



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

***Remediación de un suelo
crónicamente contaminado con
Hidrocarburos Policíclicos
Aromáticos***

Lic. Rocío Medina

Directora: María Teresa Del Panno

Codirectora: Janina Alejandra Rosso

Año 2017

El presente trabajo, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) y en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. María Teresa Del Panno y la codirección de la Dra. Janina Alejandra Rosso.

*A mis padres, Roberto y Alicia, y a mi hermano, Rochi, por su apoyo y confianza incondicionales.
A Carlitos...*

“Lo importante es no dejar de hacerse preguntas”
(Albert Einstein)

Quisiera expresar mi reconocimiento,

A la Universidad Nacional de La Plata por la formación recibida desde el comienzo de mis estudios de grado.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) y al Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), donde fue posible realizar este trabajo de tesis.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), que a través de las becas otorgadas me posibilitaron la realización de este trabajo.

Al programa de becas de formación en el exterior en Ciencia Tecnología, Bec.Ar, que me permitió realizar una estancia de investigación en España.

Al Departamento de Ecología Genética de la Rizósfera, de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ) - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), España, donde me permitieron realizar mi estadía en Granada.

Pero también quiero agradecer,

A mi familia, por su presencia, acompañamiento y sobre todo, paciencia.

A Tere, quien logró a través de su perseverancia y cariño, que pueda superar los obstáculos, guiándome y apoyándome siempre. Gracias por tanto!

A Janina, por su confianza en mí. Gracias por hacer de mí una persona un poco (solo un poco) más ordenada!

A Pedro D.G por su colaboración y predisposición para llevar a cabo este trabajo. Sé que me costó, pero... jaja! Gracias!

A Irma, quien es en parte, la culpable de todo esto... "no te vas a ir a Italia vos, no?" ... y acá estamos Irma, concluyendo. Infinitas gracias por tu confianza.

A Vero, por esas mañanas cargadas de conversaciones (científicas y no tanto). A mi querida Peluffita, con quien recorrimos estos años de doctorado juntas. Qué lindas peleas matinales con las dos! ... Saben que las voy a extrañar, no?

A Marti y Marian que siempre, pero siempre, estuvieron ahí para todo de modo incondicional. A Sa, Naty y Li por su alegría, energía y entusiasmo de siempre, pero principalmente por su buena predisposición. Al dúo, Clau y Vivi, con el que me divertí

muchísimo, incluso a la distancia. A Bibi, Lau y Pau por todos los momentos compartidos, mates, cosas ricas, viajesitos en teleférico (jajaja!), etc. En fin, al L5, extenso L5... Gracias!!!

A Oscar, por su cariño y sus palabras durante estos 5 años.

A cada uno de los integrantes del CINDEFI que me hicieron el aguante durante estos años, gracias!

A Pedro B. por darme el criterio y la libertad cuando los necesité.

A Mario por darme confianza y motivación bajo el lema "La Paciencia es la madre de las ciencias".

A Sil y Ernest, con quienes nos une no solo la ciencia y el trabajo en equipo, sino la amistad incondicional, gracias por estar!

A Manolo, que acepto el desafío de recibirme y no solo eso... también de volverse mi "cómplice" granadino. Gracias por hacerme pasar una divertida estadía en el lab ¿206? (me aprendí el recorrido pero jamás el número). A Pablo, Hurry y Ani; por esos desayunos granadinos cargados de léxico incomprensible para esta argentina... por tantas risas en tan poco tiempo. A Fernando, principalmente por su paciencia y por todas las qPCR y clones que sufrimos juntos. A Lola y Rafa, y a todo el piso 2, por las tapas y cañas compartidas y caminos recorridos..."dale limosna mujer, que no hay en la vida nada como la pena de ser ciego en Granada".

A mis amigos de la vida, que sin ellos todo me sería difícil...

Gracias!

Índice

Capítulo I: Introducción	17
El Suelo: estructura, composición y propiedades	19
Comunidades microbianas del suelo	22
Contaminación del suelo con hidrocarburos.....	25
Tecnologías de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos	35
Tecnologías de remediación empleadas en este trabajo	40
1. Tecnologías de remediación biológicas.....	40
2. Tecnologías de remediación químicas: Aplicación de persulfato de amonio	42
3. Tecnologías de remediación combinadas: Aplicación de distintas tecnologías	
de remediación biológicas post aplicación de persulfato de amonio.....	43
HIPÓTESIS	45
OBJETIVOS	45
a) Objetivo general	45
b) Objetivos específicos	45
Capítulo II: Materiales y métodos	47
Materiales utilizados	49
1. Suelo contaminado (S_0)	49
2. Suelo del predio (SP).....	50
3. Enmienda orgánica y agente de volumen empleados en el compostaje.....	50
4. Tratamiento de compostaje tradicional.....	51
Medios de cultivo	52
Metodología para las determinaciones físicas y químicas.....	52
1. Determinación de pH, conductividad eléctrica y potencial redox	52
2. Determinación de la concentración de hidrocarburos	53
3. Fracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos biodisponibles.....	54
4. Análisis del extracto alcalino del suelo.....	54
5. Determinación de Fe	57
6. Determinación de Persulfato (PS) en suelo.....	57
Recuento de las poblaciones cultivables.....	58
Metodología para los estudios de funcionalidad del suelo.....	59
1. Actividad deshidrogenasa (Del Panno y col., 2005)	59
2. Actividad lipasa (Margesin y col., 2002)	59
3. Actividad arilsulfatasa (Geng y col., 2012)	60
4. Actividad fosfatasa (Verchot y Borelli 2005)	60
5. Actividad ureasa (Kandeler y Gerber 1988)	60
6. Actividad proteasa (Ladd y Butler 1972)	61
7. Respuesta respiratoria inducida por sustrato (SIR) (Degens y Harris 1997) ..	62
Metodología para los estudios genómicos.....	63
1. Extracción de ADN de suelo	63

2. Estructura de la comunidad bacteriana	63
3. Estudio de diversidad mediante pirosecuenciación del gen 16S rARN.....	65
4. Clonado de genes específicos de degradación de PAHs	69
5. Cuantificación de genes mediante real time PCR	71
Metodología para el estudio de fitotoxicidad (Sobrero y col., 2004)	73
Medida de la productividad del suelo	74
Análisis estadísticos	75
Preparación de los microcosmos.....	75
1. Tecnologías de remediación biológicas.....	75
a) Acondicionamiento del suelo contaminado (SA)	75
b) Compostaje del suelo (SC)	76
(1) Ensayo I.....	76
(2) Ensayo II.....	77
(3) Ensayo III.....	78
c) Bioestimulación	79
(1) Con enmienda orgánica (SE).....	79
(2) Con sales inorgánicas (SF).....	79
2. Tecnologías de remediación química: aplicación de persulfato de amonio ..	80
3. Tecnologías de remediación combinadas	82
a) Acondicionamiento del suelo tratado con PS (SOx A).....	82
b) Compostaje (en reactores verticales de 5L) del suelo tratado con PS (SOx C)	82
c) Bioestimulación con enmienda orgánica del suelo tratado con PS (SOx E)	82
d) Doble estimulación con enmienda orgánica del suelo tratado con PS	
(SOx DE)	83
Capítulo III: Caracterización de un suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos	
.....	85
Estudios químicos y físicos	87
Análisis de las poblaciones microbianas cultivables	93
Caracterización de la funcionalidad del suelo	94
Análisis genómico de la comunidad microbiana de S ₀	97
Clonado de genes específicos de degradación de PAHs	99
Ensayos de fitotoxicidad	101
Discusión.....	103
Conclusiones.....	105
Capítulo IV: Tecnologías de remediación biológicas aplicadas al suelo crónicamente	
contaminado.....	107
Acondicionamiento del suelo crónicamente contaminado (SA)	110
Estudios químicos y físicos	110
Análisis de las poblaciones microbianas cultivables	113

Caracterización de la funcionalidad del suelo	115
Ensayos de fitotoxicidad	115
Discusión.....	117
Compostaje del suelo crónicamente contaminado	120
Optimización del tratamiento de compostaje	120
Compostaje del suelo crónicamente contaminado	122
Estudios químicos y físicos	122
Análisis de las poblaciones microbianas cultivables	128
Caracterización de la funcionalidad del suelo	129
Ensayos de fitotoxicidad	131
Discusión.....	132
Estimulación con enmienda orgánica (SE)	138
Estudios químicos y físicos	138
Análisis de las poblaciones microbianas cultivables	142
Caracterización de la funcionalidad del suelo	143
Ensayos de fitotoxicidad	144
Discusión.....	146
Estimulación con sales (SF).....	149
Estudios químicos y físicos	149
Análisis de las poblaciones microbianas cultivables	152
Caracterización de la funcionalidad del suelo	154
Ensayos de fitotoxicidad	154
Discusión.....	155
Comparación de los tratamientos	157
Análisis multivariado de las matrices de excitación emisión de fluorescencia....	162
Impacto de los tratamientos sobre las comunidades bacterianas del suelo	168
Conclusiones.....	177
Capítulo V: Tecnologías de remediación química y combinadas aplicadas al suelo crónicamente contaminado	179
Remediación química mediante oxidación con Persulfato de amonio.....	182
Estudios químicos y físicos	182
Análisis de las poblaciones microbianas cultivables	186
Caracterización de la funcionalidad del suelo	187
Ensayos de fitotoxicidad	188
Discusión.....	190
Estrategia de acondicionamiento del suelo luego de la aplicación de PS (SOxA)	194
Estudios químicos y físicos	194
Análisis de las poblaciones microbianas cultivables	199
Caracterización de la funcionalidad del suelo	200
Ensayos de fitotoxicidad	201
Discusión.....	203
Compostaje del suelo acoplado a la aplicación de PS (SOxC)	206
Compostaje en reactores verticales (SCv).....	206

Estudios químicos y físicos	206
Análisis de las poblaciones microbianas cultivables	211
Caracterización de la funcionalidad del suelo	212
Ensayos de fitotoxicidad	213
Discusión.....	215
Estimulación con compost acoplada a la aplicación de PS (SOxE)	218
Estudios químicos y físicos	218
Análisis de las poblaciones microbianas cultivables	223
Caracterización de la funcionalidad del suelo	224
Ensayos de fitotoxicidad	225
Discusión.....	226
Doble estimulación con compost acoplada a la aplicación de PS (SOxDE)	229
Estudios químicos y físicos	229
Análisis de las poblaciones microbianas cultivables	234
Caracterización de la funcionalidad del suelo	236
Ensayos de fitotoxicidad	237
Discusión.....	238
Comparación de los tratamientos	240
Análisis multivariado de las matrices de excitación emisión de fluorescencia....	244
Impacto de los tratamientos sobre el potencial degradador de las comunidades bacterianas del suelo.....	250
Impacto de los tratamientos sobre la estructura de las comunidades bacterianas del suelo.....	255
Impacto del tratamiento oxidativo sobre la diversidad de la comunidad autóctona resiliente	258
Impacto de los tratamientos en la recuperación de la diversidad bacteriana del suelo post aplicación de PS	262
Conclusiones.....	271
Capítulo VI: Conclusiones	273
Bibliografía.....	279
Abreviaturas utilizadas	299
Anexos	301
Anexo I: Análisis realizado sobre el estiércol de cabra, el rastrojo de avena y el compost tradicional.....	302
Análisis realizado sobre el estiércol de cabra y el rastrojo de avena.....	302
Análisis realizados sobre el compost tradicional, utilizado como enmienda orgánica en los ensayos de estimulación con compost	302
Anexo II: Medios de cultivo	303
Anexo III: Soluciones y reactivos empleados en estudios de funcionalidad del suelo	306
AIII.1. Drogas utilizadas en los ensayos enzimáticos.....	306

A.III.2. Soluciones utilizadas en la medida de la respuesta respiratoria inducida por sustrato.....	307
Anexo IV: Soluciones y reactivos empleados en los estudios genómicos.....	307
A.IV. 1. Extracción de ADN de suelo	307
A.IV.2. Preparación de soluciones de DGGE.....	309
Anexo V: Descripción de las regiones utilizadas en los estudios de diversidad mediante pirosecuenciación del gen 16S rRNA	310
Anexo VI: Secuencias obtenidas mediante el clonado de la región RHD α de genes dioxigenasa	311

Capítulo 1: Introducción



El Suelo: estructura, composición y propiedades

El suelo es la parte superficial de la corteza terrestre, que es biológicamente activa donde se desempeñan funciones naturales y antropogénicas.

El suelo está formado por componentes minerales (provenientes de la meteorización de rocas), componentes orgánicos (humus y sus derivados y biomasa), gas (aire en los poros) y agua, que envuelve las partículas de suelo y el espacio capilar. Se compone de un 50 % aproximadamente de espacio libre, la mitad ocupado por gases y la otra mitad por líquidos, 40-50 % de sólidos minerales y un 0.5- 5 % de materia orgánica (Madigan y col., 2004). La Figura I.1 presenta el esquema de un agregado de suelo (A) y una micrografía electrónica del mismo (B).

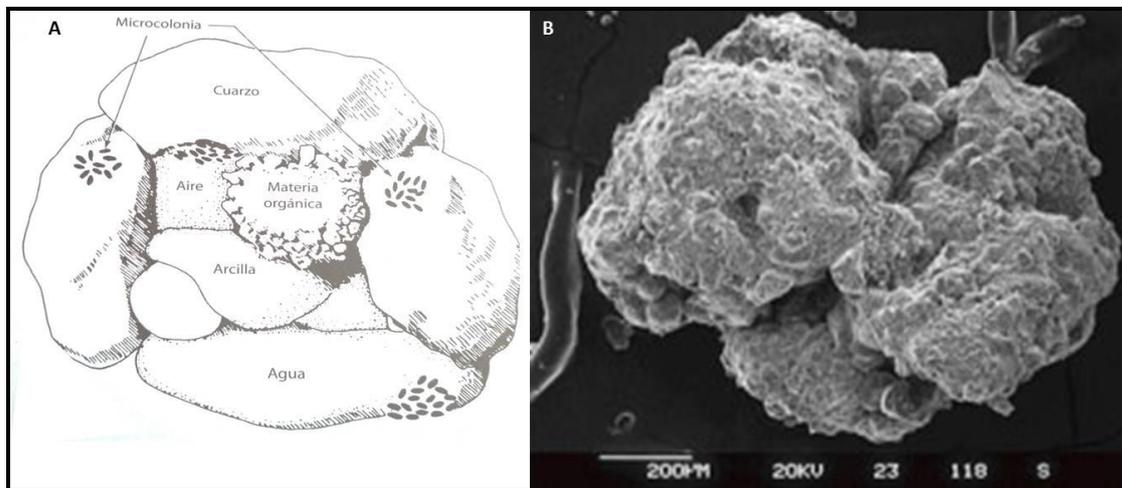


Figura I.1. Estructura de un agregado de suelo. A. Esquema (Atlas y col., 2002) B. Micrografía electrónica.

La estructura del suelo resulta de la granulometría de los elementos que lo componen y del modo en que se hallan dispuestos. Según las proporciones de arena (2-0,05 mm de diámetro), limo (2-50 μm de diámetro), arcilla (inferior a 2 μm de diámetro) y materia orgánica, existe una gran variedad de diferentes tipos de suelos, que varían según la proporción de estas partículas. De acuerdo a esta proporción se constituye la textura del suelo. La textura es la propiedad que determina el área de superficie disponible como hábitat para el crecimiento de los microorganismos (Atlas y col., 2002).

Los componentes minerales y la materia orgánica se distribuyen en el espacio generando una estructura porosa. El agua contenida en los poros del suelo contiene

sales minerales y nutrientes, generando así el medio en el cual se puede desarrollar la actividad metabólica de los microorganismos que lo colonizan. El contenido en agua de un suelo puede oscilar, y así afectar dicha actividad. El crecimiento de las plantas y los ecosistemas terrestres son coordinados en el suelo, donde además se mantienen los ciclos biogeoquímicos de la materia (Atlas y col., 2002).

La materia orgánica del suelo (MOS) procede de restos vegetales, animales y microorganismos (Kästner 2000). La MOS mejora la aireación, la retención de agua y la capacidad buffer del suelo. La adición de residuos orgánicos fácilmente degradables permite la síntesis de compuestos orgánicos complejos a los que se unen partículas del suelo formando agregados, los que ayudan a mantener la porosidad y la granulosidad (Kästner y Miltner 2016). Distintos procesos como el transporte, la solubilización, la degradación, la volatilización y la biodisponibilidad de compuestos orgánicos hidrofóbicos, están controlados por la presencia de MOS (Piccolo 1994; Huesemann y col., 2004).

En este trabajo, el concepto de biodisponibilidad se aplicará a los compuestos libremente asequibles en el ambiente para ser utilizados por los organismos. La biodisponibilidad depende del tiempo ya que los compuestos pueden ser temporalmente ocluidos por la MOS (Semple y col., 2007).

Las sustancias húmicas (SH) constituyen entre el 60 y 70 % de la MOS (Senesi y Chen 1989). Las SH son sustancias coloreadas, de alto peso molecular, formadas por procesos bioquímicos a partir de residuos de origen animal o vegetal, bastante resistentes a la degradación microbiológica o química (David Gara 2008). Según su solubilidad en agua, las SH pueden fraccionarse en ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) y huminas. Los AH son solubles a $\text{pH} > 2$; los AF son solubles a cualquier pH y las huminas son insolubles en soluciones acuosas (Morán Vieyra y col., 2009).

Las SH son un conjunto de polímeros de alto peso molecular de composición no específica, relacionadas entre sí (Sutton y Sposito 2005). Mediante distintos estudios se evidenció que los AH presentan un núcleo de anillos aromáticos heterocíclicos condensados, y que se encuentran unidos a anillos quinónicos. En la Figura I.2 se muestra la estructura típica propuesta para los AH (Stevenson y Schnitzer 1982). Los

AF poseen estructuras aromáticas y alifáticas muy sustituidas con grupos funcionales oxigenados, como se muestra en la Figura I.3 (Buffle 1977).

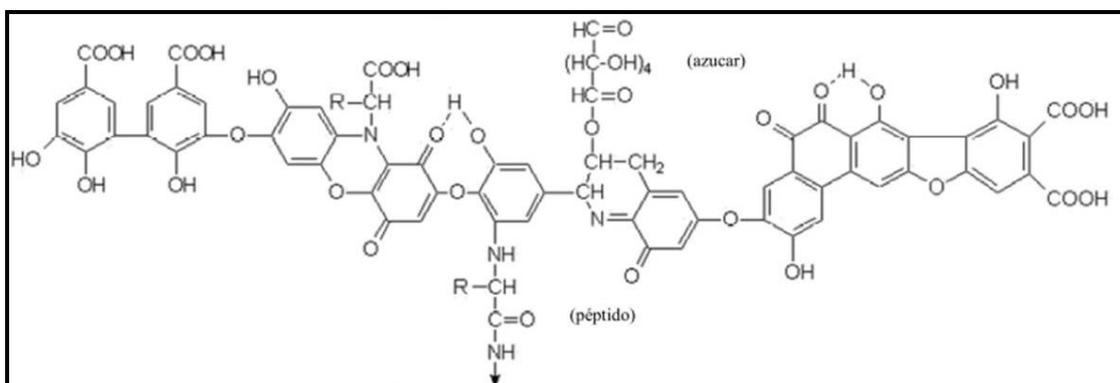


Figura I.2. Estructura típica propuesta para los ácidos húmicos (Stevenson y Schnitzer 1982).

