquecido en cultivos capaces de degradar hidrocarburos alifáticos en cultivo puro como única fuente de carbono y energía.

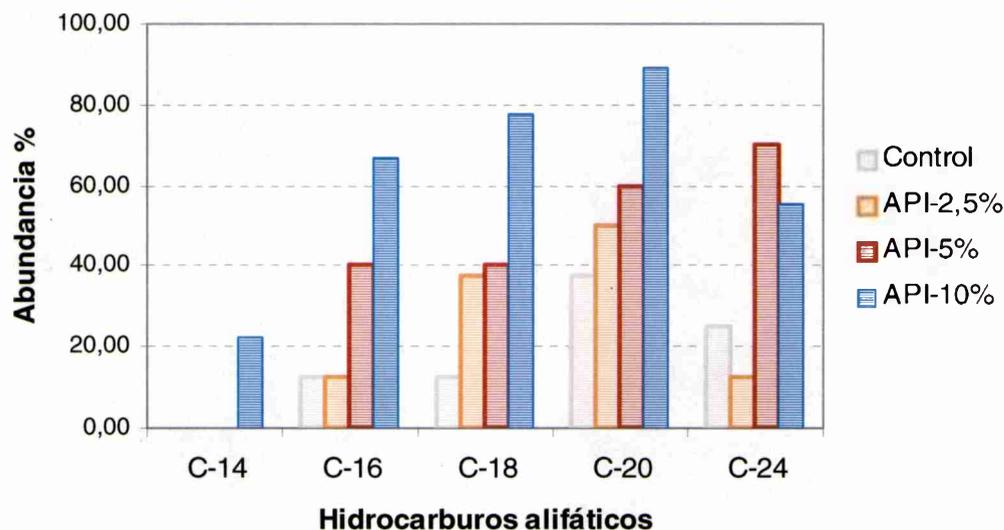
Respecto de las poblaciones degradadoras de PAH (BD-F, BD-DBT y BD-MIX), en este período se encuentran próximas a sus valores máximos, aumentando la probabilidad de detección de cultivos con capacidad de degradar PAH como única fuente de carbono y energía. Se observa que la abundancia de cultivos degradadores de PAH no muestra variación con la concentración de residuo. Puede apreciarse que, la abundancia de cultivos degradadores de fenantreno aislados, refleja la mayor concentración de este PAH en el residuo API.

♦ **Cultivos degradadores de hidrocarburos alifáticos a los 360 días de tratamiento.**

Las Figuras VI-19 y VI-20 muestran la abundancia de cultivos capaces de degradar hidrocarburos alifáticos aislados de las poblaciones BH y BDHC respectivamente, de los sistemas Control y contaminados luego de un año de tratamiento.



**Figura VI-19:** Capacidad degradadora de hidrocarburos alifáticos de los cultivos representativos de la población BH de los sistemas API-2,5%, API-5% y API-10% establecida a los 360 días de tratamiento, en comparación con los del sistema Control.



**Figura VI-20:** Capacidad degradadora de hidrocarburos alifáticos de los cultivos representativos de la población BDHC establecida en los sistemas contaminados y en el sistema Control a los 360 días de tratamiento.

En ellas puede observarse que:

- ⊕ En todos los sistemas contaminados se establece una población BH cuyos miembros dominantes tienen una capacidad de degradar hidrocarburos alifáticos notablemente

disminuida respecto del Control y de la dominante en los sistemas contaminados durante la etapa temprana del proceso (21 días).

- ⊕ Los cultivos aislados de la población BDHC muestran una capacidad hidrocarburofítica significativamente superior a la del Control y proporcional a la concentración de residuo aplicada hasta C20, con una tendencia hacia la degradación de hidrocarburos de cadena larga.

♦ **Cultivos degradadores de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) a los 360 días de tratamiento.**

Las Tablas VI-24; VI-25 y VI-26 presentan los espectros de degradación de PAH de los cultivos aislados de los sistemas al año de tratamiento.

**Tabla VI-24:** Cultivos predominantes del sistema API-2,5% al año de tratamiento que muestran la capacidad de degradar al menos un PAH. Todos los cultivos pertenecen a la población BH. (Nro. total de cultivos:29)

Cultivo	<i>Naftaleno</i>	<i>Bifenilo</i>	<i>Fluoreno</i>	<i>Dibenzotiofeno</i>	<i>Fenantreno</i>	<i>Pireno</i>
BH	+	-	-	-	-	-
BH	+	-	-	-	-	-
BH	+	-	-	-	-	-
BH	+	-	-	-	-	-
BH	+	-	-	-	-	-

**Tabla VI-25:** Cultivos predominantes del sistema API-5% al año de tratamiento que muestran la capacidad de degradar al menos un PAH. Todos los cultivos pertenecen a la población BH. (Nro. total de cultivos:31).

Cultivo	<i>Naftaleno</i>	<i>Bifenilo</i>	<i>Fluoreno</i>	<i>Dibenzotiofeno</i>	<i>Fenantreno</i>	<i>Pireno</i>
BH	-	-	+	-	-	-
BH	-	-	-	-	+	-
BH	-	-	-	-	+	+

**Tabla VI-26:** Cultivos predominantes del sistema API-10% al año de tratamiento que muestran la capacidad de degradar al menos un PAH. Todos los cultivos pertenecen a la población BH. (Nro. total de cultivos:25).

Cultivo	<i>Naftaleno</i>	<i>Bifenilo</i>	<i>Fluoreno</i>	<i>Dibenzotiofeno</i>	<i>Fenantreno</i>	<i>Pireno</i>
BH	+	-	-	-	-	-
BH	+	-	-	-	-	-
BH	+	-	-	+	-	-
BH	+	-	-	-	-	-
BH	-	+	-	-	-	-
BH	+	-	-	-	-	-
BH	+	-	-	-	-	-
BH	+	-	-	-	-	-
BH	+	-	-	-	-	-

En ellas puede apreciarse que:

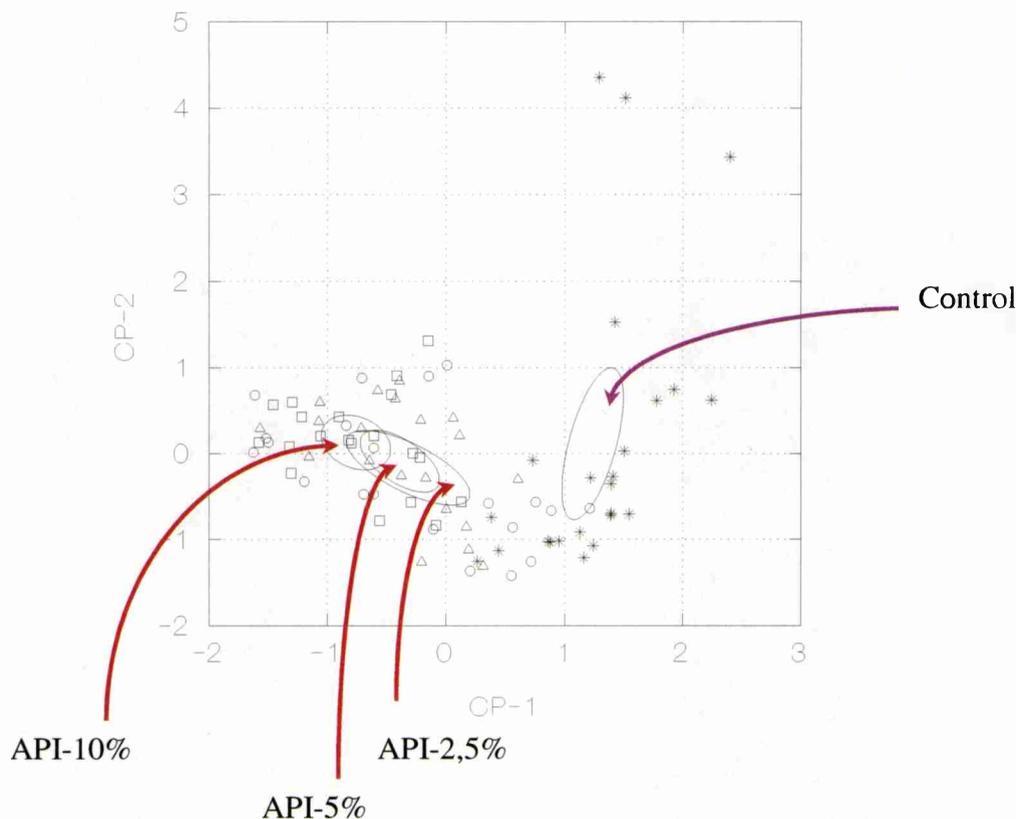
- ⊕ No se detectan cultivos degradadores de PAH a partir de las poblaciones BH y BDHC en el Control.
- ⊕ Se observa un marcado descenso en el número de cultivos con la capacidad de degradar algún PAH y no se evidencia relación con concentración inicial de residuo. Los cultivos son principalmente degradadores de naftaleno.

Con la finalidad de evaluar la influencia de la propiedad degradadora de hidrocarburos sobre las poblaciones al finalizar el tratamiento, se aplica nuevamente el PCA al conjunto de cultivos Gram-negativos de los sistemas contaminados en comparación con el sistema Control incluyendo en las variables la capacidad de degradar cada hidrocarburo alifático probado.

La Figura VI-21 muestra el resultado del análisis, los dos primeros componentes explican el 38% de la variación total de los datos. El CP-1 (20% de la variación total explicada) queda representado por la capacidad de asimilar gluconato, caprato, adipato, malato, citrato, fenilacetato y n-eicosano (20C). El CP-2 (18% de la variación total explicada) representa la capacidad de asimilar manitol, maltosa, n-hexadecano (16C) y n-tetracosano (24C).

Se observa el desplazamiento de las elipses de los sistemas contaminados hacia la zona de correlación negativa del CP-1, separándose del sistema Control.