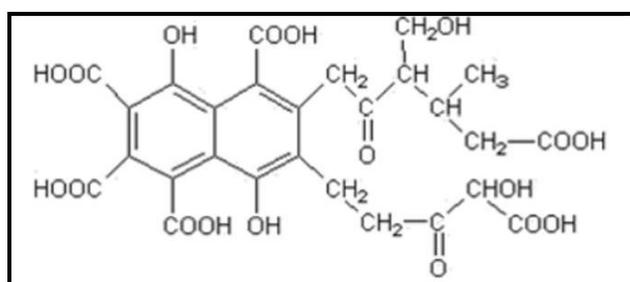


Figura I.3. Estructura típica propuesta para los ácidos fúlvicos (Buffle 1977).

La generación de las SH es un proceso de dos fases. La primera fase consiste en la degradación microbiana de polímeros orgánicos, mientras que en la segunda los productos del metabolismo son polimerizados. Esta segunda fase puede ser espontánea, o mediante enzimas de origen microbiano. Las estructuras aromáticas cíclicas pueden originarse de la degradación de la lignina o pueden ser generadas por el metabolismo de distintos microorganismos. Durante la fase de polimerización primero se originan los AH y luego de AF (Atlas y col., 2002).

Las SH interactúan con los compuestos orgánicos del suelo mediante puentes de hidrógeno, transferencia de carga, intercambio iónico, uniones covalentes adsorción hidrofóbica y mediante el reparto (Senesi y Chen 1989; Piccolo 1994).

Las superficies de los componentes minerales del suelo pueden por sí mismas catalizar muchas reacciones. Por ejemplo, los minerales de arcilla y los óxidos de Mn (III y IV) y Fe (III) catalizan reacciones de transferencia de electrones, tales como la

oxidación de fenoles y polifenoles con formación de sustancias húmicas (Nannipieri y col., 2003).

Comunidades microbianas del suelo

El suelo, por definición, soporta el crecimiento vegetal; además de poseer una gran diversidad de comunidades microbianas. La organización de las partículas del suelo confiere una heterogeneidad espacial para los microorganismos, los cuales viven en microhábitats (Torsvik y Ovreas 2002), que representan una pequeña proporción del espacio disponible. Los organismos interdependientes que comparten el mismo hábitat ocupando los distintos nichos ecológicos (es decir, desempeñando distintas funciones) forman un ecosistema. Una comunidad microbiana es un conjunto integrado de poblaciones microbianas que interactúan entre ellas ocupando distintos nichos, coexistiendo en un hábitat.

La diversidad microbiana es un término general que comprende la diversidad genética (cantidad y distribución de la información genética de las especies microbianas), la diversidad de las bacterias y los hongos que forman parte de las comunidades microbianas, y la diversidad ecológica, que es la variación en la estructura de las comunidades, la complejidad de las interacciones, el número de niveles tróficos y el número de agrupaciones. Así, la diversidad microbiana incluye el número de las distintas especies bacterianas y fúngicas (riqueza) y su abundancia relativa en la microbiota del suelo (Liu y col., 2006).

Se estima que existen más de 10^9 células (Gans y col., 2005) y 10^4 especies (Curtis y col., 2002) por gramo de suelo. Sin embargo, solo un 1-10 % de los microorganismos del suelo son cultivables (Torsvik y col., 2002). Es probable que esto se deba a la interdependencia entre microorganismos, a la imposibilidad de recrear las condiciones del suelo, y también el hecho que algunos microorganismos son cultivables tan sólo bajo ciertas condiciones fisiológicas (Heuer y col., 2001).

Los microorganismos son clave en muchas funciones del suelo, como en los ciclos biogeoquímicos y en la producción vegetal, resultando esenciales para la integridad de los ecosistemas terrestres (Falkowski y col., 2008). La diversidad de especies de una

comunidad microbiana permite gran variedad de respuestas en un ecosistema dinámico (Loreau 2010; Griffiths y Philippot 2013).

Los ciclos biogeoquímicos describen el reciclado continuo de materiales por actividades bioquímicas mediante los cuales los elementos circulan por vías características resultantes de la combinación de procesos biológicos, geológicos y químicos entre la parte biótica y abiótica de la ecósfera. Los microorganismos son capaces de llevar a cabo en modo conjunto y sinérgico los ciclos de la materia, por lo que es de vital importancia la preservación de la biodiversidad (Maletić y col., 2013).

La ecología, la actividad y la dinámica de los microorganismos del suelo puede verse afectada por varios factores ambientales como las fuentes de carbono y energía, los nutrientes minerales, los factores de crecimiento, la composición iónica, la disponibilidad acuosa, la temperatura, la presión, la composición del aire, la radiación electromagnética, el pH, el potencial de óxido-reducción, la superficie, las relaciones espaciales, la genética de los microorganismos y las relaciones entre ellos. Esto implica que en un suelo se puedan encontrar una gran variedad de poblaciones microbianas con capacidades metabólicas distintas, condicionadas también por la biodisponibilidad de las distintas fuentes de carbono y energía, que a su vez está restringida por las características fisicoquímicas propias de cada suelo (Husson 2013).

Los microorganismos desarrollaron distintas estrategias para sobrevivir y mantenerse en las comunidades con éxito. Un esquema de estas estrategias los clasifica a lo largo de un gradiente r - K , haciendo referencia a r como la tasa *per cápita* de aumento poblacional y a K como la capacidad de carga del medio. Los estrategas- r poseen una tasa de reproducción elevada, disponiendo de algunas adaptaciones competitivas, por lo que en general se mantienen en situaciones no limitadas por los recursos. Las poblaciones de estrategas- K son habitualmente miembros estables y permanentes de la comunidad resultando altamente competitivos en situaciones adversas (Brzeszcz y col., 2016).

Con el tiempo, conforme se suceden cambios ambientales, algunas poblaciones de una comunidad son sustituidas por otras mejor adaptadas para desempeñar una función, lo que provoca que la estructura de la comunidad evolucione. Algunos ecosistemas poseen diferentes nichos, lo que se refleja en una alta diversidad;

mientras que otros ecosistemas no tienen todos los nichos ocupados y por eso su diversidad es baja. El desarrollo de una comunidad implica una sucesión de poblaciones, que es un cambio ordenado y secuencial dentro de la comunidad. Cuando se llega a un conjunto de poblaciones relativamente estables, finaliza la sucesión, alcanzando la “comunidad clímax” (Atlas y col., 2002).

Las comunidades microbianas tienen la capacidad intrínseca de resistir los disturbios a los que es sometido el suelo (resistencia) y, posteriormente, alcanzar un nuevo estado estable, es decir de recuperarse (resiliencia). Un ecosistema se considera estable cuando es capaz de soportar un disturbio y volver a su estado original, luego de un desvío temporal respecto de dicho estado inicial (Griffiths y col., 2001).

Un disturbio es una perturbación biótica o abiótica que genera una respuesta fisiológica de la comunidad microbiana.

La Figura I.4 esquematiza la definición ingenieril (A) y la ecológica (B) de resistencia y resiliencia. Como puede observarse, según la definición A, la estabilidad es la respuesta inmediata a un disturbio (resistencia) y luego la recuperación a través del tiempo (resiliencia); mientras que ecológicamente, la resiliencia es la capacidad de resistir una perturbación antes de pasar a un nuevo estado estable.

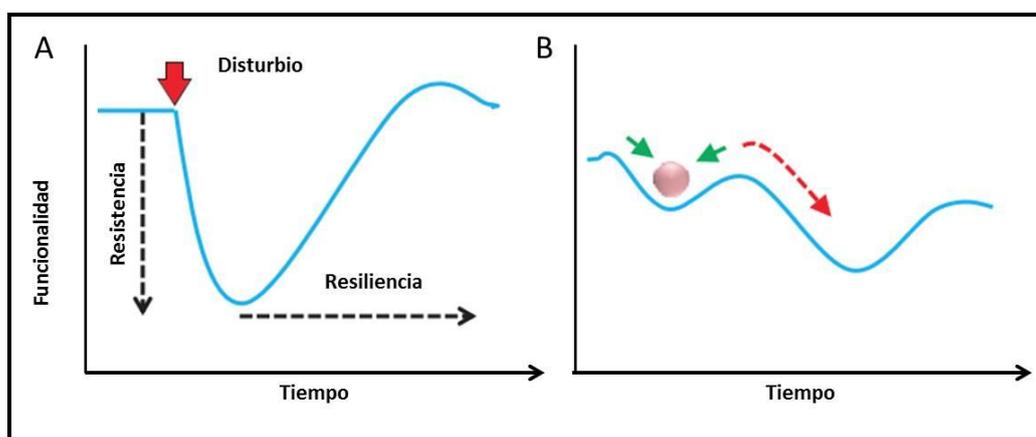


Figura I.4. Esquema de la respuesta de un sistema frente a una perturbación A) Definición ingenieril. B) Definición ecológica. Imagen tomada de Griffiths y Philippot, 2013.

Dada la complejidad y la variabilidad del suelo, un enfoque polifacético que involucre los aspectos físicos, químicos, biológicos y microbiológicos resultaría clave para conocer los procesos globales que contribuyen a la realización de los servicios ambientales esenciales que el suelo cumple.

Contaminación del suelo con hidrocarburos

El incremento de la población mundial llevó al uso de mayores cantidades de combustibles, al desarrollo de la industria química, al uso de fertilizantes, plaguicidas, y al desarrollo de compuestos farmacológicos, entre otros, con el objetivo de mantener y mejorar la calidad de vida (Gupta y col., 2015). Desafortunadamente, los procesos industriales resultan indispensables para el desarrollo humano, aunque no se realicen aplicando tecnologías ambientalmente saludables. El resultado de esto es la acumulación de contaminantes químicos en la biosfera, especialmente en suelos y sedimentos (Semple y col., 2001).

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) son compuestos ubicuos en el ambiente, que pueden generarse por eventos naturales (erupciones volcánicas, incendios forestales) y a través de la actividad antropogénica (Szczepaniak y col., 2016). La contaminación con PAHs genera gran preocupación por su potencial carcinogénico y mutagénico (Gupta y col., 2015; Szczepaniak y col., 2016). Por estos motivos, dichos compuestos se encuentran regulados por la USEPA (Environmental Protection Agency), siendo 16 prioritarios, tal como se detalla en la Figura I.5 (Peng y col., 2008).

Desde los años 40 se desarrolla en la Argentina la actividad petroquímica, como lo informa el Instituto Petroquímico Argentino. El petróleo es un combustible que está compuesto principalmente por hidrocarburos como cicloalcanos, alquenos, dienos, alquinos e hidrocarburos policíclicos aromáticos en distinta proporción (Nocentini y col., 2000; Shahi y col., 2016). Debido al progreso industrial resultó necesario implementar una regulación de los pasivos ambientales generados por este tipo de actividad, ya que la principal fuente de PAHs es ocasionada por derrames de petróleo ocurridos durante las maniobras de extracción, procesamiento y transporte (Towell y col., 2011). Particularmente en Argentina es alarmante la incidencia de este tipo eventos en distintas regiones del territorio nacional, asociadas a la industria petroquímica.

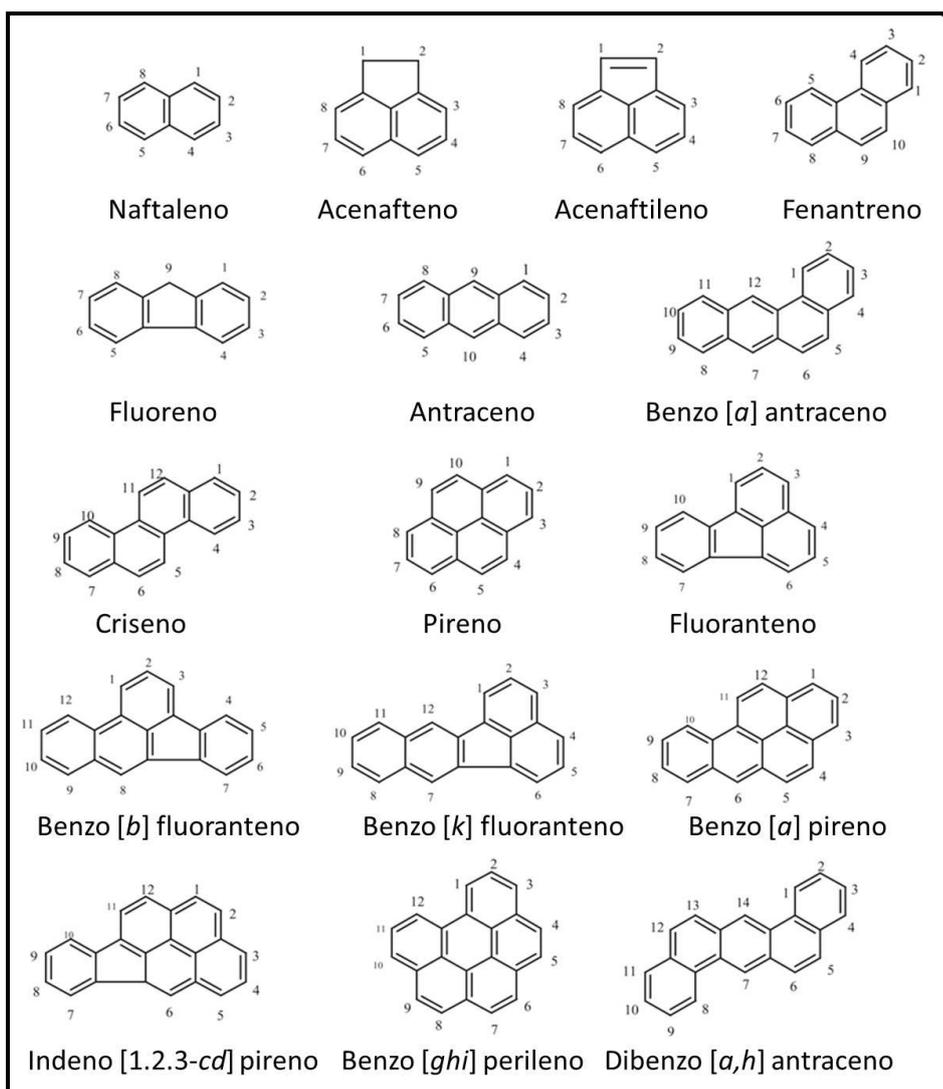


Figura I.5. Estructura química de los 16 hidrocarburos policíclicos aromáticos incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la EPA.

La Ley Nacional 24.051 contempla la generación, manipulación, transporte y tratamiento de residuos peligrosos generados en el ámbito nacional. En el decreto reglamentario 831/91, correspondiente a la mencionada ley, quedan establecidos los valores guía de PAHs en suelos en el territorio nacional (Anexo II) estableciendo las categorías de uso del suelo, según industrial, residencial o agrícola.

Por otro lado, la Ley Nacional 24.611 sobre la preservación del ambiente y conservación de los recursos naturales; la Ley Nacional 25.137 sobre el uso de protocolos que enmiendan daños ocasionados por la contaminación por hidrocarburos y la Ley Nacional 25.378 que declara de interés nacional la restauración del ambiente son algunos ejemplos que reflejan el especial énfasis en la reducción de la generación

de residuos, reciclado y principalmente en la biorremediación de residuos, antes de su disposición final.

Los PAHs son compuestos insaturados, que poseen dos o más anillos aromáticos fusionados. Debido a sus propiedades químicas, como su alta hidrofobicidad, baja volatilidad y solubilidad en agua y alta adsorción, son compuestos altamente recalcitrantes principalmente en sistemas heterogéneos como el suelo (Yen y col., 2011). Con el incremento del peso molecular, estas propiedades se acentúan, así como su peligrosidad.

En general los suelos contaminados con hidrocarburos contienen mezclas complejas, que incluyen PAHs de bajo peso molecular (2 y 3 anillos aromáticos) y de alto peso molecular, con más de 3 anillos aromáticos (Lafortune y col., 2009). Los primeros son relativamente más volátiles y más solubles en agua que los de alto peso molecular, y además son más susceptibles a la biodegradación (Pannu y col., 2004).

En este contexto, resulta indispensable conocer las características del suelo debido a que sus constituyentes cumplen un rol clave en los procesos de adsorción del contaminante (Tsibart y Gennadiev 2013), lo que gobierna su movilidad (Abdel-Shafy y Mansour 2015) y consecuentemente su disponibilidad a los microorganismos del suelo (Semple y col., 2007).

Varios autores han descrito que las comunidades microbianas de suelos, aun sin contaminación, poseen poblaciones con capacidad de degradar distintos hidrocarburos, evidenciando su ubicuidad y su potencial degradativo (Morelli y col., 2005; Del Panno y col., 2005; Pessacq y col., 2015; Festa y col., 2016a).

Cuando los PAHs ingresan a la matriz de suelo, se produce una sucesión secundaria de la comunidad microbiana del mismo, en la que aquellas poblaciones capaces de metabolizar y/o adaptarse a la presencia del contaminante serán beneficiadas y su rol resultará fundamental en la eliminación del contaminante (Kuiper y col., 2004). La contaminación con estos compuestos provoca un estrés sobre la comunidad autóctona del suelo, debido no solo a la presencia del contaminante, sino a la acumulación de intermediarios metabólicos tóxicos como por ejemplo el catecol y sus derivados (Bobadilla Fazzini y col., 2010). Como resultado de la sucesión

secundaria, la comunidad resultante tienden a ser menos diversa, según la contaminación y el tiempo de exposición, aunque con mayor grado de especialización (González y col., 2011).

Existe una amplia diversidad de microorganismos que poseen enzimas específicas involucradas en la degradación de PAHs, principalmente bacterias, algas y hongos (Johnsen y col., 2005; Haritash y Kaushik 2009; Lu y col., 2011).

Las poblaciones individuales pueden metabolizar solo un rango limitado de sustratos hidrocarbonados, por lo que en muchos casos resulta esencial la presencia de una comunidad microbiana para cubrir las capacidades enzimáticas requeridas cuando se trata de mezclas complejas de hidrocarburos (Mrozik y Piotrowska-Seget 2010).

Los géneros de bacterias más relevantes con capacidad de metabolizar hidrocarburos son *Pseudomonas* spp (Fuenmayor y col., 1998), *Sphingomonas* (Jouanneau y col., 2016), *Cycloclasticus* (Marcos y col., 2012), *Burkholderia* (Habe y Otori 2003), *Rhodococcus* (Di Gennaro y col., 2001), *Polaromonas* (Pumphrey y Madsen 2007), *Neptunomonas* (Hedlund y col., 1999), *Janibacter* (Zhang y col., 2009), *Achromobacter* (Scelza y col., 2010), *Acinetobacter* (Kostka y col., 2011), *Alcaligenes* (Roy y col., 2014), *Arthrobacter* (Kallimanis y col., 2009), *Bacillus* (Nkwelang y Kamga 2008), *Flavobacterium* (Chauhan y col., 2008), *Nocardia* (Quatrini y col., 2008) y *Mycobacterium* (Vila y Grifoll 2009) entre otros (Cébron y col., 2008; Lu y col., 2011). Por su parte, los hongos degradadores de hidrocarburos como *Trichoderma*, *Mortierella* spp., *Aspergillus* y *Penicillium* spp. son los más comunes en suelos (Leahy y Colwell 1990).

La Figura 1.6 esquematiza las etapas iniciales de las rutas de oxidación microbiana de PAHs llevadas a cabo por bacterias y hongos. La degradación bacteriana es mediada por la actividad de las enzimas Dioxigenasas, en hongos blancos de podredumbre el ataque inicial es mediado por la actividad de las Lacasas; y en los hongos generalistas por la Citocromo P-450 monoxigenasa (Cerniglia 1992).

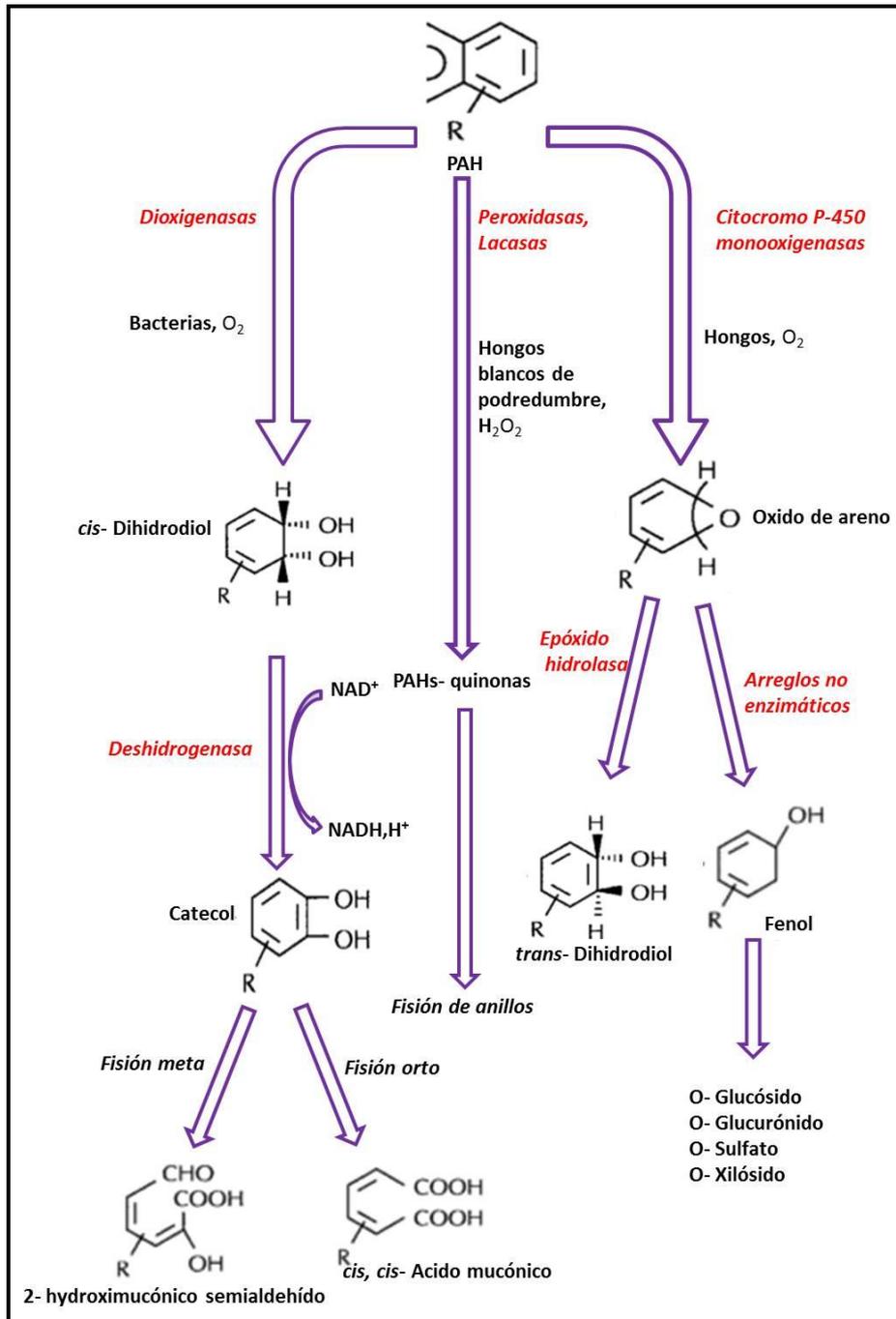


Figura I.6. Etapas iniciales de la degradación de PAHs bacteriana y fúngica (Cerniglia 1992).

Las dioxigenasas son enzimas que inician el metabolismo aeróbico de los PAHs (Cébron y col., 2008). La degradación aerobia se inicia por la oxigenación de la estructura de anillo para formar un *cis*-dihidrodiol seguida de una deshidrogenación para formar compuestos intermedios de dihidroxilación (Cerniglia 1992; Habe y Omori 2003; Peng y col., 2008; Cébron y col., 2008; Lu y col., 2011; S. Chen y col., 2015).

La secuencia de ADN que codifica la subunidad alfa es conservada entre dioxigenasas que comparten sustrato (Iwai y col., 2011; Marcos y col., 2012) y ha sido descrita en un amplio rango de bacterias gram negativas y algunas gram positivas (Cébron y col., 2008; Habe y Omori 2003; S. Chen y col., 2015).

La Figura I.7 presenta las primeras reacciones de oxidación del fenantreno, a modo de ejemplo. El ácido 1-hidroxi-2-naftoico puede entrar en distintas vías oxidativas (como por ejemplo la que involucra a la enzima 1 hidroxí 2 naftoato hidrolasa) para generar finalmente ácido salicílico como producto; o como alternativa, la vía que involucra a la enzima hidroxí-2-naftoato dioxigenasa que genera ácido protocatecuato. El ácido salicílico puede ser sustrato de distintas enzimas, como por ejemplo la salicilato hidroxilasa (vía del catecol) o de la salicilato 5-hidroxilasa (vía del ácido gentísico). Ambas vías generan intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos, TCA (Kim y col., 2009).

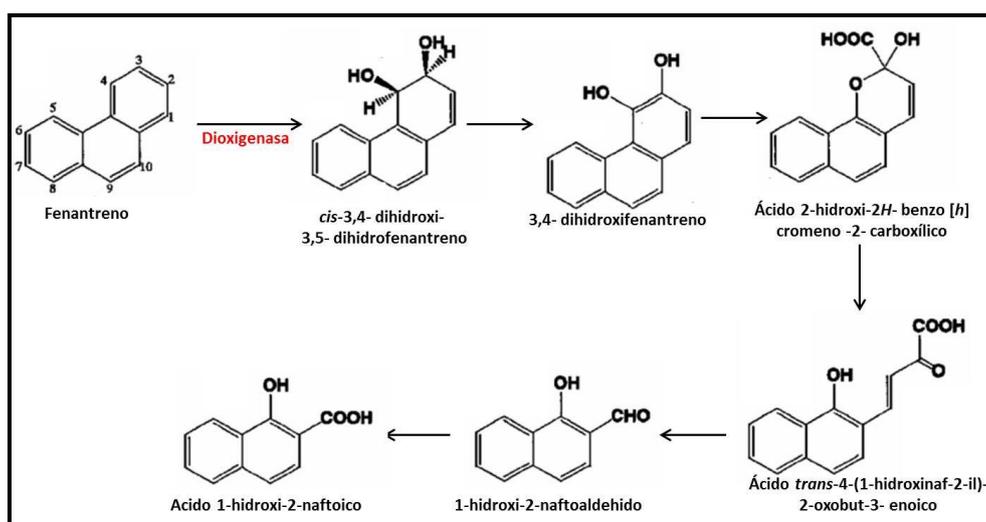


Figura I.7. Ruta catabólica inicial propuesta para el metabolismo de fenantreno por bacterias aerobias (Habe y Omori 2003).

Considerando la complejidad de las vías oxidativas de estos compuestos, resulta fundamental la presencia de una comunidad microbiana capaz de llevar a cabo la biodegradación de modo sinérgico, para evitar la acumulación de intermediarios metabólicos tóxicos.

Es posible describir diferentes tipos de contaminación en función de la concentración y del tiempo de exposición del contaminante en el suelo. La contaminación de áreas extensas, con bajas concentraciones de hidrocarburos y la falta de fuentes puntuales identificables de esa contaminación, se denomina contaminación difusa. La mayor parte de los estudios sobre contaminación se han focalizado en sitios industriales, petroquímicos o suelos impactados por derrames de petróleo, es decir que es posible identificar la fuente de contaminación. Estas regiones están limitadas a una zona con altas concentraciones de hidrocarburos que provienen de una única fuente de contaminación (Johnsen y Karlson 2007). En la Figura I.8 se presenta un esquema de los procesos que gobiernan la eliminación de PAHs en suelos contaminados a través del tiempo.

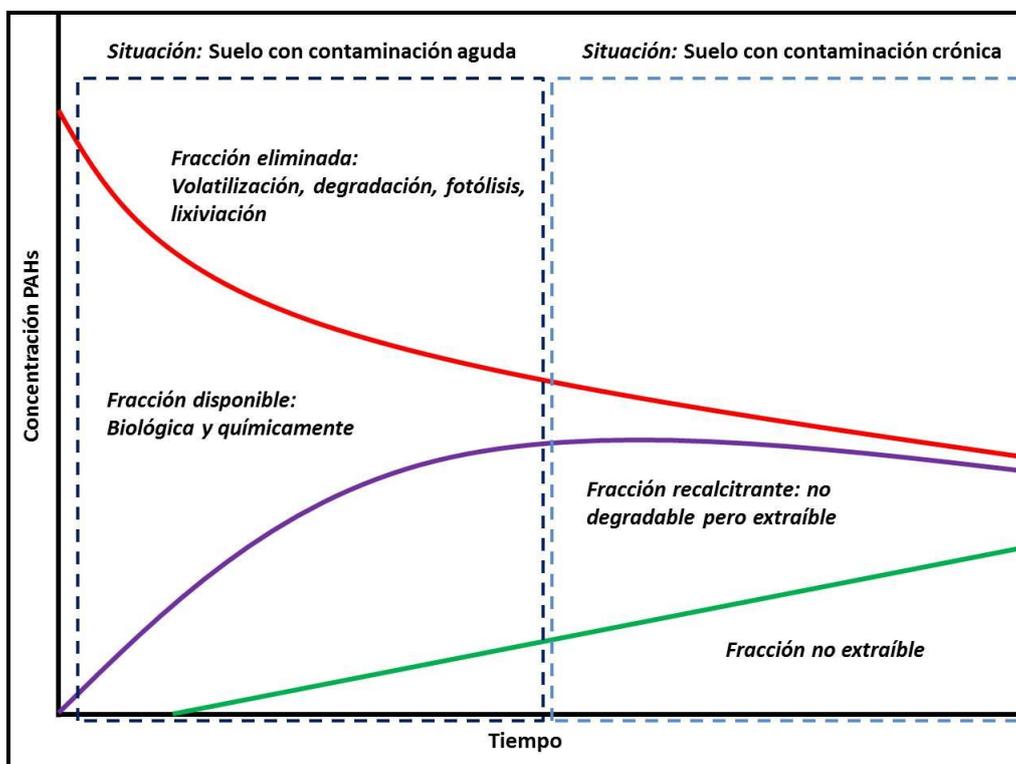


Figura I.8. Concentración relativa de PAHs a través del tiempo en los distintos procesos: Transferencia: fracción eliminada; Degradación: fracción disponible y Secuestramiento: fracción recalcitrante. Imagen tomada de Stokes y col., 2006.

Cuando se introduce una alta concentración de hidrocarburos en el suelo, como por ejemplo cuando ocurre un derrame accidental, se trata de un suceso de contaminación aguda. En estos casos, una significativa proporción de las poblaciones mueren por efectos tóxicos, mientras que otras sobreviven, desarrollando en el nuevo

ambiente. La comunidad seleccionada durante la sucesión secundaria, será la responsable de la eliminación de los hidrocarburos. Estos suelos se caracterizan por mostrar una eficiencia de eliminación del contaminante relativamente alta, ya que estos se encuentran disponibles para el metabolismo microbiano (Stokes y col., 2006).

Como puede apreciarse en la Figura I.8, ante una situación de contaminación aguda toma relevancia la degradación microbiana de la fracción biodisponible del contaminante.

Cuando un sitio recibe periódicamente una contaminación, o cuando ya no se observa eliminación del contaminante con el transcurso del tiempo, estamos en presencia de un suelo crónicamente contaminado (Stokes y col., 2006). A través del tiempo, los contaminantes son degradados (biótica o abióticamente) conforme la comunidad microbiana desarrolla una dinámica de poblaciones asociada a los productos del metabolismo degradador. Con el transcurso del tiempo, alguna fracción del contaminante será secuestrada por la matriz del suelo (fracción recalcitrante) y una comunidad altamente especializada será establecida, resultando ambos factores posibles limitantes de la eliminación de los contaminantes (Huesemann y col., 2004).

El *secuestro* de los PAHs incluye procesos como por la incorporación de los PAHs a las estructuras de las sustancias húmicas, la conversión y unión a residuos de la matriz del suelo y por la retención en sitios inaccesibles de la matriz. El contenido de Materia Orgánica del Suelo (MOS) y su calidad contribuyen al secuestro de los PAHs, principalmente los de mayor peso molecular, debido a su elevada hidrofobicidad (Alexander 2000; Jonsson y col., 2007; Kästner & Miltner 2016).

La Figura I.9 esquematiza los principales procesos que ocurren cuando los PAHs son liberados al suelo.

Los PAHs son adsorbidos eficientemente sobre la superficie de la MOS y lentamente penetran dentro de las cavidades (k_1 en la Figura I.9) y/o difunden dentro de la fracción orgánica del suelo (k_2 en la Figura I.9). Varios autores demostraron que la concentración de los contaminantes y sus propiedades fisicoquímicas afectan el proceso de captura de los mismos (Chung y Alexander 1999; Tang y col., 2002; Hwang y Cutright 2003; Flotron y col., 2005).

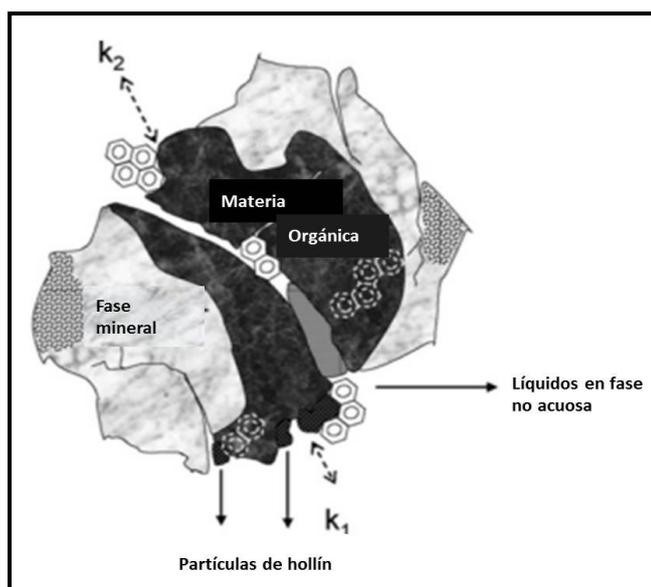


Figura I.9. Partícula de suelo donde se esquematizan los procesos que ocurren al liberar PAHs al suelo. Imagen tomada de Jonsson y col., 2007.

La MOS no es homogénea ya que se compone de proporciones variables de residuos de combustión, líquidos en fase no acuosa y materia orgánica natural, los que varían en su afinidad por los contaminantes.

Los PAHs son fuertemente adsorbidos por ejemplo a las partículas de hollín, pero también pueden repartirse en las sustancias húmicas (Alexander 2000; Sun y col., 2003), y esta adsorción diferencial puede afectar el éxito de cualquier proceso de remediación (Jonsson y col., 2007). Del mismo modo, la cinética de desorción de los contaminantes se asemeja al comportamiento de biodegradación bifásica, que consiste en una rápida eliminación inicial seguida de una eliminación lenta a largo plazo, por lo que la desorción controla los procesos de biodegradación (Williamson y col., 1997).

Incluso en suelos con bajo contenido de materia orgánica, la disponibilidad de PAHs puede ser baja debido a que son secuestrados en los poros y espacios vacíos. Hwang y Cutright (2003) estudiaron la importancia de la distribución del tamaño de las partículas del suelo sobre el secuestro de PAHs, y demostraron que los minerales de arcilla tienen una mayor capacidad de adsorción que la MOS. Las superficies inorgánicas, que consisten en minerales, óxidos y metales, también pueden tener un fuerte impacto en la disponibilidad de los PAHs (Amellal y col., 2001; Sun y col., 2003; Flotron y col., 2005).

En este contexto, la velocidad de transferencia de masa modulada por los procesos de adsorción/desorción, las limitaciones en la biodisponibilidad de los PAHs debido al *secuestro*, o bien la reducida diversidad metabólica de la comunidad microbiana y/o la falta de sustratos co metabólicos son factores responsables de la lenta cinética de biodegradación que caracteriza a los suelos crónicamente contaminados (Huesemann y col., 2004).

Varios autores remarcan que la disminución de la biodisponibilidad, lixiviabilidad, y toxicidad al avanzar el tiempo de tratamiento, pueden ser considerados indicadores del proceso de biorremediación (Loehr y col., 2000; Stroo y col., 2000; Tabak y col., 2003). En este contexto, Huesemann y col., 2004 sugieren que sería apropiado medir la liberación del contaminante para confirmar que no está biodisponible, para poder evaluar el riesgo ambiental.

Así mismo, la evaluación de la toxicidad sería también relevante durante el tratamiento de remediación, ya que la reducción en el contenido de PAHs no implica una disminución de la toxicidad (Han y col., 2015). La acumulación de productos de degradación de los PAHs, es decir intermediarios metabólicos como dihidrodioles, fenoles y óxidos de areno, pueden resultar en un aumento de la toxicidad, debido a sus propiedades mutagénicas y/o carcinogénicas (Morelli y col., 2001; Chaîneau y col., 2003).