La interpretación de este análisis indicaría una mayor semejanza en las propiedades de los sistemas contaminados al finalizar el tratamiento y una mayor diferencia de sus capacidades metabólicas, al compararlos con el Control.



**Figura VI-21:** Relación entre las poblaciones Gram-negativas representativas de los sistemas API-2,5%; API-5%; API-10% y el sistema Control a los 360 días del tratamiento, aplicando el análisis de los Componentes Principales. Las variables analizadas son las del sistema API-20ne más los 5 n-alcenos. Las elipses representan el porcentaje bivariado del valor medio de la muestra (centroide) con un 95% de confianza. Referencias: Sistema Control; ○ sistema API-2,5%; △ sistema API-5% y □ sistema API-10%.

En la etapa final del tratamiento, cuando la concentración de HCGC ha descendido significativamente, ha sido comprobado el descenso de las poblaciones BDHC en todos los sistemas y que las poblaciones BH de los sistemas API-5% y API-10% se encuentran significativamente aumentadas respecto del Control .

Al determinar la capacidad degradadora individual de los cultivos dominantes de la población BH, se verifica un marcado descenso en la capacidad de degradar hidrocarburos alifáticos de cadena media, Figura VI-19 .

El reemplazo de la población primaria de estrategias-r por la población tardía de estrategias-k pondría en evidencia una selección microorganismos que han perdido la capacidad de degradar hidrocarburos alifáticos, respecto del suelo sin contaminar. Entonces, la disminución de la capacidad de degradar hidrocarburos simples es otra propiedad que demuestra que el

tratamiento de un año no permite la recuperación de las propiedades metabólicas individuales que las poblaciones bacterianas del suelo poseían antes de la contaminación. Y que esta marcada selección en las poblaciones es independiente de la contaminación inicial.

Por otra parte, la relativa abundancia de cultivos dominantes capaces de degradar hidrocarburos alifáticos en la población BDHC puede ser efecto del método de recuento utilizado. La técnica del NMP utilizando la fracción extractable del residuo como fuente de C y energía, produciría el enriquecimiento durante la incubación, de una población degradadora de los hidrocarburos fácilmente asimilables del residuo. Entonces, a partir de los recuento se favorecería la recuperación de los cultivos degradadores de alifáticos.

Al finalizar el tratamiento, la concentración de los PAH individuales estudiados en los sistemas contaminados resulta en su mayoría no detectable por cromatografía gaseosa. Lo cual podría explicar el marcado descenso en la capacidad degradadora de estos hidrocarburos en los cultivos aislados.

Sin embargo, como se observó durante la dinámica de las poblaciones degradadoras de PAH, Figuras V-13 y V-14, los recuentos de las poblaciones BD-F, BD-DBT y BD-MIX se encuentran significativamente aumentados en la etapa final, respecto del sistema Control.

Una posible explicación de la aumentada densidad de poblaciones degradadoras de PAH con la ausencia de aislamientos degradadores de PAH en cultivo puro, se fundamentaría en la posibilidad de degradar el PAH a partir de consorcios bacterianos.

Los miembros de estas asociaciones compartirían sus capacidades individuales, por ejemplo contribuyendo cada uno con sus enzimas para completar la ruta metabólica de la degradación del PAH.

Los perfiles de utilización de sustratos de los individuos de una comunidad no reflejan, necesariamente la capacidad funcional de la comunidad microbiana in situ.

Sin embargo, dependiendo de la abundancia de determinados cultivos, los cambios en sus perfiles podrían ser indicadores de cierto tipo de alteración funcional de la comunidad.

Witter y col., 2000, en un estudio sobre los cambios en la estructura de comunidades por efecto de una contaminación con barros con alto contenido en metales pesados, concluyen que aún cuando se determinan los perfiles de utilización de sustratos de comunidades (CLPP) es difícil establecer su relación con la capacidad funcional de la comunidad microbiana del suelo.

Sin embargo, los indicadores de los cambios en la estructura de la comunidad, deben ser tenidos en cuenta, sobre todo si existen razones para creer pueden ser permanentes, como es el caso de una contaminación con metales pesados (Witter y col., 2000).

En este trabajo, la contaminación con hidrocarburos con alto contenido en PAH, y la aparición de productos de transformación durante el tratamiento, han ejercido una presión de selección a

largo plazo (1 año), conduciendo al establecimiento de cultivos con reducida capacidad de asimilación de sustratos simples.

El período de retraso (1 año) detectado en la actividad deshidrogenasa de sistemas contaminados hasta el 5%, la mayor actividad encontrada al 10% y la actividad genotóxica residual observada en todos los sistemas, podrían ser la expresión de los cambios producidos en la estructura de la fracción cultivable de la comunidad del suelo por la contaminación con el residuo API.

### **VI.1.2 ESTRATEGIA BASADA EN EL ANÁLISIS DIRECTO DE LA COMUNIDAD MICROBIANA.**

Cuando se analizó la actividad funcional de las comunidades, a través de la actividad de hidrolasas, se observó que todos los sistemas habían evolucionado en forma semejante, recuperando finalmente la capacidad funcional del suelo limpio. En cambio, el análisis a través de la actividad de deshidrogenasas, demostró que las comunidades respondían en forma diferente dependiendo de la concentración, particularmente en el sistema API-10% se había establecido una comunidad funcionalmente más activa que la del suelo no contaminado.

El estudio de las comunidades a través de los perfiles metabólicos de sus cultivos predominantes, ha indicado que el proceso de biorremediación conduce al establecimiento de comunidades cultivables diferentes de la dominante del suelo limpio, en el rango de concentraciones del 2,5% al 10% de residuo aplicado..

Si bien el sistema menos contaminado había demostrado una considerable recuperación en géneros dominantes del suelo limpio, el análisis de las capacidades metabólicas de los miembros de la población Gram-negativa, demuestra la pérdida de determinadas capacidades, seleccionando poblaciones semejantes a las establecidas en los sistemas más contaminados.

Considerando que, los perfiles metabólicos fueron determinados sobre la fracción cultivable del sistema, que representa entre el 1-10% de la población total, podría inferirse que la pérdida de determinadas capacidades funcionales determinadas en los cultivos dominantes puede haber sido retenida en la fracción no cultivable de la comunidad (Witter y col., 2000).

Con el objetivo de ampliar "la ventana de observación" de la estructura de las comunidades evitando las limitaciones de las técnicas de cultivo, se realiza el análisis directo de la comunidad a través del estudio de sus macromoléculas.

Entre las numerosas metodologías cultivo-independiente basadas en el estudio del DNA una de las más utilizadas es la determinación de perfiles de ácidos nucleicos.

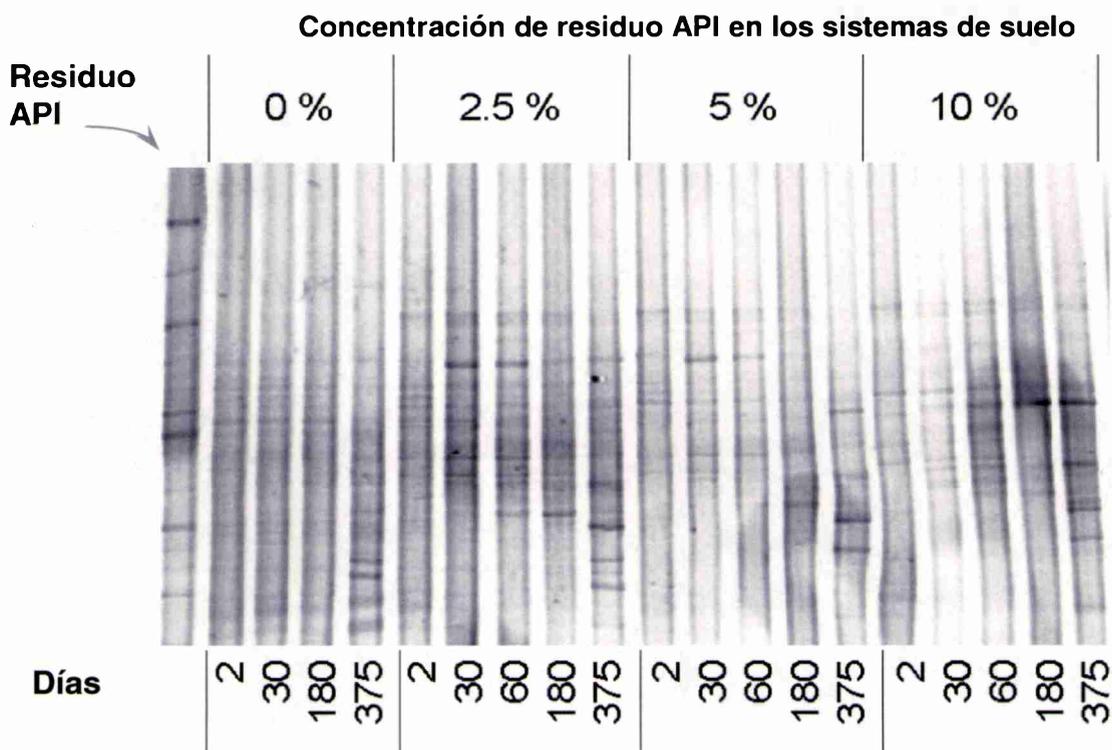


A continuación se muestran los resultados de la técnica PCR-DGGE sobre extractos purificados de DNA obtenidos directamente de las muestras de suelo, en distintos momentos durante el proceso de biorremediación.

**VI.1.2.a Determinación del perfil de ácidos nucleicos de la comunidad.**

El procedimiento se basa la amplificación de los fragmentos de 16S-rRNA bacteriano mediante PCR, seguido de la electroforesis de los productos de la amplificación en geles de poliacrilamida conteniendo un gradiente desnaturante linealmente incrementado (Muyzer y col., 1998). Con esta técnica los fragmentos de igual longitud pero con diferente secuencia de bases pueden ser separados generando un perfil de bandas de las poblaciones dominantes de la comunidad.