Tecnologías de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos

Debido a todo lo expuesto, resulta indispensable el desarrollo y la aplicación de técnicas de remediación en sitios impactados por la presencia de estos compuestos, con el fin de recuperar las propiedades del suelo y de este modo los servicios ambientales esenciales del mismo.

Es posible agrupar las tecnologías para la recuperación de suelos en cinco grandes grupos: 1) Tecnologías de remediación fisicoquímicas; 2) Tecnologías de remediación térmicas; 3) Tecnologías de remediación biológicas; 4) Tecnologías de remediación químicas y 5) Tecnologías de remediación combinadas (Lim y col., 2016).

Dentro de las **tecnologías de remediación fisicoquímicas** se pueden mencionar la extracción con solventes, en la que utilizando líquidos no acuosos se separan y se concentran los contaminantes orgánicos (Gan y col., 2009). Como agentes para la extracción pueden utilizarse mezclas de solventes (Li y col., 2012), surfactantes (Sui y col., 2014) y fluidos supercríticos (Al-Marzouqi y col., 2007) entre otros. También se incluye la ventilación del suelo (Lee y col., 2002), la flotación (Tao 2005); y la aplicación de ultrasonido (Flores y col., 2007). Son tecnologías eficientes en términos de porcentaje de eliminación. Sin embargo resultan tecnologías de alto costo y producen una contaminación secundaria por la introducción del solvente utilizado, que puede persistir en el suelo.

El principio de **tecnologías de remediación térmicas** es la aplicación de calor para la remoción del contaminante. Actualmente las principales son la incineración (Anthony y Wang 2006), la desorción térmica (Tatàno y col., 2013) y el calentamiento mediante la aplicación de microondas (Chien 2012). Estas tecnologías son rápidas, sencillas y eficientes. Sin embargo resultan de alto costo y generan contaminación atmosférica e impactan negativamente en la calidad química y biológica del suelo tratado (Pape y col., 2015).

Las **tecnologías de remediación biológicas** aprovechan y/o incentivan los procesos de biodegradación naturales del suelo (S. Y. Wang y col., 2016). De este modo, emplea organismos vivos o enzimas derivadas de ellos para remediar un sitio

impactado por la presencia de un contaminante, generando compuestos inocuos (Seo y col., 2009; Maletić y col., 2013). Esta tecnología brinda la posibilidad de tratar el contaminante *in situ*, es decir en su lugar original, o bien, *ex situ*, implicando su traslado al sitio de tratamiento.

Las tecnologías de remediación biológicas pueden resultar en muchos casos de menor costo y no son destructivas del suelo, por lo que tiene gran aceptación como tratamiento para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos (Pandey y col., 2009). Sin embargo, no siempre resultan efectivas para la eliminación de PAHs, y su aplicabilidad en ciertos ambientes es limitada cuando se trata de suelos contaminados con mezclas complejas de PAHs (Jiang y col., 2016).

Es posible aplicar distintas estrategias que aceleren la velocidad de eliminación biológica del contaminante. Por ejemplo la fitorremediación hace uso de las interacciones naturales entre las plantas, el suelo y los microorganismos (Gan y col., 2009). Particularmente, la micorremediación aprovecha las enzimas fungicas secretadas al ambiente, como por ejemplo las peroxidasas y lacasas (Lladó y col., 2013), que pueden participar activamente en la eliminación de los hidrocarburos.

Una estrategia relativamente simple es la estimulación de las comunidades autóctonas a través del acondicionamiento del suelo por riego y aireación.

El principio de la bioestimulación, reside en el ajuste de las variables fisicoquímicas claves del sitio a tratar, de forma de estimular el crecimiento de la comunidad microbiana autóctona degradadora utilizando nutrientes inorgánicos y/u orgánicos (Sayara y col., 2011).

El bioaumentación consiste en potenciar las capacidades biodegradativas de los sitios contaminados a través de la inoculación de microorganismos con determinadas capacidades catabólicas (Madueño y col., 2011; Festa y col., 2016a; Festa y col., 2016b). En la inoculación se utilizan microorganismos con capacidades relevantes, como la capacidad de degradar hidrocarburos, de producir surfactantes, de formar estructuras de adherencia que faciliten el acceso al contaminante, entre otras (Haritash y Kaushik 2009), de modo de favorecer su establecimiento y sobrevivencia en el sitio (Szulc y col., 2014). Actualmente sigue siendo una estrategia de resultados controversiales.

La atenuación natural monitoreada es considerada una estrategia de biorremediación, donde a diferencia de las anteriores, se verifica la capacidad degradadora de la comunidad autóctona sin ninguna intervención que estimule su metabolismo (Lu y col., 2011).

Las **tecnologías de remediación químicas** incluyen por ejemplo, la aplicación de corrientes eléctricas y el uso de oxidantes químicos fuertes (Lim y col., 2016).

La electrocinética, es una herramienta basada en la aplicación de una corriente eléctrica al suelo, empleando un ánodo y un cátodo, que promueve la migración del contaminante hacia el cátodo (Ranjan y col., 2006). La combinación de electroósmosis, electromigración y electroforesis son ejemplos de estrategias que potencian la eficiencia de esta tecnología (Kim y col., 2011).

El principio del uso de oxidantes químicos se basa en su característica electrofílica, es decir su afinidad por dobles enlaces como los presentes en los PAHs y SH. Los oxidantes más utilizados son el ozono (O_3), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión permanganato (MnO_4^-) y el anión persulfato ($S_2O_8^{2-}$) (Kulik y col., 2006; Sutton y col., 2011).

En muchos casos, las estrategias de oxidación mejoran la recuperación general del suelo por (1) la disminución de la concentración de contaminantes a niveles menos tóxicos para la comunidad del suelo (Chapelle y col., 2005), (2) la mejora de la biodisponibilidad de los contaminantes (Miller y col., 1996; Kulik y col., 2006), (3) la producción de compuestos biodegradables (Miller y col., 1996; Lee y Hosomi 2001; Namkoong y col., 2002; Nam y col., 2001), y/o (4) la generación de oxígeno que colabora en la transformación biológica aeróbica de contaminantes (Kulik y col., 2006).

La eficiencia de este tipo de tratamientos depende del oxidante utilizado, forma de aplicación, el tipo de suelo, concentración y disponibilidad del contaminante y la materia orgánica del suelo, entre otros (Mora y col., 2014).

A pesar de ser herramientas potentes y de bajo costo, las tecnologías de remediación química suelen no ser ambientalmente amigables, ya que pueden dar lugar a cambios indeseables, provocando la reducción en las comunidades microbianas del suelo (Sahl y Munakata-Marr 2006; Richardson y col., 2011), la movilización de

metales (Crimi y Siegrist 2003) y nutrientes (Kim y col., 2010; Sutton y col., 2014b), cambios estructurales y cuantitativos sobre la materia orgánica del suelo (Pan y col., 2012), el cambio de pH, el aumento de la conductividad eléctrica, entre otros.

Las **tecnologías de remediación combinadas** comprenden la aplicación secuencial de las estrategias de remediación mencionadas anteriormente, con el fin de potenciar las ventajas y superar las limitaciones individuales. Es posible, por ejemplo, acoplar las tecnologías físicas y químicas de remediación, como la electrocinética/oxidación; o la extracción con solventes seguida de la biorremediación (Sutton y col., 2011; Lim y col., 2016).

La mayoría de las investigaciones en esta línea pretenden recuperar la comunidad microbiana, luego del uso de oxidantes químicos, empleando tecnologías de remediación biológicas sencillas, con resultados controversiales. En este sentido, existen pocos estudios acerca de la recuperación de la calidad global del suelo. Los autores describen que el éxito de las tecnologías combinadas depende del tipo de suelo y del oxidante y dosis empleados.

Por ejemplo, Richardson y col., 2011 describieron que la aplicación de persulfato de sodio en sistemas de suelo estabilizado en columnas permite eliminar solo la fracción biodisponible del contaminante; y que es posible recuperar la comunidad generalista y especializada en la degradación de hidrocarburos, aunque la última requiere más tiempo.

De modo similar, Laurent y col., 2012 estudiaron la aplicación de distintas dosis de H₂O₂ en sistemas *batch*. La mayor eliminación de PAHs se observó al emplear la mayor dosis de oxidante. Sin embargo, empleando dosis más bajas, luego de 5 semanas de tratamiento recuperó la población microbiana generalista y degradadora, y evitó incrementar la toxicidad de los extractos acuosos.

Resulta de particular interés el trabajo de Mora y col., 2014, donde los autores describen el efecto estimulador sobre la comunidad autóctona del suelo tras el agregado bajas dosis de persulfato de sodio, en suelos contaminados con fenantreno. Esta estimulación se vio reflejada en la eliminación adicional de fenantreno y en la comunidad cultivable y no cultivable. Al aumentar la dosis de oxidante, la comunidad

generalista no logró recuperarse debido al impacto negativo, producto de la acidificación y salinidad.

Sutton y col., 2014b empleando sistemas *batch*, de suelo tratado con H₂O₂ en distintas dosis, los autores describen que la mayor eliminación del contaminante se observa utilizando dosis bajas de oxidantes, en los sistemas suplementados con nutrientes inorgánicos. Además, la oxidación de MOS provee nutrientes que desvían el metabolismo, preferentemente al consumo de la materia orgánica oxidada, retardando la biodegradación de hidrocarburos.

En otros estudios, Sutton y col., 2014c, usando distintos oxidantes en sistemas *batch*, estimulados con sales, los autores describen la recuperación de la comunidad microbiana autóctona cuando el tratamiento se realiza por agregado de H₂O₂, no así al emplear otros oxidantes (MnO₄⁻ ó persulfato de sodio).

En la misma línea, Sutton y col., 2014a, los autores describen que los cambios ocasionados en términos de movilización de compuestos carbonados, por la aplicación de persulfato de sodio, resultan estimulatorios para la comunidad microbiana autóctona, ya que permite la recuperación de la comunidad a expensas de su consumo. De modo contrario, los cambios ocasionados en la mineralogía y matriz del suelo podrían afectar a largo plazo la sustentabilidad de la misma, independientemente del aporte de nutrientes inorgánicos exógeno.

El avance en este campo permite incrementar la eficiencia de eliminación de contaminantes, intentando preservar y/o recuperar la diversidad de la comunidad microbiana del suelo.

Tecnologías de remediación empleadas en este trabajo

La remediación de suelos crónicamente contaminados con PAHs, donde la velocidad de eliminación del contaminante es baja, requiere del desarrollo de estrategias tendientes a promover el aumento de la biodisponibilidad del contaminante y a estimular la comunidad microbiana con el objetivo de lograr el éxito del proceso de eliminación preservando la funcionalidad del suelo.

1. *Tecnologías de remediación biológicas*

La disponibilidad de macronutrientes (N y P) suele ser el parámetro a corregir en el suelo contaminado para estimular el metabolismo celular de su comunidad microbiana autóctona. Una relación de C/N/P de 100:10:1 se considera óptima, en términos generales, para el metabolismo microbiano (Teng y col., 2010; Wu y col., 2016). Varios estudios mostraron incrementos en las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados luego del agregado de nutrientes (Chaîneau y col., 2003; Sarkar y col., 2005; Nikolopoulou y Kalogerakis 2008; Liu y col., 2010). Sin embargo, también se han descrito efectos inhibitorios en la degradación de hidrocarburos por la adición de nutrientes inorgánicos. Particularmente el uso de fertilizantes inorgánicos puede incrementar la salinidad del suelo, disminuyendo el potencial osmótico; inhibiendo directamente así la actividad microbiana (Braddock y col., 1997; Mohn y col., 2001; Ferguson y col., 2003; Walworth y col., 2007).

La acción de los nutrientes inorgánicos puede estar limitada debido a las interacciones químicas con los minerales del suelo. Por ejemplo, el amonio se puede unir a las arcillas por intercambio catiónico y el fosfato puede unirse y precipitar con iones calcio, hierro y aluminio (Morgan y Watkinson 1992).

El éxito de la bioestimulación con N y P resulta dependiente del tipo de nutrientes agregado (sales inorgánicas, fertilizantes comerciales), pero también de la metodología para realizar la estimulación, es decir, si el agregado se realiza en una aplicación o en etapas, del ambiente afectado (propiedades fisicoquímicas) e incluso

del tipo de hidrocarburo involucrado (Breedveld y Sparrevik 2000; Emami y col., 2014), por lo que resulta esencial optimizar la estrategia considerando el suelo a remediar.

La bioestimulación puede realizarse también mediante el agregado de distintos tipos de materia orgánica, por ejemplo glucosa, almidón, succinato de sodio (Teng y col., 2010), harina de pescado (Dias y col., 2015), compost maduro (Gandolfi y col., 2010) entre otros.

En el compostaje tradicional, que es el proceso empleado para la producción del compost maduro, se utilizan residuos orgánicos y agentes de volumen, estos últimos son materiales que proveen la aireación necesaria para asegurar la transferencia de oxígeno. El producto final resultante del proceso de compostaje es de gran interés en la aplicación al suelo como fertilizante o enmienda orgánica (Sayara y col., 2009; M. Chen y col., 2015).

De acuerdo al metabolismo microbiano y a la producción de calor asociada al mismo, se pueden distinguir tres fases durante el compostaje tradicional (Neher y col., 2013): La fase mesófila, en la que la comunidad microbiana crece y se adapta a las condiciones, con temperaturas moderadas de hasta 45° C. La fase termófila, que se caracteriza por mostrar un intenso metabolismo microbiano, consumo de oxígeno con el consecuente incremento de temperatura, en algunos casos superior a 70° C y finalmente la fase de curado, donde los sustratos orgánicos fácilmente disponibles se agotan y el metabolismo microbiano desciende, conllevado una disminución de la transformación de compuestos orgánicos.

El uso enmiendas orgánicas (como el compost maduro) sobre el suelo contaminado proporcionan una comunidad alóctona activa al sistema a tratar (bioaumento) (Sayara y col., 2010a; Kästner y Miltner 2016) y proveen también a los suelos N y P (bioestimulación) (Antizar- Ladislao y col., 2004; M. Chen y col., 2015).

El compostaje del suelo es un proceso biológico aeróbico que emplea los materiales necesarios para un compostaje tradicional más el agregado de suelo contaminado, resultando una tecnología de remediación biológica. El proceso puede realizarse al aire libre o en reactores cerrados (Beaudin y col., 1999).

Durante el compostaje los microorganismos son responsables de la mineralización y humificación de la materia orgánica en condiciones óptimas de temperatura, de disponibilidad de oxígeno y humedad, lo que puede aumentar la cinética de enzimas implicadas en la degradación de los PAHs y en su solubilidad (Antizar-Ladislao y col., 2006 a; Kästner y Miltner 2016). Distintos autores evidenciaron que en el transcurso del proceso de compostaje los microorganismos degradan los PAHs posiblemente por co-metabolismo con los sustratos orgánicos añadidos (Beaudin y col., 1999; Wan y col., 2003).

El compostaje y la estimulación con compost maduro tienden a mejorar las propiedades físicas y químicas del suelo, como la capacidad de retención de agua, la aireación; lo que favorece el metabolismo microbiano (Kästner y Miltner 2016). Así mismo, pueden tener efectos adversos sobre la eliminación de PAHs ya que estos pueden ser secuestrados en la matriz durante la humificación, a causa de la materia orgánica agregada en este tipo de tratamiento, disminuyendo así su biodisponibilidad y por consiguiente, su biodegradación (Oleszczuk 2007; Asquith y col., 2012).

2. Tecnologías de remediación químicas: Aplicación de persulfato de amonio

El uso de tecnologías de remediación química, concretamente la aplicación de oxidantes en suelos, son estrategias de bajo costo y efectivas, considerando la rápida eliminación del contaminante (Kulik y col., 2006; Sutton y col., 2011).

De los oxidantes empleados en estos tratamientos, el uso del anión $S_2O_8^{2-}$ (PS) es el más reciente (Tsitonaki y col., 2010). Este compuesto es más estable que el H_2O_2 y el O_3 (Huang y col., 2002) y no reacciona con la materia orgánica del suelo con tanta eficiencia como el MnO_4^- . Estas propiedades lo convierten en un oxidante atractivo porque puede persistir durante semanas en las capas subterráneas, puede ser inyectado en altas concentraciones, transportado en medios porosos y es capaz de desplazarse por difusión o por diferencia de densidad hacia materiales de baja permeabilidad (Huling y Pivetz., 2006).

La activación del PS conduce a la formación de radicales libres sulfato ($SO_4^{\cdot-}$) que por su naturaleza son altamente oxidantes ($E^0=2.6$ V (Tsitonaki y col., 2010)), y capaces de iniciar reacciones en cadena que afectan a la mayoría de los compuestos orgánicos.

La activación del PS puede realizarse de distintas maneras, por calor (Mora y col., 2009), por fotólisis UV (Rosso y col., 1999), mediante la activación alcalina (Furman y col., 2011) o por agregado de metales de transición (Anipsitakis y Dionysiou 2004), lo que permite regular la degradación de los contaminantes en espacio y tiempo.

Particularmente, varios trabajos han informado que el PS se puede activar por las formas solubles o minerales de Fe presente en el suelo (Do y col., 2010; Fang y col., 2013; Mora y col., 2014; Zhao y col., 2015). Esto resulta de gran interés ya que en algunos casos no sería necesaria la suplementación de metales para la activación del PS. Sin embargo, otros autores encontraron que el contenido de hierro presente en el suelo no siempre resulta suficiente para la activación del PS, requiriendo suplementar con sales de hierro el suelo a tratar (Ahmad y col., 2010).

Los radicales $SO_4^{\cdot-}$ pueden reaccionar también con la MOS y con aniones abundantes del suelo, como Cl^- ; HCO_3^- y CO_3^{2-} , provocando entre otras cosas, una disminución en la eficiencia de oxidación del contaminante (Tsitonaki y col., 2010), con el consecuente incremento de la demanda de oxidante.

La oxidación de la MOS y el descenso de pH producidos por la aplicación de PS, provocan un impacto negativo sobre las comunidades microbianas y cambios en la matriz del suelo (Sutton y col., 2014a).

3. Tecnologías de remediación combinadas: Aplicación de distintas tecnologías de remediación biológicas post aplicación de persulfato de amonio

Debido a las limitaciones de las tecnologías de remediación biológica en suelos crónicamente contaminados con mezclas complejas de hidrocarburos y al impacto generado por los procesos oxidativos sobre la estructura del suelo y sus comunidades microbianas, en los últimos años se puso especial énfasis en la aplicación de tecnologías combinadas.