La Figura VI-22 muestra los perfiles de bandas obtenidos mediante la DGGE, a partir de los productos de amplificación de PCR representativos de cada sistema en los diferentes tiempos de muestreo, durante el tratamiento.



**Figura VI-22:** Perfiles de PCR-DGGE de los sistemas de suelo 2,5%-API; 5%-API y 10%-API durante el tratamiento y el perfil de la comunidad bacteriana del residuo API.

La Figura también muestra el perfil representativo de la comunidad analizada directamente del residuo API.

El cambio observado entre los perfiles de bandas, indica los cambios producidos en la comunidad del suelo en respuesta a la contaminación con el residuo API.

La dinámica de las comunidades durante el tratamiento se ve reflejada en la secuencia de aparición y desaparición de bandas de los perfiles obtenidos en cada tiempo de muestreo.

Como puede apreciarse en la Figura VI-22, las principales bandas del perfil correspondiente al residuo API no aparecen en los perfiles representativos de los sistemas contaminados.

Este resultado estaría indicando que los microorganismos introducidos con el residuo API no han logrado establecerse en el sistema, como poblaciones dominantes. Probablemente, el bajo número de bacterias aportados por gramo de barro ( $1.10^4 - 1.10^5$  UFC/g) no es un tamaño de inóculo suficiente para competir y lograr establecerse en la comunidad del suelo. En consecuencia, los perfiles de los sistemas contaminados están reflejando el efecto de selección provocado por los constituyentes del residuo sobre la comunidad microbiana autóctona del suelo.

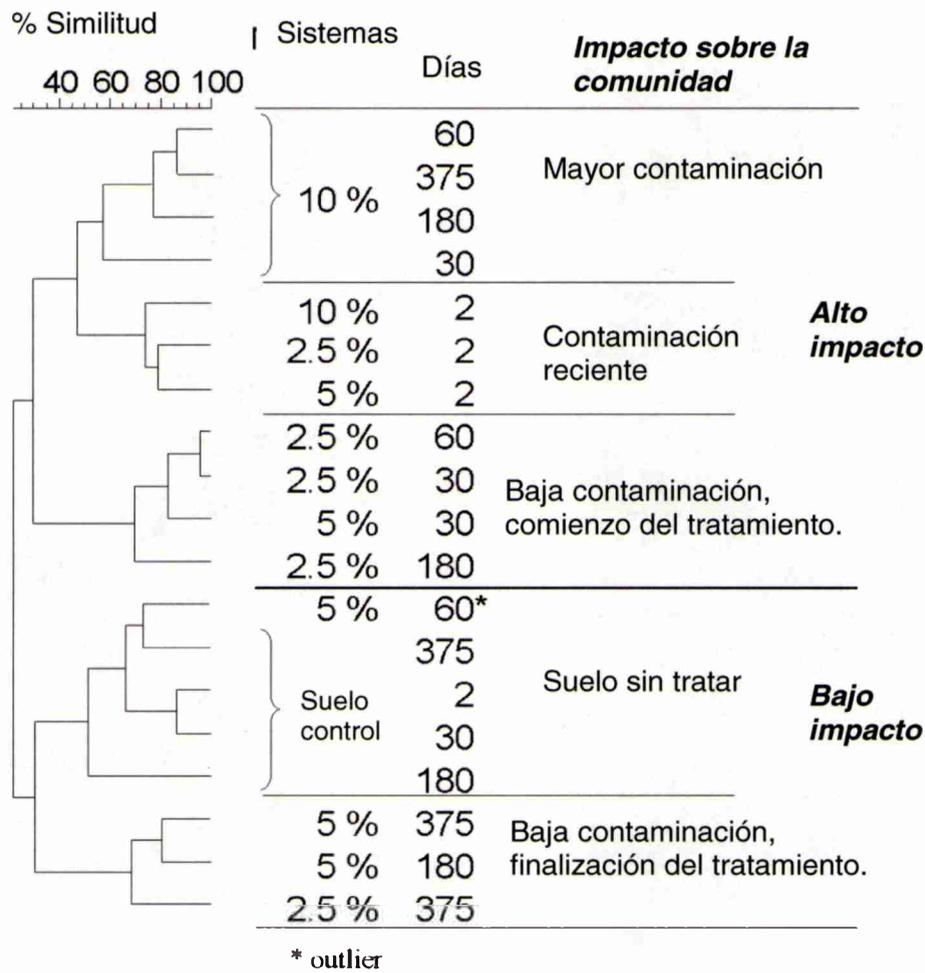
Con la intención de realizar un análisis cuantitativo entre las bandas, se procede digitalizando el gel y determinando la posición e intensidad de cada banda.

La curva densitométrica resultante es utilizada como base de datos para calcular la matriz de similitud y el dendrograma correspondiente, que permite la comparación entre los perfiles de bandas.

La Figura VI-23 muestra al dendrograma del análisis de clusters, en ella se aprecia la formación de dos clusters principales en función de la concentración de HT-GC.

Un gran cluster incluye los perfiles de los sistemas recientemente contaminados (día 2), los contaminados con 2,5% y 5% de residuo hasta los 60 días y los perfiles del sistema con 10% de residuo durante todo el año de tratamiento.

Los perfiles incluidos en este primer cluster describen la estructura de la comunidad microbiana de los sistemas durante el período de eliminación de hidrocarburos con mayor velocidad de degradación coincidente con el establecimiento de una población bacteriana activamente degradadora de hidrocarburos (Figura VI-2).



**Figura VI-23:** Dendrograma del análisis de cluster de los perfiles de DGGE calculado utilizando la correlación de Pearson y UPGMA. El perfil de suelo con 5% de API luego de 60 días de tratamiento se señala como un outlier (\*) (comportamiento diferente).

El segundo cluster incluye los perfiles de los sistemas de suelo Control y de los sistemas contaminados con 2,5% y 5% de residuo entre los 60 y 360 días de tratamiento. Durante este período, la velocidad de eliminación de hidrocarburos es más lenta (Figura V-6), y la población degradadora de hidrocarburos disminuye considerablemente (Figura VI-2). Considerando el efecto que produce la contaminación con el residuo API y el tratamiento sobre las comunidades bacterianas, durante el proceso de biorremediación, podríamos referirnos al primer cluster como de Alto impacto (Ai) y al segundo como de Bajo impacto (Bi).

Al analizar el cluster Ai se observa que:

- \* El residuo produce un efecto inmediato sobre la comunidad del suelo. El cambio conduce a la aparición de comunidades semejantes en los tres sistemas y muy diferentes de la del suelo original.
- \* Durante la etapa temprana del tratamiento y en función de la concentración de residuo, se detectan significativos cambios en la estructura de las comunidades. Esto conduce a la formación de dos diferentes sub-clusters, uno correspondiente a los sistemas API-2,5% y API-5% en la etapa temprana del tratamiento, y el otro correspondiente al sistema API-10% durante todo el período de tratamiento.
- \* La formación del sub-cluster del sistema API-10% indica que la comunidad ha manifestado un significativo cambio en la estructura, que permanece luego del año de tratamiento.

Al analizar el cluster Bi se observa que:

- \* Este cluster está formado por dos sub-clusters. Uno incluye las muestras del sistema Control, donde no se detectan cambios significativos en la comunidad microbiana del suelo durante el año de tratamiento.
- \* Otro sub-cluster incluye los perfiles de suelo correspondientes a los sistemas API-2,5% y API-5% en la etapa final del tratamiento.

A partir de estas observaciones puede interpretarse que la contaminación con API produce un cambio rápido en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo. Estas nuevas comunidades van variando su estructura durante el tratamiento, en función de la concentración inicial del contaminante.

Las comunidades de los sistemas API-2,5% y API-5% se estabilizan alrededor de los 180 días con una comunidad relativamente más diversa.

Estas comunidades forman un sub-cluster y junto con el sub-cluster del sistema Control, constituyen el cluster Bi, de lo que puede inferirse que la comunidad autóctona del suelo ha sido considerablemente recuperada.

Contrariamente, el sistema API-10% mantiene una estructura de comunidad significativamente diferente del suelo Control, indicando que el tratamiento de un año no ha logrado la recuperación de las características originales del suelo.

El número e intensidad de bandas por perfil ha dificultado la determinación del número y abundancia de cada especie dentro de la comunidad, debido a las limitaciones propias de la técnica PCR (von Wintzingerode y col. 1997; Suzuki y Giovannoni, 1996).

Por otra parte, una de las limitaciones propias de la DGGE es la capacidad de poner en evidencia solo aquellos grupos bacterianos cuya abundancia represente entre el 1-10% de las especies detectadas (Murray y col.1996)

#### **VI.1.2.b Detección de grupos bacterianos metabólicamente activos durante el tratamiento, mediante la técnica de hibridización *in situ*.**

Otra manera de evaluar los cambios en la estructura de las comunidades por técnicas independientes del cultivo es la hibridización de las células bacterianas directamente en la muestra de tierra del sistema, con sondas de oligonucleótidos marcadas con colorante fluorescentes, dirigidas al 16S y 23S rRNA.

Básicamente, una suspensión de suelo es fijada en paraformaldehído sobre un portaobjeto y posteriormente deshidratada. Luego el preparado es incubado con la sonda de oligonucleótido dirigida al rRNA, marcada con un colorante fluorescente y observado con microscopio de epifluorescencia (Amann, 1995).

De esta manera podría estimarse la abundancia de cada grupo bacteriano, en respuesta a la contaminación y el tratamiento, contando aquellas células fluorescentes por la hibridización con la sonda específica marcada.

Teniendo en cuenta la complejidad del sistema tierra-residuo y las limitaciones propias del método, principalmente el efectivo acceso de las sondas al sitio blanco, se plantean una serie de experimentos con el objetivo de mejorar la posibilidad de detección de los grupos bacterianos relevantes.

**Experimento-1:** Hibridación sobre muestras de los sistemas contaminados a los 21 días del tratamiento.

Se analiza el sistema de mayor contaminación API-10%, aplicando el protocolo de Bruns y Berthe-Corti, 1998. Se determina por epifluorescencia un recuento de bacterias totales de 5,0.108 /g tierra seca y no se observa hibridización con la sonda específica de eubacteriales, EUB.338.

**Experimento-2:** Activación de los sistemas previamente a la hibridización *in situ*.

Debido a la imposibilidad de detectar bacterias metabólicamente activas con la sonda EUB.338 bajo las condiciones del protocolo, se intenta una activación previa de la comunidad microbiana. Con tal fin se agregan al sistema sustratos fácilmente asimilables que podrían activar metabólicamente a las células. De esta forma, aumentando el número de copias del

rRNA aumentaría la probabilidad de hibridación entre las sondas de oligonucleótido marcado con los sitios blancos en el rRNA de las diferentes poblaciones.

Se evalúa la activación utilizando caldo R3 y el residuo API, en dos experimentos independientes.

1. Sobre el sistema API-10%: agregado de caldo R3 al 1%, incubando luego a 30°C durante 24hs (Hahn y col., 1992).
2. Sobre los sistemas API-2,5%; API-5% y API-10%: agregado de residuo API al 1%, con una posterior incubación de 4 días a 25°C.

Para favorecer el acceso de las sondas a través de la pared celular, la muestra es fijada previamente en una solución de paraformaldehído y conservada durante 1 hora en una mezcla 1:1 de buffer fosfato y etanol 96% a -20°C, de acuerdo con el protocolo de Amann, 1995.

Transcurrido el tiempo de incubación se realiza la hibridación bajo las mismas condiciones.

Luego de la observación microscópica se estima que de la población total detectada mediante la coloración con DAPI, entre el 1 al 5% de las células son detectadas mediante la sonda EUB.338, en ambos experimentos de activación, con caldo R3 o con residuo API.

Experimento-3: Sensibilización previa de las células con ácido acético y posterior hibridación *in situ*.

Otra causa posible del bajo porcentaje de detección de eubacteriales podría ser la dificultad de acceso la sonda a través de las envolturas celulares, impidiéndole la llegada al sitio blanco en el rRNA. Con el objetivo de disminuir la aparente resistencia se repite la hibridación previo tratamiento de sensibilización con ácido acético.

El tratamiento de sensibilización de la cubierta celular se realiza sobre la muestra del sistema API-5%, aplicando diferentes concentraciones de ácido acético: 1, 5, 10 y 20% (v/v).

La Tabla VI-27 muestra en forma comparativa los resultados obtenidos en los distintos experimentos de hibridación *in situ* sobre muestras de tierra de los sistemas API.

Los experimentos de hibridación tratando previamente los sistemas con algún nutriente que produzca la activación de las células, logran detectar células mediante la sonda EUB.338. El mismo efecto se logra al sensibilizar previamente la muestra con ácido acético (20%).

**Tabla VI-27** : Resultados de la aplicación de la técnica de hibridación *in situ* en los sistemas de tierra- API bajo diferentes condiciones de activación.

Sistema	Condición	B. totales /g.t.	<i>B. viables</i>			
			<i>EUB.338</i> (%)	Grupo $\alpha$ - <i>Proteobacteria</i> (%)	Grupo $\beta$ - <i>Proteobacteria</i> (%)	Grupo $\gamma$ - <i>Proteobacteria</i> (%)
API-10%	25°C - 30 días	5,0.10 <sup>8</sup>	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado
API-10%	+ R3-caldo (30°C-24 hs)	5,0.10 <sup>8</sup>	1-5%	No detectado	Bacilos en cadena (*)	No detectado
API-2,5%	+ Residuo-1%	5,63.10 <sup>9</sup>	5%	No detectado	No detectado	No detectado
API-5%	(p/p)	5,76.10 <sup>9</sup>	5%	No detectado	No detectado	No detectado
API-10%	(25°C-4 días)	5,76.10 <sup>9</sup>	5%	No detectado	No detectado	No detectado
API-5%	+ Ac. Acético (20% v/v)	4,85.10 <sup>8</sup>	6%	No detectado	0,5%	No detectado

(\*) Se observó una cadena corta de bacilos en 5 campos.

La dificultad en la hibridación del rRNA puede ser atribuida a la imposibilidad de acceso de la sonda. Probablemente las células se encuentran rodeadas de alguna sustancia que impide la penetración de la sonda, y que el ácido diluido produciría la desestabilización de estas envolturas celulares en una pequeña proporción de la población.

Únicamente, bajo la condición de tratamiento con ác. acético, pudo detectarse hibridación con la sonda específica del grupo  $\beta$  -*Proteobacteria*, aunque en muy bajo porcentaje.

Experimento-4 : Detección mediante hibridación, de las células inoculadas en los sistemas de suelo contaminado.

El objetivo de este experimento es determinar si los componentes del sistema tierra-residuo pueden producir la inhibición de la hibridación.

El experimento se realiza sobre 1g de muestra del sistema API-5%, la cual es inoculada con 100 $\mu$ l de una suspensión de células desarrolladas en la superficie de R3-agar.

El inóculo es obtenido mediante la siembra de una suspensión de tierra en la superficie de una placa de R3-agar. Luego de la incubación de 4 días a 30°C las colonias son removidas de la superficie mediante el agregado de 1,5ml de buffer TE (10mM Tris ClH-1nM EDTA, [pH 8]) utilizando una espátula de Drigalski.

Luego de la inoculación, la muestra es incubada durante 1 hora a 5°C para permitir la unión de las células inoculadas a la superficie de las partículas del suelo. La hibridación se realiza según el protocolo de Bruns y Berthe-Corti.

El resultado demuestra un bajo porcentaje de células hibridizadas con la sonda EUB.338 y no se detectan células hibridizadas con las demás sondas específicas.

Paralelamente, la suspensión utilizada como inóculo, se diluye apropiadamente y se hibridiza para determinar el porcentaje de células activas e identificar los grupos bacterianos predominantes.

La observación microscópica de los preparados del cultivo utilizado como inoculante evidencia una fuerte señal con el oligonucleótido EUB.338, indicando un alto contenido de rRNA celular.

La mayoría (90%) de las células visibles con el colorante DAPI, es detectada por hibridación con la sonda EUB.338.

Aproximadamente entre el 15-20% de todas las células visibles con DAPI hibridizan con la sonda ALF1b, observándose grandes bacilos. Un porcentaje similar lo hace con la sonda BET42a, observándose pequeños bacilos. No se detecta hibridación al utilizar las restantes sondas.

Los resultados de los diferentes experimentos realizados sobre tierra de los sistemas contaminados evidencian que del gran número de pequeñas bacterias observadas por campo mediante la coloración con DAPI, la sonda universal EUB.338 produce muy bajo porcentaje de hibridación con las células bacterianas.

La baja hibridación podría atribuirse en parte, al insuficiente o inadecuado protocolo de permeabilización de las células dormantes, aunque también puede demostrar la falta de complementarización entre secuencias de bases de la sonda EUB.338 y los sitios blancos en el rRNA de las células que permanecen aún no detectadas.

Ha sido citado en bibliografía, Amann 1995, que en cultivos celulares en fase de crecimiento donde se presume un alto contenido en rRNA es posible detectar una baja señal en respuesta a la hibridación con oligonucleótidos específicos. Este comportamiento ha sido atribuido a la formación de estructuras de orden superior en los ribosomas, sea entre moléculas de rRNA o entre rRNA y proteínas, que en ambos casos impiden la hibridación.

Otra causa de la falta de señal puede atribuirse al comportamiento de los cultivos bacterianos desarrollando en un medio con hidrocarburos como fuente de carbono y energía. En este ambiente, los microorganismos producen frecuentemente sustancias tensioactivas que liberan a través de la pared celular, quedando acumuladas en el entorno celular. Estas sustancias facilitan la adhesión de células vecinas. De esta manera forman acúmulos celulares rodeados de una cubierta que actúa como un mecanismo de defensa celular, (Berthe-Corti, Comunicación personal).

La probabilidad de que esta cubierta se encuentre presente en las células de la comunidad de los sistemas contaminados, podría ser la causa de la disminuida permeabilidad celular que impide la entrada de las sondas de oligonucleótidos a la célula.

En el tratamiento del residuo API, se ha detectado el rápido desarrollo de las poblaciones del suelo ante la aplicación del residuo. En consecuencia, se esperaría una fuerte señal de la sonda de eubacteriales en la etapa temprana del tratamiento (21 días).

Asumiendo que esta fracción cultivable representa entre el 1-10% de la comunidad total del suelo, podría inferirse que únicamente las poblaciones cultivables pudieron ser detectadas por hibridización *in situ*.

Otras causas que pueden haber complicado el análisis incluyen la heterogeneidad y naturaleza dinámica de los ambientes, y el pequeño tamaño y discontinua distribución de los microhábitats en la matriz del suelo.

**CAPÍTULO VII**

**CONCLUSIONES**

---

## VII CONCLUSIONES

La biorremediación es una alternativa tecnológica capaz de lograr una remediación permanente de un sitio contaminado (Margesin y Schinner, 2001).

Si bien los microorganismos, a través del ciclo biogeoquímico de la materia, son los primariamente estimulados en la biorremediación de un contaminante ambiental, el conocimiento actual de los cambios en las comunidades microbianas durante la biorremediación es limitado (Watanabe y Baker, 2000; Iwamoto y Nasu, 2001).