En este contexto, la oxidación con PS de un suelo crónicamente contaminado con PAHs resultaría efectiva en términos de eliminación del contaminante. Sutton y col., 2014a han descrito que la aplicación de PS, provoca la oxidación de la MOS, lo que resulta en un incremento en la solubilidad y la biodisponibilidad de los PAHs. Además,

los cambios asociados a la oxidación de la MOS y la acumulación de productos de degradación, conllevan a la reducción de la comunidad microbiana autóctona.

Varios autores observaron que la comunidad microbiana autóctona puede recuperarse, dependiendo de la dosis y modo de aplicación del oxidante, variando el tiempo de recuperación (Mora y col., 2014; Richardson y col., 2011; Sutton y col., 2014a).

El agregado de enmiendas orgánicas luego de la aplicación de tecnologías de remediación química podría revertir los efectos producidos por la oxidación sobre la matriz del suelo. Así mismo, su carácter dual (bioestimulación y bioaumento) permitiría estimular la comunidad microbiana resistente aportando nuevas capacidades que eventualmente se establecerían constituyendo una comunidad funcional.

HIPÓTESIS

- I. La aplicación de estrategias de compostaje al suelo crónicamente contaminado promueve la eliminación de los hidrocarburos y la recuperación de las capacidades funcionales de suelos crónicamente contaminados, mejorando así la calidad del suelo.*

- II. La aplicación de las estrategias de compostaje acopladas al uso de oxidantes químicos sobre el suelo crónicamente contaminado promueve la eliminación del contaminante conduciendo a un aumento de la diversidad microbiana y recuperación de las capacidades funcionales de suelos crónicamente contaminados, sometidos a técnicas de oxidación directa.*

OBJETIVOS

a) Objetivo general

Evaluar el efecto de estrategias de bioestimulación y compostaje sobre la recuperación de suelos crónicamente contaminados con PAHs, con y sin tratamiento previo de oxidación química.

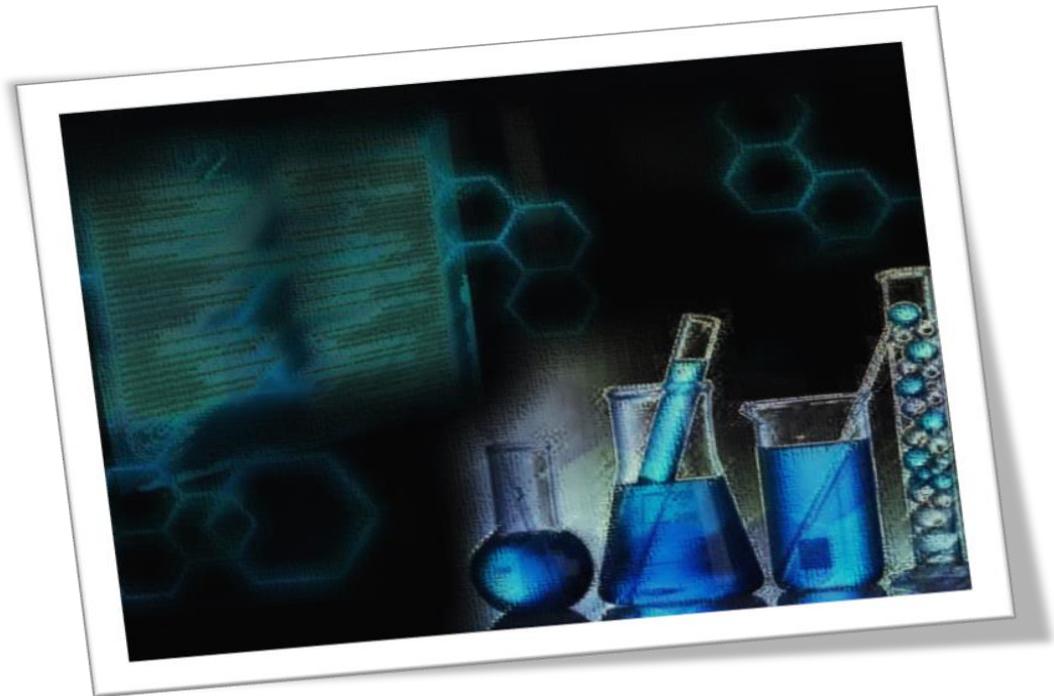
b) Objetivos específicos

- 1- Caracterizar un suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos.

- 2- Estudiar la eficiencia de las tecnologías de remediación biológicas aplicadas al suelo crónicamente contaminado, particularmente de estrategias de compostaje, en la eliminación de hidrocarburos y en la recuperación de su funcionalidad.

- 3- Estudiar la eficiencia de la aplicación de persulfato de amonio (PS) y su combinación con diferentes tratamientos biológicos en la eliminación de hidrocarburos de un suelo crónicamente contaminado y en la recuperación de su funcionalidad.

Capítulo II: Materiales y métodos



Materiales utilizados

1. Suelo contaminado (S_0)

La tierra crónicamente contaminada se recolectó de un predio perteneciente a una empresa petroquímica localizada en el polo petroquímico de la ciudad de La Plata ($34^{\circ} 53' 19'' S, 57^{\circ} 55' 38'' W$) (Figura II.1).



Figura II.1. Imagen del sitio donde se dispuso el material tratado por *landfarming*, y que fue muestreado e identificado como S_0 . Empresa petroquímica del polo petroquímico de La Plata.

Los barros acumulados durante años por la actividad de la empresa fueron dispuestos en bioceldas para un tratamiento de *landfarming*. La caracterización previa de estos barros evidenció un contenido de 5 g de PAHs por Kg de barro, de pH alcalino (8.8 ± 0.1).

La estrategia de *landfarming* consistió en la incorporación del barro a una tierra dispuesta para tal fin, en bioceldas confinadas. El tratamiento se prolongó por cuatro años, con recargas sucesivas, manteniendo el riego y aireación con arado. Al cabo de dicho periodo, se abandonó el tratamiento de las bioceldas, y luego de 2 años se procedió al muestreo del material. Este material fue considerado como un suelo crónicamente contaminado, y denominado S_0 . El material muestreado S_0 se transportó

en bolsas plásticas hasta el laboratorio, donde se mantuvo en cámara fría hasta su análisis.

Muestras de S_0 se enviaron al laboratorio de Edafología de la Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, donde se determinaron textura, carbono fácilmente oxidable (C %) (método de Walkley y Black), contenido de materia orgánica ($MO\% = 1.724 \times C\%$), contenido de nitrógeno total (método de Microkjeldahl) y fósforo extractable (método Bray- Kurtz n°1) y azufre de sulfatos (Norma SAMLA -PROMAR SAGPyA 2004) y la capacidad de retención de agua.

2. Suelo del predio (SP)

Se tomaron muestras de suelo perteneciente al campo que rodea al sitio donde se recolectó S_0 , ($34^{\circ}53' 27''$ S, $57^{\circ} 55' 42''$ W). Estas muestras fueron identificadas como SP.

Esta región del predio se caracterizó por ser un área cubierta de hierba uniforme. Luego de la recolección, se enviaron muestras del suelo SP al laboratorio de Edafología (Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales), donde se determinaron las mismas propiedades que al suelo recolectado post *landfarming*, S_0 .

Los resultados de los análisis de ambos suelos se detallan en la Tabla II.1.

Tabla II.1. Caracterización edafológica y química del suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos (S_0) y del suelo del predio (SP).

Propiedades	S_0	SP
Textura	Franco	Franco
Carbono orgánico [%]	2.20 ± 0.88	2.40 ± 0.30
Materia orgánica [%]	3.78	4.15
Nitrógeno total [%]	0.2 ± 0.1	0.24 ± 0.03
Fósforo disponible [mg/Kg]	8.33 ± 0.63	3.67 ± 0.58
Sulfatos [mg/Kg]	59 ± 4	9 ± 1
Capacidad de retención de agua [%]	27.45	35.22

3. Enmienda orgánica y agente de volumen empleados en el compostaje

La enmienda orgánica empleada para llevar a cabo el compostaje fue estiércol de cabra que se obtuvo de un corral perteneciente a la cátedra de Producción animal de

la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, de la Universidad Nacional de La Plata (Figura II.2.A). Una vez recolectado el material, se secó parcialmente al aire, y luego se tamizó para utilizarse en los tratamientos de *Compostaje tradicional* y *Compostaje del suelo*.



Figura II.2. A. Estiércol de cabra. B. Rastrojo de avena triturado.

Por otro lado, como agente de volumen para el tratamiento de compostaje se empleó rastrojo de avena recolectado en un campo perteneciente a la zona agrícola platense, el cual se trituró de modo uniforme antes de su uso (Figura II.2.B).

En el *Anexo I* se presenta el resultado del análisis de las poblaciones cultivables realizadas sobre estos materiales.

4. Tratamiento de compostaje tradicional

Se utilizó la enmienda orgánica (estiércol de cabra) y el agente de volumen (rastrojo de avena) que se procesaron como se detalló en la sección anterior para llevar a cabo el compostaje. Los materiales procesados, se mezclaron en proporción 1:1 (Vol: Vol) (Sayara y col., 2009). La mezcla obtenida se colocó en un contenedor plástico de 43L (46,5 cm largo x 34 cm ancho x 27,5 cm alto). El sistema se regó y volteo periódicamente con el fin de mantener la humedad y la aireación del tratamiento. Luego de 45 días se obtuvo un material compostado, visiblemente más homogéneo, con el que se realizaron los ensayos de estimulación con enmienda orgánica. Sobre este material se realizaron las determinaciones químicas y biológicas que se detallan en el *Anexo I*.

Medios de cultivo

La descripción detallada de la composición y preparación de cada uno de ellos se presenta en el *Anexo II*.

El medio agar Reasoner 2A (R2) se utilizó para el recuento de Bacterias Heterótrofas Totales cultivables (BH). El medio Rosa de Bengala (RB) se usó para realizar el recuento de la población de hongos (RH) mientras que el medio Solubilización de Fósforo Inorgánico (SFI) se empleó para el recuento de la población de bacterias solubilizadoras de fósforo (BSP).

El Medio Mineral Líquido (MML) suplementado con la mezcla de PAHs se utilizó para el recuento específico de la comunidad degradadora de hidrocarburos aromáticos policíclicos (BD-PAHs), mientras que el MML suplementado con hexadecano para la población degradadora de hidrocarburos alifáticos (BD-HA). Por otro lado, el MML suplementado con celulosa se usó para realizar el recuento de la comunidad capaz de degradar celulosa (BD-C), utilizando esta como única fuente de carbono y energía.

El medio Luria Bertani (LB) se empleó para el crecimiento de *E. coli* DH5 α , durante la recuperación de las células luego de haber sufrido el shock térmico. Finalmente, el medio LB agar suplementado con Ampicilina/ IPTG/ X-Gal se empleó en la selección de *E. coli* DH5 α portadoras del plásmido recombinante.

Metodología para las determinaciones físicas y químicas

1. Determinación de pH, conductividad eléctrica y potencial redox

Para la determinación del pH, conductividad eléctrica y potencial redox, se mezclaron 2.5 g de suelo con 2.5 ml de agua bidestilada y se agitaron durante 1 h a 240 rpm (Mora y col., 2014). Luego de reposar durante 10 minutos, se realizó la lectura con el electrodo correspondiente.

2. Determinación de la concentración de hidrocarburos

A 5 g de suelo se adicionaron 10 g de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4 , Merk). Luego se realizó la extracción con solventes orgánicos por adición de 15 ml una mezcla de diclorometano: acetona 1:1 (v/v) (Sayara y col., 2010a) de calidad cromatográfica (UVE), mediante ultrasonificación (ultrasonicador TestLab, 400W, 40KhZ) durante 2 horas, de acuerdo al método EPA 3550b. Luego de sonicar, los tubos conteniendo la mezcla de suelo: solvente de extracción se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 rpm y los sobrenadantes se recogieron en frascos de vidrio limpio. El procedimiento se realizó tres veces consecutivas (extracción exhaustiva). Luego, se evaporó el solvente y se solubilizó en diclorometano. Finalmente se filtró con membrana de nylon de 0.45 μm .

Cada muestra se inyectó en un cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer Clarus 500 equipado con una columna 5HT-PE (Perkin Elmer, longitud 30 m, diámetro interno 0.25 mm) acoplado a un detector de ionización de llama (FID=*Flame Ionization Detector*). La concentración de cada hidrocarburo se determinó luego de la calibración con un patrón comercial (AccuStandar) de concentración conocida, acorde a los métodos EPA SW 846 M 8015 CG-FID y EPA SW 846 M 8100 CG – FID según se trate de hidrocarburos alifáticos (HAs) o aromáticos policíclicos (PAHs), respectivamente. En las Tablas II.2 y II.3 se detallan cada método cromatográfico.

Tabla II.2. Detalle del método cromatográfico utilizado para la determinación de HAs.

T inyector	300°C
T detector	300°C
T inicial del horno	60°C, 2 min
Rampa 1	10°C min^{-1} hasta 170°C, 170°C durante 5 min
Rampa 2	5°C min^{-1} hasta 250°C, 250°C durante 2 min
Rampa 3	10°C min^{-1} hasta 300°C, 300°C durante 2 min
Volumen de inyección	1 μl
Flujo de gas <i>carrier</i> (He calidad 5.0)	1 ml min^{-1}
Régimen	<i>Split</i> 2:1

Tabla II.3. Detalle del método cromatográfico utilizado para la determinación de PAHs.

T inyector	250°C
T detector	300°C
T inicial del horno	80°C, 1 min
Rampa 1	25°C min ⁻¹ hasta 140°C
Rampa 2	10°C min ⁻¹ hasta 290°C, 290°C durante 15 min
Volumen de inyección	1µl
Flujo de gas <i>carrier</i> (He calidad 5.0)	2 ml min ⁻¹
Régimen	<i>Splitless</i>

3. Fracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos biodisponibles

Para la determinación de la fracción de PAHs biodisponible se prepararon sistemas de suelo suplementado con la resina XAD-2 (Amberlite XAD 2, Sigma Aldrich) a partir de 3.1 g de suelo en 30 ml de una solución 0.01 M CaCl₂ y 0.01M NaN₃ 2 g de XAD-2 previamente activado. Previo a su uso, le resina fue activada mediante ultrasonificación secuencial con diferentes solventes (H₂O/metanol; metanol; hexano; agua) durante 1 hora cada uno y luego se secó en estufa a 50°C. Las muestras de suelo-XAD-2 se mantuvieron en agitación (200 rpm) durante 7 días. Transcurrido este tiempo, las perlas de XAD-2 se recuperaron de la suspensión de suelo y se secaron mediante vacío (Cébron y col., 2013). Finalmente, se realizó la extracción orgánica exhaustiva a partir de la fracción XAD y de la suspensión de suelo aplicando el método de extracción y análisis descrito en el inciso b) *Determinación de la concentración de hidrocarburos*.

4. Análisis del extracto alcalino del suelo

Los extractos alcalinos de muestras de suelo se utilizaron para la determinación de los espectros de absorbancia y emisión, y del Carbono Total Disuelto (CTD). El estudio de los de extractos de suelo resulta de interés ya que provee información sobre la composición y complejidad de la muestra.

Un parámetro de interés obtenido de los espectros de absorbancia es la relación de absorción a λ 465 nm / λ 665 nm (E_4/E_6). Esta relación se usa en la caracterización de la materia orgánica disuelta y en la comparación de sustancias húmicas de diferentes orígenes. Este cociente es independiente de la concentración de sustancias húmicas. La absorción a mayores longitudes de onda es indicativa de la presencia de moléculas de mayor tamaño, por lo que los valores de E_4/E_6 se correlacionan

inversamente con el peso molecular de estas sustancias y con el contenido de anillos aromáticos (Lguirati y col., 2005). Esta correspondencia es positiva con el número de ácidos carboxílicos presentes en la solución. Debido a que el pH de la solución afecta al peso molecular promedio, los espectros se miden a soluciones a las que se ajusta el pH en un mismo valor.

Las sustancias húmicas del suelo (SH) y los PAHs poseen en su estructura química dobles enlaces conjugados, lo que confiere fluorescencia a las moléculas. Ambos poseen regiones de excitación y emisión de fluorescencia características, según la naturaleza química del compuesto. Esto permite el uso de herramientas de fotofísica como son las Matrices de Excitación Emisión de Fluorescencia (MEEF) para su monitoreo y control. En la Figura II.3 se presentan las regiones de excitación y emisión características de distintas familias de fluoróforos presentes en suelos. Las regiones I y II se asocian al aminoácido tirosina y a proteínas simples con alto contenido de este tipo de aminoácido aromático. Los extractos de suelo emiten en las regiones IV y V, la región III es característica de los ácidos fúlvicos, mientras que la V de ácidos húmicos (David Gara y col., 2011). La región IV corresponde principalmente a productos solubles de degradación microbiana.

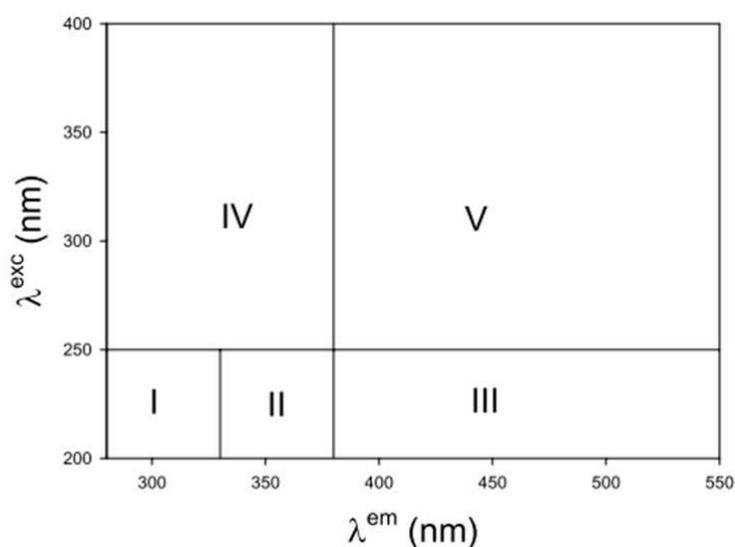


Figura II.3. Imagen tomada de David Gara y col., 2011. Regiones de excitación emisión de fluorescencia de sustancias naturales.

Para obtener los extractos se mezclaron 3 g de suelo con 15 ml de NaOH 0.1M utilizando vortex. Luego se ajustó el pH en 10 ± 0.5 y se agitó durante 1 h. Una vez transcurrido el tiempo de agitación se verificó que el pH no haya variado. En caso de

observar cambios en los valores de pH, nuevamente se ajustará en 10 ± 0.5 y se repetirá el procedimiento. Finalmente el sobrenadante se separó centrifugando durante 10 min a 5000 rpm y se filtró utilizando en primer lugar papel de filtro Whatman n°41 y luego utilizando membrana de nylon de $0.45 \mu\text{m}$. Una vez obtenido el extracto alcalino, se ajustó el pH en 7 se filtró a través de membrana de nylon de $0.45 \mu\text{m}$ para realizar los análisis posteriores (David Gara y col., 2011).

Los espectros de absorción se midieron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800, entre 200 y 800 nm. A partir de los espectros de absorción se calculó la relación E_4/E_6 .

Para medir los espectros de fluorescencia se ajustó la absorbancia a 550 nm de los extractos alcalinos en 0.01 (Birdwell y Engel 2010). Los espectros de fluorescencia se realizaron utilizando un espectrofluorómetro *Near-IR Fluorolog-3 Research Spectrofluorometer*, midiendo la emisión entre 260 a 650 nm. Las matrices de excitación-emisión de fluorescencia (MEEF) se generaron a partir de espectros de emisión obtenidos, incrementando cada 5 nm la longitud de onda de excitación, desde 240 hasta 580 nm (Bosio y col., 2008).

Para obtener información sobre las matrices se realizó un análisis PARAFAC (“Parallel Factor”) que nos permitió estimar el número de fluoróforos presentes y su concentración relativa, así como los espectros de emisión y excitación de estos. Este análisis se hizo mediante el uso de MATLAB 7.7 (Mathworks, Natick, MA) aplicando PLS_Toolboxversion 4.0 (EigenvectorResearch, Manson, WA). La determinación del número correcto de los componentes en el conjunto de datos se evaluó mediante la puntuación del “diagnóstico de consistencia de núcleo” (*Core Consistency Diagnostic*) que debe estar cerca del 100 % si el modelo es adecuado. El número de componentes se validó por inspección visual de los parámetros estimados y el diagnóstico de modelos adicionales. Se usaron varios pasos de pre-procesamiento para minimizar la influencia de las líneas de dispersión, restando a cada muestra la matriz del agua. Además, se asignó valor cero a las emisiones por debajo de la longitud de onda de excitación, ya que esta situación es fisicoquímicamente imposible. Este análisis informático fue realizado por el Dr. Pedro M. David Gara, quien colaboró de modo activo en la interpretación de los resultados.

El Carbono Total Disuelto se determinó utilizando una pequeña muestra de la extracción alcalina. La medida se llevó a cabo en un *Total Organic Carbon Analyzer* Shimadzu, TOC-5000. La concentración se determinó luego de la calibración correspondiente (Mora y col., 2014). Para la calibración se preparó un patrón de 100 mg L⁻¹ (ppm) de biftalato de potasio (BioPack), a partir del cual se realizaron diluciones que fueron inyectadas en el equipo. A partir de las áreas registradas se construyó la curva de calibración.

5. Determinación de Fe

Se determinó el contenido total de Fe del suelo contaminado mediante digestión ácida, según el método EPA 3050b. Entre 1-2 g de suelo se trataron en primer lugar con 10 ml de HCl concentrado y se calentaron a 95°C durante 15 min. Posteriormente se adicionaron 10 ml HNO₃ (1:1) y se termostató a 95°C (sin llegar a hervor) con reflujo durante 5 min. Se continuó con agregados de 5 ml HNO₃ hasta no observar el desprendimiento de vapores pardos. Finalmente, se enfrió la muestra, se agregaron 2 ml de H₂O y 3 ml de H₂O₂ (30 % v/v) y se calentó durante 2 hs a reflujo. El producto se filtró por papel Whatman n°41 y se inyectó en un Espectrofotómetro Shimadzu AA-6650. La concentración se determinó luego de la calibración correspondiente. Para la calibración se utilizó una solución patrón de hierro, 1000 µg/ml (Plasma HIQU), IONEX (Chem lab, CL01.0902) a partir del cual se realizaron diluciones que fueron inyectadas en el equipo.

Por otra parte, se determinó el contenido de Fe disponible en el suelo, mediante la extracción de Fe usando EDTA 0.2M a pH 7.5 (método EPA 7950) y el equipo antes descripto.

6. Determinación de Persulfato (PS) en suelo

Se mezclaron 4.5 g de suelo con 4.5 ml de agua bidestilada. Luego de agitar utilizando vortex, la muestra se filtró utilizando membrana de nylon de 0.45 µm. A 0.5 ml del filtrado se le adicionaron 1 ml de H₂O bidestilada y 1 ml de NaHCO₃/ KI (0.05 g de NaHCO₃+ 1 g de KI en 10 ml). Luego de 5 minutos de iniciada la reacción para la determinación de PS se midió el espectro de absorción entre 200 y 600 nm utilizando

un espectrofotómetro PG T60 UV-Visible. El anión persulfato se caracteriza por mostrar un máximo de absorbancia a 350 nm (Liang y col., 2008).

Recuento de las poblaciones cultivables

En un erlenmeyer estéril conteniendo 90 ml de solución fisiológica, se transfirieron 10 g de suelo. El sistema se agitó durante 30 min a 240 rpm y luego se dejó reposar 10 min. Se tomó una alícuota de 100 μ l y se realizaron diluciones seriadas. Se inocularon 100 μ l de estas diluciones en placas conteniendo el medio de cultivo correspondiente y el inóculo se esparció con espátula de Drigalsky. Las placas se colocaron en estufa a 25°C durante 10 días. Finalmente se contabilizaron las colonias.

Los resultados se expresaron como Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por g de suelo seco (SS). Cada recuento en placa consistió en la inoculación de 3 diluciones consecutivas, de modo de obtener entre 30 y 300 colonias por placa. Cada dilución se inoculó por duplicado. Los medios empleados para el recuento en placa fueron agar-R2, RB y SFI (*Anexo II*).

Para el caso de recuentos en medio líquido, los tubos conteniendo el medio de cultivo estéril, se inocularon con la dilución correspondiente y se incubaron a 25°C durante 21 días. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se registró el número de tubos positivos, con el cual se calculó el Número Más Probable (NMP) g_{SS}^{-1} . Para los recuentos de BD-HA y BD-C se inocularon 3 diluciones consecutivas, cada una por quintuplicado (tubos). Para el caso de las BD-PAHs se inocularon al menos 4 diluciones consecutivas, cada una por octuplicado (microplacas). Los medios de cultivo empleados en la técnica del NMP fueron MML suplementado con hexadecano, celulosa y mezcla de PAHs (*Anexo II*).

Metodología para los estudios de funcionalidad del suelo

Las soluciones y los reactivos empleados en estudios de funcionalidad de suelo se describen en detalle en el *Anexo III*.

1. Actividad deshidrogenasa (Del Panno y col., 2005)

Unos 5 g de tierra húmeda se transfirieron a un frasco color caramelo. A cada frasco se le adicionaron 5 ml de solución de triclorofeniltetrazolio al 1 % preparada en buffer Tris-HCl 100 mM pH 7.7. Cada frasco se agitó (vortex) y se incubó en oscuridad durante 24 hs a 25°C. Para detener la reacción enzimática, se agregaron 40 ml de acetona (calidad pro análisis). Cada frasco se agitó cada 30 min durante 2 hs, con el fin de maximizar la extracción del producto de reacción. El contenido de cada frasco se filtró utilizando papel de filtro y el filtrado fue recolectado en un tubo de vidrio limpio. Por último, se realizó medida de la absorbancia a 546 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 640 UV-Visible. Como blanco de reacción se utilizó suelo suplementado con 5 ml del buffer. Cada determinación se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como μg de TPF $\text{g}_{\text{SS}}^{-1}$. Para la construcción de la curva de calibración se preparó una solución estándar de 50 mg de TPF (trifenilformazan), que es el producto de la oxidación del triclorofeniltetrazolio, en 100 mL de acetona y diluciones a partir de ella.

2. Actividad lipasa (Margesin y col., 2002)

Se mezclaron 0.1 g de tierra húmeda con 5 mL de buffer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (100 mM, pH 7.25). La mezcla se agitó con vortex y se incubó en baño de agua durante 10 min a 30°C. Luego se agregaron 50 μl de *p*NP-B (*p*-nitrofenol butirato) 100 mM (preparado en el momento en 2-propanol) y cada sistema se agitó y se incubó 10 min a 30°C. Para detener la reacción, los tubos se colocaron en baño de hielo (10 min) y luego se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min. Se determinó la absorbancia del sobrenadante a 400 nm usando un espectrofotómetro Bio-Rad de microplacas Benchmark Plus. Como control se incluyeron muestras sin sustrato. Cada medida se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como ng *p*NP $\text{g}_{\text{SS}}^{-1}$. La curva de calibración se realizó con *p*NP (*p*-nitrofenol), que es el producto de la hidrólisis del

*p*NP-B, a partir de una solución estándar 100 ng mL^{-1} con la cual se realizaron diluciones de concentración conocida.

3. Actividad arilsulfatasa (Geng y col., 2012)

Se pesaron 0.25 g de tierra húmeda a los que se agregó 1 mL de buffer acético-acetato (pH 5.8). Luego, se adicionaron 250 μL de *p*NP-S (*p*-nitrofenol sulfato) preparado en el momento en el mismo buffer. Cada tubo se agitó con vortex y se incubó durante 1 hora a 37°C . Transcurrido el tiempo de reacción, se agregaron 2 mL de NaOH 0.5 M y 0.25 mL de CaCl_2 0.5 M para detener la reacción enzimática. Posteriormente, se centrifugaron los tubos durante 10 min a 6000 rpm para luego ser filtrados por papel. Finalmente se midió la absorbancia del sobrenadante de cada muestra a 410 nm empleando un espectrofotómetro Beckman DU 640 UV-Visible. Como control se utilizaron muestras sin el agregado de sustrato. Cada muestra se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como ng de *p*NP $\text{g}_{\text{SS}}^{-1}$. La curva de calibración se realizó de modo similar que la realizada para la actividad lipasa.

4. Actividad fosfatasa (Verchot y Borelli 2005)

Se mezclaron 0.25 g de tierra húmeda con 1 mL de buffer MUB (Modified Universal Buffer) ajustado (pH 11 para medir actividad fosfatasa alcalina, pH 6.5 para el caso de fosfatasa ácida) y 250 μL de MUB ajustado suplementado con *p*NP-P (*p*-nitrofenol fosfato, 0.1 M). Cada muestra se agitó con vortex y se incubó en baño de agua a 37°C durante 1 hora. La reacción se detuvo por el agregado de 1 mL de NaOH 0.5 M y 1 mL de CaCl_2 0.5 M. Luego se centrifugaron los tubos durante 10 minutos a 5000 rpm y se filtraron por papel. Finalmente se realizó la medida de absorbancia a 410 nm de los extractos usando un espectrofotómetro Beckman DU 640 UV-Visible. Cada medida se hizo por triplicado. Como control se incluyeron muestras sin la adición de sustrato. Los resultados se expresaron como ng de *p*NP $\text{g}_{\text{SS}}^{-1}$. Para realizar la curva de calibración se procedió de modo similar que en el caso de lipasa.

5. Actividad ureasa (Kandeler y Gerber 1988)

A 1 g de tierra se le agregaron 1.5 mL de una solución de urea 0.08 M (preparada en el momento). Cada tubo se agitó con vortex y luego fue incubado durante 2 hs a 37°C . Transcurrido el tiempo, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 5000 rpm. A

1 ml de sobrenadante se le agregó 1 mL de reactivo 1 (solución de hipoclorito de sodio 10mM en NaOH 0.125 M) y 1 mL de reactivo 2 (solución de salicilato de sodio 3 mM-nitroprusiato de sodio 0.15mM). Seguido a esto, las mezclas se incubaron durante 5 minutos a 37°C. Finalmente se realizó la medida de absorbancia a 580nm usando un espectrofotómetro Bio-Rad de microplacas Benchmark Plus. Como control se incluyeron sistemas sin sustrato. Cada medida se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como $\mu\text{moles de N-NH}_4^+ \text{ g}_{\text{SS}}^{-1}$. Para la calibración se preparó una solución estándar de sulfato de amonio de 100 ppm a partir de la cual se realizaron las diluciones correspondientes.

6. Actividad proteasa (Ladd y Butler 1972)

Entre 0.3-1 g tierra húmeda se mezclaron con 5 mL de solución de caseína 2 % (en buffer Tris 5 mM, pH 8.1) y 5 mL de buffer Tris 5 mM pH 8.1. Los sistemas se agitaron utilizando vortex y luego se incubaron durante 2 horas a 50°C en baño de agua con agitación. Finalizado el tiempo de reacción, se realizó la extracción del producto de reacción mediante el agregado de 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0.9 M, que produce la desnaturalización de la caseína no hidrolizada. Cada muestra se centrifugó durante 15 minutos a 10000 rpm. El sobrenadante contiene los aminoácidos libres generados por la proteólisis de la caseína, que posteriormente se cuantificaron por el método de Lowry utilizando como patrón L-Tyr (solución estándar 200 mg L⁻¹). Para ello a 100 μl de patrón o de muestra se le agregaron 500 μl del reactivo C (ver *Anexo II*). Luego de mezclar, cada reacción fue incubada durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Seguido a esto, se agregaron 100 μl de reactivo de Folin- Ciocalteau (1:1) a cada sistema y se volvió a incubar 30 minutos en oscuridad. La medida de absorbancia se realizó a 750 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640 UV-Visible.

Los controles se realizan por el agregado de caseína luego de la adición de TCA. Cada muestra se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron como mg Tyr g_{SS}⁻¹.

7. Respuesta respiratoria inducida por sustrato (SIR) (Degens y Harris 1997)

Viales de vidrio de 25 ml conteniendo 1 g de suelo y 2 ml de sustrato (descritos en el *Anexo III*), se cerraron herméticamente con septum de goma y virola de aluminio y luego se incubaron a 25°C durante 4 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se inyectó un volumen de la fase gaseosa de la muestra en un cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer Clarus 500 equipado con una columna Carboxen 1010 (Supelco, longitud 30 m, diámetro interno 0.32 mm) y un detector de conductividad térmica (TCD= *Thermal Conductivity Detector*). Las condiciones cromatográficas son las que se detallan en la Tabla II.4.

La cuantificación del CO₂ producido por cada muestra se realizó por comparación con un patrón de concentración conocida inyectado en las mismas condiciones. Cada sustrato ensayado se preparó como se detalla en el *Anexo III*, con el pH ajustado en 6, según lo descrito (Degens y Harris 1997). Los resultados se expresaron como $\mu\text{moles de CO}_2 (\text{g}_{\text{SS}} \text{h})^{-1}$.

Tabla II.4. Parámetros cromatográficos de la determinación de CO₂.

T inyector	140°C
T detector	230°C
T del horno	75°C
Tiempo	10 min
Volumen de inyección	<i>Lub</i>
Flujo de gas <i>carrier</i> por la columna(He calidad 5.0)	3 ml min ⁻¹
Flujo de gas <i>carrier</i> por el detector (He calidad 5.0)	12 ml min ⁻¹
Régimen	<i>Split</i> 20:1

Metodología para los estudios genómicos

1. Extracción de ADN de suelo

La extracción de ADN (Ácido desoxirribonucleíco) total de suelo se realizó utilizando el kit comercial E.Z.N.A.™ Soil DNA Isolation Kit (Omega Bio-tek, Inc., Norcross, GA, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante, repitiendo 3 veces los pasos 3 a 8 con el fin de extraer el ADN total de la comunidad. Los detalles del procedimiento y de las soluciones y reactivos empleados se encuentran en el *Anexo IV*. Una vez obtenido el ADN el mismo se conservó en -20°C para su posterior uso.

2. Estructura de la comunidad bacteriana

Se amplificó el fragmento del gen 16S rARN comprendida entre las regiones hipervariables V3 -V5 utilizando los *primers* conservados GC-341F (5'-CGCCCCGCGCCCCGCGCCCGCCGCCCCGCCCCCTCCTACGGGAGGCAGCAG - 3') y 907R (5'- CCGTCAATTCCTTTGAGTTT - 3') (Muyzer y col., 1998), como se muestra en la Figura II.4, que generan un producto de unos 560 pares de bases.

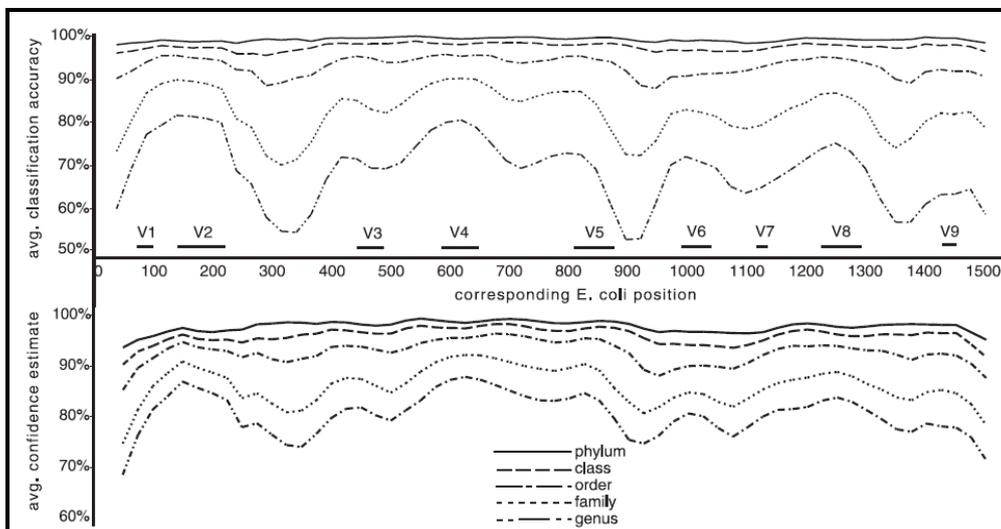


Figura II.4. Regiones conservadas en los distintos niveles taxonómicos y regiones hipervariables del gen 16S rARN (Wang y col., 2007).

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se realizó en un volumen final de 30 µl conteniendo 1 µl de ADN, 1U enzimática de GoTaq (Promega), 1X de buffer, 0.2 mg de BSA (Seroalbúmina Bovina, estándar: 10 mg/ ml), 0.2 mM dNTPs (Dideoxinucleótidos; dATP, dCTP; dGTP y dTTP), y 5 µM de cada *primer* y fue llevada a cabo en una

termocicladora Master cycler® Eppendorf (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Germany).

En la Tabla II.5 se detalla el programa de PCR utilizado.

Tabla II.5. Detalle del programa de PCR utilizado para la amplificación de las regiones hipervariables V3-V5 del gen 16S rARN amplificadas con los *primers* GC-341F y 907R.