Por esta razón, el estudio de la estructura y actividad de las comunidades del suelo son particularmente de interés, cuando se intenta aplicar una estrategia de biorremediación en suelo.

Retomando las preguntas planteadas en la Introducción del trabajo, respecto de la contribución biológica a la efectividad de la biorremediación y de si es posible evaluar el impacto ambiental del tratamiento, fue planteado un estudio polifásico donde fueron estudiadas, la composición, estructura y actividad enzimática de las comunidades bacterianas en sistemas de suelo contaminados con concentraciones crecientes del residuo petroquímico API, durante un año de tratamiento.

La caracterización microbiológica del residuo API determinó que:

- \* Posee una composición microbiana distribuida según proporciones equivalentes de población bacteriana aeróbica y población anaeróbica de bacterias sulfato-reductoras.
- \* La población bacteriana degradadora de hidrocarburos (BDHC) representó el 80% de la población bacteriana heterótrofa (BH), de lo que se infiere que la mayor parte de la población BH fue capaz de desarrollar a expensas de los hidrocarburos del residuo, indicando el grado de adaptación de las bacterias cultivables al residuo.
- \* Sus cultivos dominantes son Gram-negativos, capaces de degradar hidrocarburos alifáticos de cadena media y se distribuyen en forma proporcional en fermentadores y no-fermentadores. En este último el género *Pseudomonas* fue dominante.
- \* A pesar de haberse detectado grupos bacterianos cultivables, adaptados a las condiciones extremas del residuo, el análisis de la estructura de la comunidad bacteriana del barro a través de PCR-DGGE y su comparación con los perfiles de bandas de DNA correspondientes a las comunidades bacterianas durante el tratamiento, evidenció que los microorganismos del barro no logran establecerse en la comunidad del suelo luego de la aplicación. Probablemente debido a la relativamente menor población bacteriana del residuo, en comparación con la población bacteriana del suelo.

---

### Dinámica de las poblaciones cultivables y eliminación del contaminante.

---

*La cinética de eliminación del contaminante pudo ser descrita a través del modelo –3 (Vecchioli, 1998).*

- \* La cinética de la fracción extractable en éter (FEE) permitió estimar un porcentaje de eliminación de grasas y aceites, dependiente de la concentración aplicada, en un tiempo superior a los 100 días y hasta de 200 días, en el sistema más contaminado. Se estimó un porcentaje de eliminación entre el 31 y 47% dependiente de la concentración inicial.
- \* La cinética de la fracción de hidrocarburos totales cromatografiables (HTCG) permitió estimar un porcentaje de eliminación entre el 86%-95% en un periodo de 43 días en promedio, seguido de una etapa de muy lenta velocidad de eliminación del contenido de hidrocarburos. El porcentaje de eliminación de HTCG fue independiente de la concentración inicial de residuo aplicado.
- \* El tratamiento se consideró finalizado al determinarse una velocidad de eliminación del contaminante prácticamente nula, dejando un nivel residual de HTCG y FEE proporcional a la concentración aplicada del residuo y una concentración de PAH individuales no detectables en su mayoría. Según la Ley N° 24.051/92 (decreto reglamentario 831/93), la tierra de los sistemas corresponde a la categoría de suelo industrial.

*El proceso de biorremediación del residuo API en todas las concentraciones estudiadas produjo una variación en la dinámica de las poblaciones durante el tratamiento.*

- \* La etapa de rápida eliminación del contaminante se correspondió con el período de establecimiento de la población bacteriana activamente degradadora. En un experimento aleatorizado en bloques bajo condiciones favorables al crecimiento, simulando una derrame costero, Macnaughton y col. (1999) obtuvieron un porcentaje de eliminación de PAH similar al determinado en este estudio, 70% en 42 días. En el trabajo de Macnaughton como en el presente, las poblaciones bacterianas respondieron a la contaminación aumentando significativamente, por lo que la eliminación pudo ser atribuida principalmente a la actividad biológica y no a pérdida abiótica.

Las poblaciones bacterianas fueron relevantes en el proceso de eliminación de los hidrocarburos del residuo, en cambio la población fúngica permaneció inhibida hasta el final del tratamiento.

- \* Durante el período de eliminación de la FEE el tratamiento seleccionó poblaciones heterótrofas y degradadoras de PAH “tardías”. La mayor concentración de residuo aplicado, 10%, produjo la mayor selección de bacterias degradadoras de PAH.

La permanencia de estas poblaciones coincidió con el período de actividad genotóxica (Morelli, 1999). Probablemente los productos de transformación generados por las poblaciones “tempranas” sean metabolizados por las poblaciones “tardías”, contribuyendo a la activa detoxificación del sistema.

- \* El restablecimiento de la población fúngica, inicialmente inhibida, se produjo hacia el final del tratamiento, aunque la relativamente aumentada densidad bacteriana y la escasa disponibilidad de nutrientes impedirían que esta población aumente significativamente más allá de los valores del suelo Control.

*Aplicación de modelos al estudio de la dinámica de las poblaciones bacterianas durante proceso de biorremediación.*

La aplicación de modelos que relacionan la actividad microbiana con la eliminación del contaminante ha permitido establecer una hipótesis en la degradación del residuo API en suelo. La aplicación del modelo-IV (Schmidt, 1992) a la cinética de eliminación de HTCG indicó que la cinética de eliminación del sustrato medido no tiene un crecimiento asociado de poblaciones. Sin embargo, fue significativo el crecimiento de la población BH y BDHC en la primera etapa del tratamiento. Este comportamiento ha puesto de manifiesto la naturaleza compleja del contaminante. El ajuste al modelo indicó que la fracción de HTCG no es limitante del crecimiento de las poblaciones bacterianas. De lo que se infiere que el rápido crecimiento inicial de poblaciones bacterianas, determinado en todos los sistemas, sería a expensas de hidrocarburos de fácil asimilación, hidrocarburos no determinados por CG y otras sustancias diferentes de hidrocarburos aportadas por la mezcla compleja del residuo.

La aplicación del modelo-IV (Schmidt, 1992) a un sistema sencillo de suelo contaminado con fenantreno, permitió validar la interpretación de la dinámica de poblaciones de un sistema complejo.

El modelo-IV describió una cinética de eliminación del fenantreno con crecimiento asociado. Esto pudo ser verificado a través de la estimación de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) directamente de la cinética de crecimiento de la población degradadora de fenantreno.

Como la estimación de  $\mu$  por el modelo-IV es independiente de las técnicas de cultivo, pudo inferirse que la población degradadora de fenantreno fue representativa de la comunidad microbiana del sistema.

El modelo también fue utilizado en el análisis de la dinámica de poblaciones de un sistema de tierra contaminada con un residuo predominantemente alifático, más homogéneo que el residuo API, denominado PAR.

El modelo-IV modificado, describió aceptablemente la eliminación de la fracción hidrocarburos totales por espectroscopia infrarroja (HT-IR), indicando una cinética de eliminación con crecimiento asociado.

La  $\mu$  estimada por el modelo-IV modificado ( $0,084 \pm 0,035$  1/día) fue verificada mediante la  $\mu$  obtenida directamente del crecimiento de las poblaciones cultivables ( $0,134 \pm 0,015$  1/día) y la  $\mu$  de la comunidad ( $0,094 \pm 0,035$  1/día) obtenida a través de la cinética de la actividad deshidrogenasa del sistema. En ambos casos, la  $\mu$  calculada no mostró diferencias significativas con la  $\mu$  estimada por el modelo-IV modificado, indicando que la población degradadora es representativa de la comunidad microbiana del sistema.

Como conclusión general, ha sido comprobado que la aplicación de modelos simples de cinética de poblaciones microbianas resultó efectiva para la interpretación de la dinámica de poblaciones y actividad de los microorganismos en un sistema natural como el suelo.

Dinámica del proceso a través de la actividad microbiana de la comunidad.

---

La dinámica del proceso también fue reflejada en la actividad de la comunidad del suelo, evaluada a través de la actividad enzimática de hidrolasas y deshidrogenasas.

- ✱ El residuo API, produjo un efecto de inhibición sobre la actividad hidrolasa de la comunidad microbiana del suelo, en todas las concentraciones estudiadas.
  
- ✱ El período de inhibición de la actividad hidrolasa, coincidió con la inhibición del desarrollo de la población fúngica. Este comportamiento puede ser explicado a través de la participación de las enzimas hidrolasas en los primeros de la transformación de la molécula

de hidrocarburo en el metabolismo de los hongos, mientras que en el bacteriano juegan un rol principal las enzimas deshidrogenasas (Cerniglia, 1992).

- ✱ La actividad hidrolasa del sistema fue recuperada en todas las concentraciones, durante la primera mitad del tratamiento (165 días). Sin embargo, el tiempo transcurrido para la recuperación del disturbio hace que el efecto producido por el contaminante sea considerado crítico (Domsch y col., 1983).

Una dinámica diferente fue observada al determinar la actividad deshidrogenasa del sistema. El residuo produjo sobre la actividad deshidrogenasa del suelo un efecto que varió en función de la concentración aplicada y del tiempo de tratamiento.

- ✱ Inicialmente, el residuo produjo una estimulación de la actividad en función de la concentración hasta el 5%. El incremento en la actividad puede ser explicado a través de procesos de inducción enzimática, debido a que el metabolismo degradador de hidrocarburos (alcanos y PAH) involucran deshidrogenasas (Atlas y Bartha, 1998).

La aplicación del 10% de residuo desarrolló menor actividad, aunque superior al Control, indicando un efecto tóxico.

- ✱ Iniciado el tratamiento, y luego de la aparente disminución de actividad, los sistemas más contaminados evidenciaron un aumento de actividad deshidrogenasa.