Temperatura	Tiempo	
95°C	4 minutos	} 10 ciclos
94°C	30 segundos	
62°C	40 segundos	
72°C	1 minuto	} 25 ciclos
94°C	30 segundos	
57°C	40 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	10 minutos	

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5 % (p/v). Luego estos amplicones se purificaron utilizando el Kit PCR clean up Gel extraction (Nucleo spin extract II, Macherey- Nagel) y se cuantificaron mediante Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

La DGGE (*Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis*) se realizó en una cuba DGGE-2401 (C.B.S Scientific Co., Del mar, CA, USA). Se sembró igual concentración de cada amplicón de PCR en un gel de poliacrilamida (acrylamide N-N´Metilen-bisacrilamida 37:5:1) con un gradiente desnaturalizante lineal 45–70 % (100 % de desnaturalización corresponde a urea 7 M urea y 40 % (v/v) formamida). Las soluciones empleadas y la preparación de los geles se detallan en el *Anexo IV*. Para la electroforesis se utilizó buffer TAE 1X (40 mM TRIS, pH 8.1, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA) a 60°C durante 16 hs a 100 V. Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles se tiñeron durante 30 minutos en SYBR Gold. Las imágenes se documentaron a través de un sistema documentador de imágenes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y se analizaron usando el software GelCompar II (AppliedMaths, Kortrijk 180 Belgium) y se determinaron las densidades ópticas de las bandas. Estos perfiles de densidad se usaron para calcular la matriz de similitud usando el coeficiente de Jaccard y la posterior construcción del dendrograma (*UPGMA*: es un método de encadenamiento “*unweighted pair-group method using arithmetic averages*”). Los valores de las ramas representan las

correlaciones cofenéticas, las cuales nos muestran cuán bien la estructura jerárquica del dendrograma representa a las verdaderas distancias.

3. Estudio de diversidad mediante pirosecuenciación del gen 16S rARN

Los análisis de diversidad se realizaron de dos maneras distintas.

Una primer pirosecuenciación se realizó utilizando el servicio del Laboratorio de investigación molecular (MR DNA; Shallowater, TX; <http://www.mrdnalab.com/>) donde se realizó la amplificación con los *primers* 341Fbac (5'- CCTACGGGAGGCAGCAG-3') (Muyzer y col., 1993) y 909R (5'-CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3') (Tamaki y col., 2011) generando un amplicon de 568 pares de bases correspondiente a regiones hipervariables V3-V5 del gen 16S rARN. El *primer* 909R está acoplado en el extremo 5' a un adaptador y seguido a este a un código de barras de 8 nucleótidos (MID: *Multiplex Identifiers*) que servirá para la identificación posterior de cada muestra, mientras que el *primer* 341Fbac está acoplado a otro adaptador en su extremo 5', tal como se esquematiza en la Figura II.5.

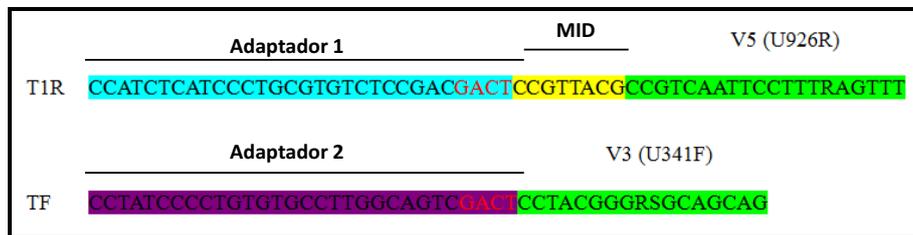


Figura II.5. Esquema de la estructura de los *primers* utilizados en la pirosecuenciación.

Las amplificaciones se realizaron por duplicado en un volumen de 20 μ l utilizando Hot StarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, CA). La PCR se llevó a cabo según se detalla en la Tabla II.6.

Tabla II.6. Detalle del programa de PCR utilizado en la amplificación de las regiones hipervariables V3-V5 amplificadas con los *primers*-341Fbac y 909R.

Temperatura	Tiempo	
94°C	3 minutos	} 28 ciclos
94°C	30 segundos	
53°C	40 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	5 minutos	

Los amplicones se purificaron y luego de ser cuantificadores mediante visualización en gel de agarosa 1.5 % (p/v) y con un Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), las muestras se mezclaron en igual concentración y se purificaron usando perlas de Agencourt Ampure (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA). Una vez obtenida la mezcla de amplicones, ésta se secuenció utilizando la plataforma Roche 454 FLX Titanium.

También se realizó la amplificación utilizando los *primers* U519F (5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3') y U926R (5'- CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3') (Baker y col., 2003) en la Estación Experimental del Zaidín, durante una estancia corta en el marco del Programa BecAr (Programa de Becas de formación en el exterior en Ciencia y Tecnología). En este caso se obtuvieron productos de 407 pares de bases correspondiente a las regiones hipervariables V4-V5 del gen 16S rARN. Una vez más, los *primers* están acoplados a distintos adaptadores y un MID de 8 nucleótidos como se describió en el ensayo anterior. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Eppendorf 5331 Master Cycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) por triplicado en un volumen de 30 µl utilizando 10 ng de ADN molde, 1 U de GoTaq G2 Flexi (promega), 1X de buffer, 0.3 mg de BSA (New England Biolabs, estándar: 10 mg/ ml), 0.25 mM de cada dNTP, 2.5 mM de MgCl₂ y 1 µM de cada *primer*. El programa de PCR fue el que se detalla en la Tabla II.7.

Tabla II.7. Detalle del programa de PCR utilizado en la amplificación de las regiones hipervariables V4-V5 amplificadas con los *primers* U519F y U926R.

Temperatura	Tiempo	
94°C	3 minutos	} 25 ciclos
94°C	15 segundos	
55°C	45 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	8 minutos	

Los amplicones se purificaron utilizando filtros de ultracentrífuga con membrana 100-K (Amicon, Cork, Ireland) según indicaciones del fabricante. Los productos puros se cuantificaron mediante Quant-iT™ PicoGreen® ds DNA Assay Kit (Invitrogen™), utilizando un espectrofotómetro Qubit (Thermo Scientific) y se visualizaron en un gel de agarosa 1 % (p/v) teñido con *Gel Red*. Finalmente se realizó una mezcla equimolar

conteniendo cada producto, que nuevamente se purificó del modo anteriormente descrito. La mezcla de amplicones obtenidas se pirosecuenció con el sistema Genome Sequencer Junior GS-FLX de Roche en la Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Granada, España).

En el *Anexo V* se presenta una tabla que indica las regiones hipervariables que se secuenciaron para cada microcosmo.

Las secuencias obtenidas de ambos ensayos se analizaron con Mothur (versión v.1.34.0; (Schloss y col., 2009)). Las secuencias más cortas que 360 pares de bases, o que contengan más de 1 base ambigua (N) o un homopolímero de más de 8 pares de bases, o que tuvieran una o más de base que no coincidieran en el *primer* o códigos de barras, o nivel de calidad por debajo de 25, se eliminaron del análisis, al igual que las secuencias quiméricas, los contaminantes y aquellas secuencias que solo estuvieron presentes 1 vez (*singleton*). Los datos de secuenciación se agruparon en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) con 3 % de divergencia. Los OTUs se clasificaron taxonómicamente por alineamiento contra una base de datos de secuencias bacterianas 16S rADN de alta calidad no redundante (Silva *nr* 119).

La cobertura del proceso de pirosecuenciación se calculó como se define en la Ecuación II.1, a partir de las OTUs observadas.

$$\text{Cobertura} = 1 - \frac{ni}{N}$$

Ecuación II.1: Cálculo de la cobertura del proceso de pirosecuenciación. *ni* es el número de OTUs muestreadas y *N* es el número total de individuos.

Cuando los valores de la cobertura son próximos a 1, es indicativo de que las secuencias obtenidas representan la mayoría de las secuencias bacterianas presentes en la muestra.

Otro parámetro de la calidad del proceso son las curvas de rarefacción, ya que son la representación gráfica del número de secuencias (eje X) vs el número de OTUs observadas (eje Y).

Para el estudio de la diversidad alfa (comparación entre suelos) se utilizó la serie de números de Hill, que son una clase paramétrica de medidas de diversidad, que integran la riqueza y abundancia de especies (Chiu y Chao 2014), definidas como qD , con $q \neq 1$, como se describe en la Ecuación II.2.

$${}^qD = \left(\sum_{i=1}^S p_i^q \right)^{1/(1-q)}$$

Ecuación II.2. Definición de qD , donde S son las especies presentes, y p_i es la abundancia de la especie i .

El parámetro q determina la sensibilidad de la medida de las abundancias relativas. Esta serie de números se calculó luego de estandarizar el número de secuencias (utilizando el menor número de secuencias encontradas), según las instrucciones que se encuentran en la guía 454- SOP, usando el software bioinformático Mothur (versión v.1.34.0).

Cuando $q = 0$, 0D es simplemente la riqueza de especies. Este número es insensible a las frecuencias relativas, y por lo tanto pondera especies raras. 0D se calculó estimó mediante el índice de Chao1, como se detalla en la Ecuación II.3.

$$Chao1 = Sobs + \frac{n1(n1 - 1)}{2(n2 + 1)}$$

Ecuación II.3: Calculo de 0D o Índice de Chao1. $Sobs$ son las OTUs observadas (riqueza observada), n_1 es el número total de OTUs que están representadas por solo 1 secuencia (*singletons*) y n_2 es el número total de OTUs que están representadas por solo 2 secuencias (*doubletons*).

Cuando $q = 1$, la Ecuación II.2 es indefinido, pero su límite cuando X tiende a 1 es el exponencial de la entropía de Shannon, y se conoce como diversidad de Shannon. La Ecuación II.4 describe el cálculo de 1D . Como puede apreciarse, este cálculo es sensible a la frecuencia relativa de especies, por lo tanto pondera especies comunes.

$${}^1D = \lim_{q \rightarrow 1} {}^qD = \exp\left(-\sum_{i=1}^{S_{obs}} p_i \log p_i\right)$$

Ecuación II.4. Cálculo de 1D o diversidad de Shannon. *S_{obs}* son las OTUs observadas (riqueza observada) y p_i es la frecuencia de la OTU *i*.

Cuando $q = 2$, la **Ecuación II.3** produce la inversa del número de Simpson, que se conoce como diversidad Simpson. La **Ecuación II.5** describe el cálculo de 2D . Esta medida se pondera hacia especies abundantes y por lo tanto es un indicador de equidad de la comunidad. La inversa de Simpson es independiente del esfuerzo de muestreo cuando el número de secuencias obtenidas es mayor a 1000.

$${}^2D = 1 / \sum_{i=1}^{S_{obs}} p_i^2$$

Ecuación II.5. Cálculo de 2D o inversa de Simpson. *S_{obs}* son las OTUs observadas (riqueza observada) y p_i es la frecuencia de la OTU *i*.

4. Clonado de genes específicos de degradación de PAHs

A partir de muestras de ADN de suelo se amplificaron genes específicos involucrados en las rutas de degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Particularmente se amplificó la secuencia que codifica la subunidad alfa de las dioxigenasas (PAH- RHD α). Los *primers* seleccionados están diseñados sobre regiones conservadas de bacterias gram negativas (GN) y bacterias gram positivas (GP) (Cébron y col., 2008) y que generan fragmentos de alrededor de unos 300 pares de bases. Los *primers* utilizados en este ensayo se listan en la Tabla II.8.

Tabla II.8. Descripción de los *primers* utilizados en la amplificación de la subunidad alfa de genes dioxigenasa de bacterias gram negativas y gram positivas.

<i>Primer</i>	Secuencia blanco	Secuencia (3' - 5')
PAH-RHD α GN F	PAH-RHD α de bacterias gram negativas	GAGATGCATACCACGTKGGTTGGA
PAH-RHD α GN R		AGCTGTTGTTCCGGGAAGAYWGTGCMGTT
PAH-RHD α GP F	PAH-RHD α de bacterias gram positivas	CGGCGCCGACAAYTTYGTNGG
PAH-RHD α GP R		GGGGAACACGGTGCCRTGDATRAA

La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorf 5331 Master Cycler Gradient Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) por triplicado en un volumen de 25 μ l utilizando 5 ng de ADN molde, 1.25 U de GoTaq G2 Flexi (Promega), 0.2 mM de cada dNTP (Roche), 1X de buffer, 1.5 mM de MgCl₂ y 0.2 μ M de cada *primer* (Thermo Scientific). La PCR se llevó a cabo según se detalla Tabla II.9.

Tabla II.19. Detalle del programa de PCR utilizado en la amplificación de la subunidad alfa de dioxigenasas (PAH-RHD α) utilizando los pares de *primers* PAH-RHD α GN F / PAH-RHD α GN R y PAH-RHD α GP F / PAH-RHD α GP R.

Temperatura	Tiempo	
95°C	5 minutos	} 30 ciclos
95°C	30 segundos	
55.4°C GN/ 50°C GP	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	7 minutos	

Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa 2 % (p/v) teñido con *Gel Red* y se compararon con el marcador ϕ 29 (4370 to 72 bp). Luego se purificaron utilizando membranas 100 K (Amicon, Cork, Ireland). Los amplicones purificados se ligaron al vector pGEM-T easy según las indicaciones del fabricante y se clonaron en *E. coli* DH5 α mediante shock térmico. Una vez recuperadas las células en LB durante 2 horas a 37°C, se sembraron diluciones en medio LB agar suplementado con IPTG/ X-Gal y ampicilina (como se detalla en el *Anexo II*). Las placas se incubaron a 37°C toda la

noche. Aquellas colonias color blanco se repicaron en medio LB suplementado con ampicilina y se incubaron nuevamente toda la noche a 37°C con agitación (170 rpm). A partir de los cultivos líquidos se realizó extracción de ADN plasmídico utilizando el kit QIA Spin Miniprep (Qiagen). Para verificar la presencia del inserto se realizó la amplificación con los *primers* SP6 (5'- CATACGATTTAGGTGACACTATAG-3') y T7 (5'- GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') que se encuentran posicionados fuera del sitio de clonado del vector utilizado.

A partir de aquellos clones que fueron positivos se seleccionaron al azar 10 correspondientes a cada gen amplificado y se secuenciaron mediante el método de Sanger (Sanger y col., 1977) en un secuenciador ABI Prism 3130XL en la Estación Experimental del Zaidín, utilizando los *primers* SP6 y T7. Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando el software Bioedit, v7.0.9 (Hall 1999) y luego se compararon mediante alineamientos múltiples utilizando la herramienta Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) frente a una base de datos no redundante.

Siguiendo la misma metodología, se clonó y secuenció el fragmento de 16S amplificado con los *primers* 9bfm (5' - GAGTTTGATYHTGGCTCAG - 3') y U1512R (5' - ACGGHTACCTTGTTACGACTT - 3') (Baker y col., 2003) de la cepa de *B. canariense* GV102 perteneciente al cepario del grupo de investigación dirigido por el Dr. Manuel Fernández López, de la Estación Experimental del Zaidín. El ciclo de PCR utilizado para la amplificación de este gen fue similar a los descritos en la Tabla II.10 utilizando como temperatura de *annealing* 60°C.

5. Cuantificación de genes mediante *real time* PCR

Mediante la técnica de *real time* PCR se cuantificaron de forma absoluta los genes 16S rARN, PAH-RHD α GN y PAH-RHD α GP. Para la construcción de las curvas de calibración se utilizaron los clones obtenidos en el inciso anterior. Los *primers* empleados para la cuantificación del gen 16S rARN fueron el U27F (5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y el U341R (5'-CTGCTGCSYCCCGTAGG-3') que generan un fragmento de unos 314 pares de bases correspondientes a la región hipervariable V1-V2 del gen mientras que los *primers* utilizados para la cuantificación de los genes dioxigenasa fueron los descritos en la Tabla II.10. Los ADN molde con los que se

realizaron las curvas de calibración se cuantificaron utilizando el Kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay (Invitrogen™) y un espectrofotómetro Qubit (Thermo Scientific). El número de copias se calculó asumiendo 660 Da como masa molecular de cada par de bases. El límite de detección de esta técnica se considera de 10 copias. Las curvas de calibración se realizaron por diluciones seriadas de una dilución estándar de 10^9 copias ml^{-1} del correspondiente molde.

A partir de las curvas de calibración se calculó la eficiencia (E) de la reacción, que se utilizó para la corrección en el cálculo de número de copias, como se indica en la **Ecuación II.6.**

$$E = 10^{-\frac{1}{m}}$$

Ecuación II.6. Calculo de la eficiencia de reacción, donde E es la eficiencia y m es la pendiente de la curva de calibración.

Los ensayos de *real time* PCR se realizaron en un volumen de reacción de 10 μL conteniendo 1x iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0.4 μM de cada *primer*, 0.05 ng de ADN molde o agua milliQ (control negativo). El ciclo de amplificación fue el que se describe en la Tabla II.10.

Tabla II.10. Detalle del programa de PCR utilizado en la cuantificación de la subunidad alfa de dioxigenasas (PAH-RHD α) y de las regiones V1-V2 del gen 16S rARN.

Temperatura	Tiempo	
95°C	5 minutos	} 50 ciclos
95°C	30 segundos	
63°C 16S rADN/ 55.4°C GN/ 50°C GP	30 segundos	
72°C	30 segundos	
80°C	10 segundos	
72°C	7 minutos	

La pureza de los amplicones se verificó por observación de un único pico de *melting* y por la presencia de una única banda del tamaño esperado en un gel de agarosa al 2 % (p/v) teñido con *Gel Red* (Cébron y col., 2008; Sun y col., 2015).

Se verificó la presencia de inhibidores en las muestras mediante el agregado de una cantidad conocida del plásmido pET29 conteniendo el gen de resistencia a Kanamicina.

Los resultados obtenidos se corrigieron por el porcentaje de inhibición. El número de copias se calculó por g de suelo seco.

Metodología para el estudio de fitotoxicidad (Sobrero y col., 2004)

Se evaluó la toxicidad de los extractos acuosos del suelo mediante el test de toxicidad aguda en semillas de *Lactuca sativa L.* Se mezclaron 30 g de suelo con 30 ml de agua destilada durante 30 minutos. Luego se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. A partir del sobrenadante (100 %) se realizaron las diluciones 50 %, 25 %, 10 % y 5 %. Se utilizaron 5 ml de cada dilución para embeber los discos de papel de filtro colocados previamente en placas de vidrio de 90 mm de diámetro. Una vez embebidos los papeles, se colocaron 20 semillas de *Lactuca sativa L* por cada placa, en grupos de a 5 (Figura II.6). Cada sistema se armó por duplicado. Las placas se colocaron en cajas, con el fin de conservar la oscuridad y se incubaron durante 5 días a 25°C.



Figura II.6. Placa de Petri conteniendo papel de filtro embebido y 20 semillas de *Lactuca Sativa L* en grupos de a 5 semillas.

Una vez finalizado el tiempo de ensayo, se registró el número de semillas germinadas y la presencia o no de pelos radiculares secundarios. También se registró si hubo o no crecimiento de hongos sobre el papel. Luego se procedió a congelar/descongelar las placas con el fin de registrar el largo de las raíces primarias.