Las concentraciones de residuo 1,25%; 2,5% y 5% dejaron al año de tratamiento, un déficit en la actividad deshidrogenasa respecto del control. En cambio, el sistema API-10% desarrolló un comportamiento diferente, manifestando una actividad deshidrogenasa aumentada respecto del Control.

El comportamiento observado en la actividad deshidrogenasa pudo asociarse con la variación de la actividad genotóxica de los sistemas durante el tratamiento observada por Morelli, 1999. Es probable que, la actividad deshidrogenasa de las poblaciones "tardías" degradadoras de los productos de transformación, juegue un rol principal en la detoxificación del sistema.

#### Cambios en la estructura de las comunidades.

---

- ✱ El efecto de la concentración del residuo y del tratamiento, sobre la dinámica de las comunidades del suelo pudo ser evaluado a través de la técnica PCR-DGGE y a través de los cultivos dominantes en dos momentos críticos del tratamiento.

El residuo API produjo en todas las concentraciones estudiadas, un cambio rápido en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo.

El impacto inicial seleccionó comunidades semejantes en los sistemas, independientemente de la concentración de residuo aplicada.

Este cambio también fue determinado en la fracción cultivable de la comunidad, a través del aumento de la abundancia relativa de géneros dominantes, principalmente género *Pseudomonas*. Usualmente ha sido observado que las bacterias Gram-negativas son dominantes en los ambientes contaminados con hidrocarburos (Macnaughton y col., 1999).

El efecto del tratamiento pudo apreciarse a través de la dinámica de las comunidades que variaron en función de la concentración de residuo aplicada.

El tratamiento con la concentración más alta del 10%, seleccionó una comunidad cuya dinámica fue muy diferente de la desarrollada en el resto de los sistemas y en el suelo limpio.

La dinámica de la nueva comunidad podría asociarse a los mecanismos de selección y adaptación de poblaciones degradadoras que intervienen en los procesos de transformación y detoxificación del sistema.

En cambio, el tratamiento de concentraciones menores al 10% produjo cambios en la comunidad tendientes a recuperar la estructura original del suelo limpio en el transcurso del año.

La magnitud de los cambios apreciados al nivel de la estructura de la comunidad bacteriana se reflejó en las propiedades de los cultivos dominantes de las comunidades establecidas al finalizar el tratamiento.

El tratamiento de cargas iguales ó mayores del 5% produjo la selección del género *Bacillus* y el establecimiento, en todas las concentraciones, de poblaciones degradadoras de hidrocarburos cuyos miembros presentaron características metabólicas diferentes respecto del suelo limpio. Estas poblaciones habrían perdido la capacidad de asimilar sustratos simples.

Desde ambas estrategias puede concluirse que el tratamiento de un año no ha permitido recuperar la estructura ni propiedades de la comunidad del suelo original.

### **Conclusión general**

A través de la metodología propuesta en este trabajo, fue posible evaluar la contribución biológica a la efectividad de la biorremediación y el impacto ambiental producidos por la concentración del residuo API y por el proceso de biorremediación.

La contribución biológica fue puesta en evidencia a través del efecto de la concentración del residuo API y del tratamiento. Ambos efectos produjeron cambios en la estructura y función de las comunidades que pudieron ser apreciados en la fracción cultivable de la comunidad del

suelo, en la fracción no-cultivable a través de los perfiles de bandas de DNA bacteriano producidos por PCR-DGGE y, en la función de la comunidad del suelo, a través de su actividad enzimática.

Al finalizar el año de tratamiento, los análisis químicos sugirieron el final del proceso de eliminación de hidrocarburos. Las concentraciones alcanzadas, estuvieron dentro de los límites de aceptación de la legislación vigente (Ley Nacional 24.051/92)

Considerando que la biorremediación fue el método aplicado, es posible concluir que independientemente de la concentración de barro aplicado, los sistemas contaminados no reestablecieron sus características originales, aún cuando los indicadores de biorremediación, tal como la concentración de hidrocarburos residuales dentro de los valores estándares de limpieza de suelo parecieron indicar el final del proceso.

Los microorganismos, dinámicamente involucrados en los ciclos biogeoquímicos de la materia son, como otros segmentos de la biota sensibles a la contaminación. Consecuentemente, la inhibición de su actividad puede traer aparejada la reducción de los procesos ecológicos bajo su control. Esta "injuria invisible" es generalmente pasada por alto cuando deben establecerse las políticas ambientales.

Los resultados obtenidos en este estudio son indicadores de los cambios cuali/cuantitativos expresados por las comunidades microbianas del suelo y han podido estimar la contribución biológica al proceso y el impacto generado en el suelo al nivel de la estructura y función de las comunidades. El alcance logrado intenta abrir algunas de las ventanas de "la caja negra" de la comunidad microbiana del suelo y contribuir desde el aspecto microbiológico a la información necesaria para una definición más integral del punto final del proceso de Biorremediación.

**CAPÍTULO VIII**

**BIBLIOGRAFÍA**

---

**VIII BIBLIOGRAFÍA**

- ◆ Acosta-Martinez, V., and Tabatabai M. 2000. Enzyme activities in limed agricultural soil. *Bio. Fertil. Soils* 31:85-91.
- ◆ Alexander, 1994. *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- ◆ Amann R., W. Ludwig and K. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- ◆ Andrews J. and Hall R. 1986. r- and K- selection and microbial ecology. *Advances in Microbial Ecology*. 9: 99-147.
- ◆ Andrews, J. 1991. *Comparative Ecology of Microorganisms and Macroorganisms*. Springer-Verlag, New York.
- ◆ Atlas R. and Bartha R. 1998. *Microbial Ecology: Fundamental and Applications*. Ed.: Atlas and Bartha. Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., California.
- ◆ Babich H, Davis D, Trauberman J. 1981. Environmental Quality Criteria: Some Considerations. *Environ. Manag.* 5: 191 - 205.
- ◆ Babich H., Bewley R. and Stotzky G. 1983. Application of the "ecological dose" concept to the impact of heavy metals on some microbe-mediated ecological processes in soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12, 421.
- ◆ Bade G., Vecchioli G., Del Panno M. y Paineira M. 1994. *Revista Argentina de Microbiología*. 26: 116-123.
- ◆ Barkay T., Shearer D.F. and Olson B.H. 1986. Toxicity testing in soil using microorganisms. pp. 147. *En: Toxicity Testing Using Microorganisms, Vol II*. Ed. Dutka and Bitton. CRC Press, Inc. Florida.
- ◆ Bartha R. 1983. Use of microbial processes in arid lands: utilization of crude oil and other hydrocarbons. *New Jersey Agricultural Experimental Station Publication Nro. F-01502-3-83*.
- ◆ Bartha R. and Bossert I. 1984. The treatment and disposal of petroleum wastes. *En: Atlas R. (ed.) Petroleum Microbiology*, Macmillan, New York.
- ◆ Beyer W. And Linder G. 1995. Making sense of soil ecotoxicology. *En: Handbook of Ecotoxicology*. Hoffman D., Rattner B., Burton G and Cairns Jr. (eds.) CRC Press, Inc.
- ◆ Blackwood C., Marsh T., Sang-Hoon Kim and Paul E. 2003. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis for Quantitative Comparison of Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 926-932.
- ◆ Bogart A. and Hemmingsen B. 1992. Enumeration of phenanthrene degrading bacteria by an overlayer technique and its use in evaluation of petroleum contaminated sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2579-2582.

- ◆ Bolino Sass P., Del Panno M.T y Morelli I.S. Diversidad microbiana de un residuo industrial: Aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* degradadora de PAH. Libro de resúmenes, N° 291. IX Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires. Fecha: 7- 11 de octubre de 2001.
- ◆ Bragg J., Prince R., HRNAer E. and Atlas R. 1994. Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature (London)*. 368, 413-418.
- ◆ Brandt C., Becker J. and Porta A. 2002. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and terrestrial biota after a spill of crude oil in Trecate, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 8: 1638-1643.
- ◆ Brautbar N. and Williams J. 2002. Industrial solvents and liver toxicity: risk assessment. Risk factors and mechanisms. *Ent. J. Hyg. Environ. Health*. 6: 479-491.
- ◆ Brock D. and Madigan M. 1993. *Microbiología* (6ta. Ed.) Prentice Hall Hispanoamericana S.A. Mexico.
- ◆ Brookes P. 2001. The Soil Microbial Biomass: Concept, Measurement and Applications in Soil Ecosystem Research. Minireview. *Microbes and Environments*. 16: 131-140.
- ◆ Bruns M. and Buckley. 2002. Isolation and purification of microbial community nucleic acids from environmental samples. En: *Manual of Environmental Microbiology*. Hurst C., Crawford R., Knudsen G., McInerney M. and Stetzenbach. (eds.). ASM Press, Washington, D.C., USA.
- ◆ Bruns, A. and Berthe-Corti, L. 1998. In situ detection of bacteria in continuous-flow culture of seawater sediment suspensions with fluorescently labelled rRNA-directed oligonucleotide probes. *Microbiology* 144: 2783-2790.
- ◆ Caldwell D., Wolfaardt G., Korber D., Karthikeyan S., Lawrence J. and Brannan D. 2002. Cultivation of microbial consortia and communities. En: *Manual of Environmental Microbiology*. Hurst C., Crawford R., Knudsen G., McInerney M. and Stetzenbach. (eds.). ASM Press, Washington, D.C., USA.
- ◆ Cerniglia, 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon. *Biodegradation*, 3: 351-368.
- ◆ Convention on Biological Diversity. 2001. Seventh meeting. Montreal, 12-16 November.
- ◆ Coutinho H., De Oliveira V., Manfio G. and Rosado A. 1999. Evaluating the microbial diversity of soil samples: Methodological innovations. *An. Acad. Bras. Ci.*, 71: 3-11.
- ◆ Crawford, Ronald. 2002. Overview: Biotransformation and biodegradation. En: *Manual of Environmental Microbiology*. Hurst C., Crawford R., Knudsen G., McInerney M. and Stetzenbach. (eds.). ASM Press, Washington, D.C., USA.
- ◆ Chung W.K. and King G.M. 2001. Isolation, characterization and polyaromatic hydrocarbon degradation potential of aerobic bacteria from marine macrofaunal burrow sediments and

- description of *Lutibacterium alunoedereans* gen. nov, sp. nov., and *Cydoclasticus spirillensus* sp., nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5585-5592.
- ◆ Deeb R., Hanson J., Scow K. and Alvarez L. 2000. Substrate interactions during the biodegradation of MTBE and BTEX mixtures. *En: Proceedings of the Second International Conference: Remediation of chlorinated and other recalcitrant compounds*, Monterey, CA.
  - ◆ Degens, B.P. and Harris, J.A. 1997. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 29, 1309-1320.
  - ◆ Desai J. And Banat I., 1997. Reviews. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology.* 61: 47-64.
  - ◆ Di Mattia E., Grego S. and Cacciari I. 2001. Eco-physiological characterization of soil bacterial populations in different states of growth. *Microbial Ecology*. Nro. 43, pp. 34-43
  - ◆ Dibble J. and Bartha R. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. Apr.: 729-739.
  - ◆ Domsch, K., Jagnow G. and Anderson T. 1983. An ecological concept for the assessment of side-effects of agrochemicals on soil microorganisms. *Residue Rev.* 86. 65.
  - ◆ Dutka T.K. and Harayama S. 2001. Biodegradation of n-alkylcycloalkanes and n-alkylbenzenes via new pathways in *Alcalinovorax* sp. strain MBIC 4326. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1979-1974.
  - ◆ Eder K. 1995. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J. Chromatogr. B.* 67: 113-131.
  - ◆ Egli Thomas. The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganisms with mixtures substrates. (Cap. 8, 305-386) *Advances in Microbial Ecology*. Vol 14. Ed. Gwynfryn Jones. Plenum Press, New York. 1995
  - ◆ Ellis R, Morgan P., Weightman A. and Fry J. 2003. Cultivation-dependent and – independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 69, 3223-3230.
  - ◆ Ellis R., Neish B., Trett M., Best J., Weightman A., Morgan P. and Fry J. 2001. Comparison of microbial and meiofaunal community analyses for determining impact of heavy metal contamination. *J. Microbiol. Methods.* Vol. 45, 171-185.
  - ◆ Fernández A., Huang S., Seston S., Xing J., Hickey R., Criddle C. and Tiedje J. 1999. How stable is stable? Function versus community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 65, 3697-3704.
  - ◆ Fontvieille D., Outaguerouine A. and Thevenot D. 1992. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: application to activated sludges. *Environmental Technology.* 13: 531-540.

- ◆ Frederick C., Quensen J and Reddy C. 2001. Bioremediation of a PCB-contaminated soil via composting. *Compost Science and utilization*. 9: 274
- ◆ Garland J. and Mills A. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2351-2359.
- ◆ Gerhard, P., R. Murray, R. Costilow, E. Nester, N. Krieg, and G. Phillips (ed.) 1981. Manual of methods for general bacteriology. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
- ◆ Giovannoni S., DeLong E., Olsen G. and Pace N. 1988. Phylogenetic Group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* 170: 720-726.
- ◆ Güttler V. and Stanisich V. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S spacer region. *Microbiol.* 142:3-16.
- ◆ Hägvar S. 1998. The relevance of Rio-Convention on biodiversity to conserving the biodiversity of soils. *Applied Soil Ecology*. 9: 1-7.
- ◆ Hahn D. Amann, W. Ludwig, Akkermans A. and Schleifer K. 1992. Detection of microorganisms in soil after in situ hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labelled oligonucleotides. *J. Gen. Microbiol.* 132: 879-887.
- ◆ Haines J., Wrenn B., Holder E., Strohmeier K., Herrington R. and venosa A. 1986. Measurement of hydrocarbon-degrading microbial populationes by a 96-well plate most – probable-number procedure. *J. Ind. Microbial.* 16: 36-41.
- ◆ Haines J., Wrenn B., Holder E., Strohmeier K., Herrington R. and venosa A. 1986. Measurement of hydrocarbon-degrading microbial populationes by a 96-well plate most – probable-number procedure. *J. Ind. Microbial.* 16: 36-41.
- ◆ Head I., Saunders J. and Pickup R. 1998. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*. 35: 1-21.
- ◆ Heilmann B., Lebuhn M and Beese F. 1995. Methods for the investigation of metabolic activities and shifts in the microbial community in a soil treated with a fungicide. *Biol. Fertil. Soils*. 19: 186-192.
- ◆ Hughes J., Hellmann J., Ricketts T., and Bohannan B. 2001. Minireview. Counting the uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity). *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4399-4406.
- ◆ Hurst. 2002. Neighborhoods and community involvement: no microbe is an island. *En: Manual of Environmental Microbiology*. Hurst C., Crawford R., Knudsen G., McInerney M. and Stetzenbach. (eds.). ASM Press, Washington, D.C., USA.

- ◆ Insam H., 2001. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma* 100: 389-402.
- ◆ Iwamoto T. and Nasu M. 2001. Current bioremediation practice and perspective. Review. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92: 1-8.
- ◆ Janssen P., Yates P., Grinton B., Taylor P., and Sait M. 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the Divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 2391-2396.
- ◆ Kästner M., Breuer-Jammali M. and Mahro B. 1998. Impact of inoculation protocols, salinity and pH on the degradation of polycyclic aromatics hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH degrading bacteria introduced into soil. *Applied and environmental Microbiology*. 64: 359-362.
- ◆ Kerkhof L., Santoro M. and Garland J. 2000. Response of soybean rizosphere communities to human hygiene water addition as determined by community level physiological profiling (CLPP) and terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 184:95-101.
- ◆ Kinkel L., Nordheim E. and Andrews J. 1992. Microbial community analysis in incompletely or destructively sampled systems. *Microbial Ecology*. 24: 227-242.
- ◆ Kirkby, C. 1999. Biodiversity, soil and ecologically sustainable development. CSIRO Division of Soils. [www.csiro.au](http://www.csiro.au)
- ◆ Knackmus, H. J. 1996. Basic knowledge and perspectives of bioelimination of xenobiotics compounds. *J. Biotechnol.* 51: 287-295.
- ◆ Kovárová –Kovar K. and Egli T. 1998. Growth kinetics of suspended microbial cells: From single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 646-666.
- ◆ Kuhn I., Allestam G., Stenström T. and Möllby R. 1991. Biochemical fingerprinting of water coliform bacteria, a new method for measuring phenotypic diversity and for comparing different bacterial populations. *Applied Environmental Microbiology*. 57: 3171-3177.
- ◆ Kuske C., BRNAs S and Busch J. 1997. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl. Environ. Microbiol. Vol. 63*, 3614-3621.
- ◆ Kwan K.K. (1991). *Methods for Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediments*. Workshop.
- ◆ Lawton JH, Bignell DE, Bloemers GF, Eggleton P and Hodda ME. 1996. Carbon flux and diversity of nematodes and termites in Cameroon forest soils. *Biodiv. Cons.* 5: 261-273.

- ◆ Liu and Sthal, 2002. Molecular aproaces for the measurement of density, diversity and phylogeny. *En: Manual of Environmental Microbiology*. Hurst C., Crawford R., Knudsen G., McInerney M. and Stetzenbach. (eds.). ASM Press, Washington, D.C., USA.
- ◆ Loehr R.C., Martin J.H., Neuhauser E.F. 1992. Land treatment of an aged oily sludge-organic loss and change in soil characteristics. *Wat.Res.* 26: 805-815.
- ◆ Lovley, D.R. (1991). Dissimilatory F (III) and Mn (IV) reduction. *Microbial. Rev.*, 55: 259-287.
- ◆ Mac Cormack W.P. 1999. Selección, Caracterización y Evaluación del Potencial Biotecnológico de Bacterias Sicrotróficas Degradadoras de Hidrocarburos. Trabajo de Tesis. Facultad de Farmacia y Bioquímica. U.B.A.
- ◆ Macnaughton S., Stephen J., Venosa A., Davis G., Chang, Y. And White D. 1999. Microbial Populations Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol: 3566-3574.
- ◆ Margesin R. and Schinner F. 2001. Bioremediation (natural attenuation and bioestimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3127-3133.
- ◆ Martin J.P. 1950. Use of acid rose Bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci. Plant, Anal.* 7:31-37.
- ◆ McCue T. Hoxworth S. and Randall A. 2003. Degradation of halogenated aliphatic compounds utilizing sequential anaerobic/aerobic treatments. *Water Science Tecnology.* 47: 79-84.
- ◆ Mitchell K and Fox B. 2002. Biodegradation of halogenated solvents. *En: Manual of Environmental Microbiology*. Hurst C., Crawford R., Knudsen G., McInerney M. and Stetzenbach. (eds.). ASM Press, Washington, D.C., USA.
- ◆ Morelli I., Vecchioli G., Del Panno M.T. and Panceira M.T. 2001. Effect of petrochemical sludge concentrations on changes in mutagenic activity during soil bioremediation process. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 2179-2183.
- ◆ Morelli, I.S. 1999. Caracterización de la Toxicidad de Residuos con Hidrocarburos. Trabajo de Tesis. Facultad de Ciencias Exactas. U.N.L.P.
- ◆ Morgun A. and Winstanley C. 1997. Microbial biomarkers. *En: van Elsas J.D., Trevors J.T. and Wellington E.M. eds. Modern-Soil Microbiology*. New York, Marcel Dekker, p.331-52.
- ◆ Morra M.J. Assessment of extracellular enzymatic activity in soil. 2002. *En: Manual of Environmental Microbiology*. Hurst C., Crawford R., Knudsen G., McInerney M. and Stetzenbach. (eds.). ASM Press, Washington, D.C., USA.

- ◆ Mueller J., Middaugh D. and Lantz S. 1991. Biodegradation of creosote and pentachlorophenol in contaminated groundwater: Chemical and biological assessment. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 1277-1285.
- ◆ Murray, A.E., Hollibaugh, J.T. and Orrego, C. 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2676-2680.
- ◆ Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoedes, C., Schäfer, H. and Wawer, C. 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: *Molecular Microbial Ecology Manual* (Akkermans, A. D. L., van Elsas, J. D. and de Bruijn, F., Eds.), pp 1-27. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
- ◆ Nübel U., García-Pichel F. And Muyzer G. 1997. PCR primers to amplify 16S RNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3327-3332.
- ◆ O'Donnell A. and Görres H. 1999. 16S rDNA methods in soil microbiology. *Current Opinion in Biotechnology*. 10: 225-229.
- ◆ O'Gara F., Priefer U., Dowling D. y Nuti M. 1999. Prokaryotes in agriculture. 850-867. *En: Biology of Prokaryotes* Ed. Lengeler. Drews y Schlegel. G.Thieme Verlag, Stuttgart, Germany.
- ◆ Ogram y Sharma. 2002. Methods of soil microbial community analysis. *En: Manual of Environmental Microbiology*. Hurst C., Crawford R., Knudsen G., McInerney M. and Stetzenbach. (eds.). ASM Press, Washington, D.C., USA.
- ◆ Ortega-Calvo J., Marchenko A., Vorobyov A. and Borovick R. 2003. Chemotaxis in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from coal-tar and oil-polluted rhizospheres. *FEMS Microbiology Ecology*. 44: 373-381.
- ◆ Palleroni R.. 1999. Biodiversidad: pasado, presente y futuro. Conferencia de cierre del Seminario de Biodiversidad. ILSI-Argentina. Buenos Aires.
- ◆ Pearson, K. 1926. On the coefficient of racial likeness. *Biometrika* 18, 105-117.
- ◆ Peterson, S. and Klug M. 1994. Effects of sieving, storage and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* 60:2421-2430.
- ◆ Pramer D. and Bartha R. 1972. Preparation and processing of soil samples for biodegradation studies. *Environmental Letters*. 2, 4: 217-224.
- ◆ Reasoner D. and Geldreich E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied Environmental Microbiology*. 49: 1-7.
- ◆ Ritter W. and Scarborough R. 1995. A review of bioremediation of contaminated soils and groundwater. *J. Environmental Science and Health*. 30: 333-357.

- ◆ Roane, T. and Pepper, I. 2000. Microbial responses to environmentally toxic cadmium. *Microbial Ecology*, 38:358-364.
- ◆ Röling W., Milner M., Jones D., Lee K., Daniel F., Swannell P. and Head I. 2002. Robust hydrocarbon degrading and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 5537-5548.
- ◆ Saterbak A., Toy R., McMain B., Williams P. and Dorn P. 2000. Ecotoxicological and analytical assessment of effects of bioremediation on hydrocarbon-containing soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 10: 2643-2652.
- ◆ Schink B., 1999. Ecophysiology and Ecological Niches of Prokaryotes. *En Biology of the Prokaryotes*. Editado por Lengeler J, Drews G. and Schlegel H. Thieme, Stuttgart, Germany.
- ◆ Schmidt, S. and Lipson, D. 2001. Kinetics of Microbial Processes and Growth in Soil. En: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. Wiley Publ., New York.
- ◆ Schmidt, S.K. 1992. Models for studying the population ecology of microorganisms in natural systems. pp. 31-59 En C.J. Hurst (ed.), *Modeling the metabolic and physiologic activities of microorganisms*. John Wiley & Sons, New York.
- ◆ Schmidt, S.K. and M.J. Gier. 1990. Coexisting bacterial populations responsible for multiphasic mineralization kinetics in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2692-2697.
- ◆ Schnürer, J., and Rosswall T. 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1256-1261.
- ◆ Siciliano S., Gong P, Sunahara GI, Greer CW. 2000. Assessment of 2,4,6-trinitrotoluene toxicity in field soils by pollution-induced community tolerance, denaturing gradient gel electrophoresis, and seed germination assay. *Environ Toxicol Chem* 19: 2154-2160.
- ◆ Sims J., Sims R. and Matthews J. 1990. Approach to bioremediation of contaminated soil. *Hazardous Waste & Hazardous Materials* 7: 117-149.
- ◆ Sokal, R.R. and Michener, C.D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 38, 1409-1438.
- ◆ Song H. and Bartha R. 1990. Effects of jet fuel spills on microbial community of soil. *Applied environmental Microbiology*. 56: 646-651.
- ◆ Song H., Wang X. and Bartha R. 1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 652-656.
- ◆ Sparks T., Scott W. and Clarke R. 1997. Traditional multivariate techniques: potential for use in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18: 128-137.
- ◆ Stanier R., Ingraham J., Wheelis M. y Painter P. 1996. *Microbiología* (2da. Edición). Editorial Reverté, S.A. Barcelona

- ◆ Suzuki, M.T. and Giovannoni, S.J. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 625-630.
- ◆ Thalmann, A. 1968. Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch. Forsch.* 21: 249-258.
- ◆ Torsvik V., Salte R, Sorheim R and Goksoyr J. 1990. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 56: 776-781.
- ◆ Travis B. and Rosenberg N. 1997. Modeling in situ bioremediation of TCE at Savannah River: effects of product toxicity and microbial degradation. *Environmental Science and Technology* 31: 3093-3102.
- ◆ Valencia Cantero E. y Peña Cabriaes J. 2001. El suelo y sus habitantes microbianos: consideraciones ecológicas. *Avance y Perspectiva.* 20: 401-403.
- ◆ van Elsas J., Smalla K., Lilley A. And Bailey M. 2002. Methods for sampling soil microbes. En: *Manual of Environmental Microbiology.* Hurst C., Crawford R., Knudsen G., McInemey M. and Stetzenbach. (eds.). ASM Press, Washington, D.C., USA.
- ◆ van Veen J., van Overbeek L. and van Elsas J. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbial and Molecular Biology Reviews*, 61: 121-135.
- ◆ Vecchioli G., Costanza O., Giorgieri S. and Remmler M. 1997. Extent of cleaning achievable for bioremediation of soil contaminated with petrochemical sludges. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 70: 331-336.
- ◆ Vecchioli G., Costanza O., Morelli I., Del Panno M., Paineira M. y Benavidez H. 2000. Bioremediación como alternativa a la incineración de residuos con hidrocarburos aromáticos polinucleares. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental.* Parte 1, 50: 50-54 - Parte 2, 51: 34-38. ISSN 0328-2937.
- ◆ Vecchioli G., Del Panno, M. y Paineira M. 1990. Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil. *Environ. Pollut.*, 67: 249-258.
- ◆ Vecchioli G.I. 1998. Degradación de Mezclas Complejas de Hidrocarburos en Suelo. Trabajo de Tesis. Facultad de Ciencias Exactas. U.N.L.P.
- ◆ von Wintzingerode, F., Gobel, U.B. and Stackebrandt, E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 213-229.
- ◆ Watanabe K. 1997. Identification of functionally important catabolic populations in a microbial consortium. *Recent Res. Devel. In Microbiol.* 1: 65-76.
- ◆ Watanabe K., Teramoto M. and Harayama S. 1999. An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2813-2819.

- ◆ Watanabe K. and Baker P. 2000. Environmental Relevant Microorganisms. Review. Journal of Bioscience and Bioengineering, 89: 1-11.
- ◆ Wattiau, P. 2002. Microbial aspects in bioremediation of soils polluted by polyaromatic hydrocarbons. En: *Biotechnology for the Environment: Strategy and Fundamentals*. Agathos S. and Reineke W. (eds.) Kluwer Academic Publishers.
- ◆ Watve M. and Gangal R. 1996. Problems in measuring bacterial diversity and a possible solution. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 4299-4301.
- ◆ White D., Flemming C., Leung K. and Macnaughton S. 1998. *In situ* microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring and risk assessment of pollution remediation in soil, the subsurface, the rhizosphere and in biofilm. *J. Microbiol. Methods*, 32: 93-105.
- ◆ Widdel F. and Bok F. 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. En: *The Prokaryotes, Vol IV*. Ed. by Bolows A., Trüper H., Dworkin M., Harder W. and Schleifer K. Springer-Verlag, Berlin.
- ◆ Witter E., Gong P., Bääth E. and Marstorp H. 2000. A study of the structure and metal tolerance of the soil microbial community six years after cessation of sewage sludge applications. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19: 1983-1991.
- ◆ Wünsche L., Brüggemann L. and Babel W. 1995. Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: An approach to assess population changes after hydrocarbon pollution. *FEMS Microbiology Ecology* 17: 295-306.
- ◆ Zajic J. and Mahomedy A. 1984. Biosurfactants: intermediates in the biosynthesis of amphipathic molecules in microbes. En *Atlas R. (ed.) Petroleum Microbiology*, Macmillan, New York, 435-473.
- ◆ Zelle L. and Bai, Q. 1994. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharids in environmental samples. *Chemosphere*. 28: 391-411.
- ◆ Zeyer J., Höhener P., Hunkeler D., Hahn D. 1995. In situ bioremediation of mineral oil contaminated soils and aquifers: quantification of degradation rates and fate of hydrocarbons. En: W.J. van den Brink, R. Bosman and F. Arendt (eds.) *Contaminated Soil'95*. 327-336. Kluwer Academic Publishers.
- ◆ Zwietering M., Jongenburger I., Rombouts F. and van 'T Riet K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. And Environ. Microbiology*. 56: 1875-1881.

11