A partir de estos registros se calculó el índice de germinación (IG %) y el índice de inhibición en la elongación radicular (IE %) (Visioli y col., 2014), como se describe a continuación (**Ecuación II.7 y II.8**).

$$IG\% = \frac{G_c - G_n}{G_c} * 100$$

Ecuación II.7: Índice de Germinación. G_c es el número de semillas germinadas en agua y G_n es el número de semillas germinadas con el extracto de suelo.

$$IE\% = \frac{L_c - L_n}{L_c} * 100$$

Ecuación II.8: Índice de Inhibición en la elongación radicular. L_c es la longitud de las raíces desarrolladas en agua y L_n es la longitud de las raíces desarrolladas en presencia del extracto de suelo.

Medida de la productividad del suelo

Se incluyeron ensayos de germinación de semillas de césped (mezcla comercial de 9 variedades: *Lolium perenne*, *Lolium estanzuela*, *Festuca arundanácea*, *Festuca rubra*, *Poa pratensis*, *Poa trivialis*, *Phleum pratensis*, *Agrostis tenuis* y *Cynodon dactylum*) para evaluar la productividad vegetal de muestras de los suelos luego de los tratamientos. En bandejas plásticas (perforadas en la base) de 200 cm² de área y 10 cm de altura se dispusieron 4 cm de suelo. Las semillas se esparcieron de modo uniforme y se cubrieron con aproximadamente 1 cm de suelo. Las bandejas se colocaron a media sombra, al aire libre y se regaron periódicamente. La germinación del césped se monitoreo mediante la documentación de imágenes.

Las plántulas se cosecharon luego de un mes, se lavaron cuidadosamente con agua, y se secaron durante 24 h a 105°C (Laurent y col., 2012). La producción vegetal se evaluó a través de la medida del peso seco de las plántulas germinadas, en cada bandeja al finalizar el mes de ensayo. Los resultados se expresaron como biomasa vegetal seca (cm²)⁻¹.

Análisis estadísticos

El efecto de los distintos parámetros e indicadores evaluados durante los tratamientos se interpretaron por un análisis de varianza (ANOVA) post test de Tukey con XLStat (v7.5.2), con una significancia de $p < 0.05$.

Los Análisis de Componentes Principales (ACP) realizados empleando variables físicas, químicas y biológicas se realizaron con el programa estadístico NTSyS (versión 2.11W).

El estudio de los cambios en las comunidades microbianas, se realizó a través del Análisis de Componentes Principales (ACP) y por de gráficos de barras extendidas usando el software Stamp (versión. 2.1.3), (Parks y col., 2014).

El estudio de la asociación entre las variables físicas, biológicas y la comunidad de los sistemas se realizó a través de Análisis de Correspondencia y Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) que se realizaron utilizando el software con Canoco for Windows (versión 4.5).

Preparación de los microcosmos

1. Tecnologías de remediación biológicas

a) *Acondicionamiento del suelo contaminado (SA)*

Se armaron microcosmos de 500 g de suelo húmedo (S_0), los cuales se voltearon y regaron semanalmente con el fin de conservar la humedad en 22 % aproximadamente. Estos sistemas se incubaron durante 12 meses con temperatura controlada (25°C). Durante el primer mes los microcosmos se monitorearon semanalmente y luego mensualmente mediante el recuento de poblaciones cultivables y actividad deshidrogenasa. Los terrarios se armaron por triplicado en frascos de vidrio de 1L (Figura II.7).



Figura II.7. Sistema modelo donde se realizaron los ensayos de Acondicionamiento y, Bioestimulación.

b) Compostaje del suelo (SC)

Como se describió anteriormente, la proporción ideal C/N para comenzar el compostaje es aproximadamente 30, con un contenido de humedad cercana al 60 % (Stamets y Chilton 1983). Si bien en ensayos de compost tradicional se hace un análisis exhaustivo del contenido de carbono y nitrógeno de todos los materiales a utilizar, los ensayos de compostaje en suelo hacen más hincapié en el contenido de estos elementos presentes en suelo y en la enmienda orgánica.

Se utilizó la enmienda orgánica (estiércol de cabra) y el agente de volumen (rastrajo de avena) que se procesaron como se detalló anteriormente en este capítulo para llevar a cabo el tratamiento de compostaje tradicional. Como control se incluyeron microcosmos de 500 g de suelo que fue volteado y regado durante el tiempo de ensayo (SA).

(1) Ensayo I

En una primera aproximación se buscó encontrar la proporción óptima de suelo (S_0): estiércol. Para ello se ensayaron tres proporciones de suelo: estiércol en microcosmos de 500 g. Las proporciones estudiadas fueron las que se detallan en la Tabla II.11.

Tabla II.11. Armado de microcosmos detallando las proporciones a ensayar.

Microcosmos	g suelo seco : g estiércol seco
S1	0.7 : 0.3
S2	0.5 : 0.5
S3	0.3 : 0.7

En primer lugar el agente de volumen previamente procesado se regó por aspersión durante 10 días. Transcurridos los 10 días, se prepararon las mezclas de suelo: estiércol en las proporciones mencionadas. Una vez armadas las mezclas suelo: estiércol, a las mismas se le agregó 1 volumen del rastrojo de avena procesado y regado. Una vez en contacto los 3 componentes, se procedió al mezclado y armado de cada microcosmo.

Los microcosmos se armaron por triplicado en frascos de vidrio de 1L, que se colocaron en una cámara de temperatura controlada (30°C). Periódicamente los sistemas se regaron y se voltearon. Diariamente se registró la temperatura de cada sistema usando un termómetro digital. Los sistemas se monitorearon periódicamente mediante la medida de la actividad deshidrogenasa, lipasa y recuento de BD-PAHs. Este ensayo se llevó a cabo durante 45 días.

(2) Ensayo II

A partir de los resultados obtenidos en el primer ensayo de compostaje se llevó a cabo un nuevo ensayo en recipientes plásticos de 43 L (46,5 cm largo x 34 cm ancho x 27,5 cm alto). En la base de los recipientes se colocaron mangueras perforadas por las que se introdujo aire al sistema. Sobre las mangueras se armó un lecho de 5 cm de alto con piedras (canto rodado). Sobre este lecho se colocó una malla metálica, con el fin de obtener aireación homogénea. Sobre la malla metálica se colocó la mezcla preparada en proporción 0.7: 0.3 (g suelo seco (S_0): g enmienda) con el agente de volumen incorporado. Los microcosmos fueron como los que se presentan en la Figura II.8.



Figura II.8. Sistema empleado para realizar el ensayo II de compostaje del suelo y el compostaje tradicional.

Los recipientes se colocaron en cajas revestidas con material aislante. Los sistemas se regaron con el fin de mantener la humedad cercana al 60 % y se voltearon, asegurando que el tratamiento fuera aerobio. Durante los primeros 4 meses se registró la temperatura utilizando termómetros digitales. Los sistemas se monitorearon periódicamente durante un año mediante recuento de poblaciones cultivables, actividad deshidrogenasa y toxicidad en semillas. Transcurridos 4 meses de ensayo se observó un cambio macroscópico que consistió en la degradación del agente de volumen. Debido a esto se decidió realizar a este tiempo un análisis químico para determinar el contenido de hidrocarburos totales.

(3) Ensayo III

Con el objetivo de reducir el volumen de material utilizado, se realizó el compostaje en reactores verticales de 5L (Figura II.9) utilizando las proporciones suelo (S_0): enmienda: agente de volumen empleadas en el Ensayo II. Cada dispositivo posee un orificio por donde se registró la temperatura del tratamiento. Los sistemas se airearon mediante la inyección de aire desde una placa perforada posicionada en la parte inferior del sistema. La parte superior del dispositivo estaba abierta a la atmósfera. Los microcosmos se armaron por triplicado. Cada sistema se regó periódicamente. Todos los meses los dispositivos se abrieron, para realizar el muestreo y el volteo de los mismos, con el fin de asegurar la aireación. Mensualmente se evaluó el progreso de las poblaciones cultivables, la actividad deshidrogenasa y la toxicidad en semillas.



Figura II.9. Dispositivo donde se realizó el ensayo III de compostaje del suelo.

c) *Bioestimulación*

(1) **Con enmienda orgánica (SE)**

Se armaron microcosmos conteniendo una mezcla de suelo (S_0): compost en proporción 0.7 g suelo seco: 0.3 g de compost seco, según los resultados obtenidos del ensayo I de compostaje del suelo. El compost utilizado se describió en “Materiales utilizados”, sección **d**. Cada microcosmos se incubó a 25°C, se volteó y se regó semanalmente. Cada sistema se armó en frascos de vidrio de 1L por triplicado que se monitorearon periódicamente durante 30 días, aunque con fines comparativos se incluyeron algunas determinaciones a los 60 días mediante la determinación de poblaciones cultivables y actividad deshidrogenasa. Los sistemas fueron similares a los de la Figura II.7.

(2) **Con sales inorgánicas (SF)**

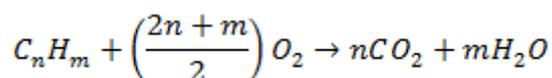
También se hizo la bioestimulación por agregado de sales. Se prepararon microcosmos de 500 g de suelo (S_0) que se fertilizaron con 5 g de $\text{NH}_4\text{NO}_3 \text{ Kg}_{\text{SS}}^{-1}$, cada 15 días hasta alcanzar los 15 g de $\text{NH}_4\text{NO}_3 \text{ Kg}_{\text{SS}}^{-1}$. Considerando que los 15 g de NH_4NO_3 aportan 0.525 g de N al sistema, los microcosmos iniciales tendrán aproximadamente

(0.5 + 0.2) g de N, es decir 0.7 %. Los microcosmos se regaron periódicamente para mantener la humedad cercana al 23 % y se voltearon para favorecer la aireación. Cada microcosmos se monitoreo semanalmente durante un mes. Las muestras para las determinaciones se tomaron previamente al agregado del fertilizante. Luego del primer mes, el monitoreo fue al día 60 y 90 de iniciado el tratamiento. Los microcosmos se armaron en experimentos similares a los de la Figura II.7.

2. Tecnologías de remediación química: aplicación de persulfato de amonio

Está informado que la aplicación persulfato se utiliza para degradar PAHs (Osgerby 2006). Se decidió utilizar persulfato de amonio (PS) en el tratamiento del suelo contaminado, con el objetivo de suplementar nitrógeno al sistema, resultando en un doble efecto: eliminación química del contaminante y fertilización del suelo.

Para elegir la cantidad de oxidante a utilizar es necesario definir una *dosis* como a la mínima cantidad de oxígeno necesaria para oxidar un mol del compuesto, como se detalla en la **Ecuación II.9**.



Ecuación II.9. Oxidación completa de un mol de hidrocarburo.

Por cada mol de oxígeno intervienen 4 moles de electrones. Considerando que el agente oxidante que utilizará es el persulfato, y sabiendo que por cada mol de éste se ponen en juego 2 moles de electrones, se calculó la *dosis* de PS.

En la Tabla II.12 se detalla el contenido de cada PAHs presente en la muestra, el número de electrones necesarios para oxidar 1 mol de cada uno a CO₂ y los gramos de PS que se requieren para oxidar los mg de contaminante por Kg_{SS}. La suma de los gramos de PS es la cantidad necesaria para oxidar el total de los contaminantes, en este caso 1 *dosis* es 10 g de PS por Kg_{SS}.

Considerando que el PS no solo reacciona con los PAHs sino que también con la materia orgánica presente en el suelo, se decidió aplicar 3 *dosis* de oxidante. Se realizaron en total 3 aplicaciones de PS, durante una semana (cada dos días) llegando a un total de 30 g_{PS} Kg_{SS}⁻¹. La aplicación secuencial del agente oxidante se realizó por aspersión de la solución, mezclando el suelo. El suelo se incubó a 30°C, en oscuridad durante la semana en la que se realizaron las aplicaciones. Luego de esta semana se realizó la evaluación de las poblaciones cultivables, de la fitotoxicidad en semillas, de la funcionalidad, de los extractos alcalinos, del contenido de hidrocarburos totales, PS, hierro y sulfatos. También se realizó la extracción de ADN para llevar a cabo los análisis genómicos. Considerando que los 30 g de PS aportan 3.68 g de N Kg_{SS}⁻¹ al sistema, los microcosmos iniciales tendrán (0.368 + 0.20) g de N, es decir 0.57 %, aproximadamente.

Tabla II.12. Contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en la muestra original, detallando los gramos de PS necesarios para su oxidación completa a CO₂ y H₂O.

Compuesto	mg(Kg _{SS}) ⁻¹	Fórmula molecular	Nro de Electrones	g PS(Kg _{SS}) ⁻¹ necesarios
Naftaleno	0	C ₁₀ H ₈	48	0
Acenaftileno	22.47	C ₁₂ H ₈	56	0.94
Acenafteno	1.79	C ₁₂ H ₁₀	58	0.09
Fluoreno	5.827	C ₁₃ H ₁₀	62	0.25
Fenantreno	33.71	C ₁₄ H ₁₀	66	1.43
Antraceno	12.56	C ₁₄ H ₁₀	66	0.53
Fluoranteno	21.71	C ₁₆ H ₁₀	74	0.91
Pireno	49.03	C ₁₆ H ₁₀	74	2.05
Benzo [<i>a</i>] antraceno	16.34	C ₁₈ H ₁₂	84	0.69
Criseno	15.32	C ₁₈ H ₁₂	84	0.64
Benzo [<i>b</i>] fluoranteno; Benzo [<i>k</i>] fluoranteno	13.79	C ₂₀ H ₁₂	92	0.57
Benzo [<i>a</i>] pireno	12.26	C ₂₀ H ₁₂	92	0.51
Indeno [1,2,3- <i>cd</i>] pireno	4.24	C ₂₂ H ₁₂	100	0.17
Dibenzo [<i>a,h</i>]antraceno	1.02	C ₂₂ H ₁₄	102	0.04
Benzo[<i>g,h,i</i>] perileno	4.34	C ₂₂ H ₁₂	100	0.18

3. Tecnologías de remediación combinadas

A partir del suelo resultante de la aplicación de PS, (SOx₀) se ensayaron las siguientes intervenciones, de manera similar a lo descrito en los incisos anteriores.

a) *Acondicionamiento del suelo tratado con PS (SOxA)*

Se armaron microcosmos de 500 g de suelo tratado con PS, luego de una semana de la primera aplicación, los cuales se voltearon y regaron semanalmente con el fin de conservar la humedad en 22 % aproximadamente. Los microcosmos fueron similares a los utilizados en el tratamiento SA, y se armaron por triplicado en frascos de vidrio de 1L. Estos sistemas se incubaron durante 12 meses con temperatura controlada (25°C). Durante el primer mes los microcosmos se monitorearon semanalmente y luego mensualmente.

b) *Compostaje (en reactores verticales de 5L) del suelo tratado con PS (SOxC)*

En base a los resultados obtenidos en el ensayo de Compostaje del suelo contaminado, se decidió continuar trabajando con la proporción antes descripta, cada 0.7 g_{SS} se adicionaron 0.3 g de estiércol seco; en este caso utilizando como material de partida el suelo luego de una semana de la primer aplicación de PS. A la mezcla resultante, se le agregó 1 volumen de rastrojo de avena previamente procesado (triturado y humedecido). Se armaron microcosmos por triplicado en los reactores verticales de 5L (Figura II.9), que se airearon por inyección de aire comprimido desde la placa perforada ubicada en la base de los reactores. Periódicamente se determinó la temperatura y mensualmente se realizó el volteo y riego del material, momento en que se realizó el muestreo correspondiente.

c) *Bioestimulación con enmienda orgánica del suelo tratado con PS (SOxE)*

Utilizando el suelo luego de la primera semana de la primer aplicación de PS, se armaron microcosmos por triplicado conteniendo una mezcla de suelo: compost en proporción 0.7 g suelo seco: 0.3 g de compost seco. Cada microcosmos se incubó a 25°C, se volteó y se regó semanalmente. Cada sistema se armó en frascos de vidrio de

1L por triplicado que se monitorearon, durante el primer mes una vez por semana y durante el tiempo restante (doce meses) el monitoreo fue mensual.

d) *Doble estimulación con enmienda orgánica del suelo tratado con PS (SOxDE)*

Luego de 6 meses de aplicada la primera enmienda (microcosmos SOxE), se realizó un segundo agregado de compost. Para ello se utilizó la relación 0.7 g_{SS} SOxE: 0.3 g de compost seco. Cada sistema se armó en frascos de vidrio de 1L por triplicado que se monitorearon, durante el primer mes una vez por semana y durante el tiempo restante (5 meses) el monitoreo fue mensual.

Capítulo III: Caracterización de un suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos



El objetivo de este capítulo es caracterizar un suelo crónicamente contaminado a través de sus propiedades físicas, químicas, biológicas y toxicológicas con el fin de evaluar la posibilidad de aplicación de diferentes estrategias para su remediación.

Estudios químicos y físicos

A la base de datos disponibles de la caracterización del suelo S_0 (Ver **Capítulo II**), fueron sumadas las siguientes propiedades: pH, conductividad eléctrica (CE), potencial redox (Eh), hierro total y disponible. La Tabla III.1 muestra el total de propiedades determinadas en el suelo crónicamente contaminado, S_0 .

Tabla III.1. Análisis químico del suelo original (S_0) y del suelo del predio (SP). Determinación de la textura, y medida de Carbono Orgánico (CO %), Nitrógeno total (N %), Fósforo disponible (P, [mg Kg⁻¹]), azufre de sulfatos (SO₄²⁻, [mg Kg⁻¹]), Capacidad de retención de agua [%], hierro total y extraíble con EDTA (disponible) (Fe, [mg Kg⁻¹]), pH, Conductividad Eléctrica (CE, [μS cm⁻¹]) y Potencial redox (Eh, [mV]).

Propiedades	S_0	SP
Textura	Franco	Franco
CO [%]	2.20 ± 0.88	2.40 ± 0.30
Materia orgánica [%]	3.78	4.15
N [%]	0.20 ± 0.1	0.24 ± 0.03
P [mg/kg]	8.33 ± 0.63	3.67 ± 0.58
SO ₄ ²⁻ [mg Kg ⁻¹]	97 ± 6	154 ± 6
Capacidad de retención de agua [%]	27.45	35.22
Hierro total [mg Kg ⁻¹]	(2.3 ± 0.7) 10 ⁴	No determinado
Hierro disponible [mg Kg ⁻¹]	12.6 ± 0.3	No determinado
pH	8.8 ± 0.1	7.34 ± 0.21
CE [μS cm ⁻¹]	634 ± 12	336 ± 1
Eh [mV]	236 ± 2	227 ± 3

El contenido de hidrocarburos alifáticos (HAs) determinado en S_0 fue de 2456 ± 246 mg Kg_{ss}⁻¹ (ppm). La Figura III.1.A presenta el detalle de fracciones de hidrocarburos alifáticos. Se puede observar que las fracciones predominantes son las de 17 – 18C, 21 – 22C, 14 – 15C y 20 – 21C, cuyos valores son 305, 294 y 204 mg Kg_{ss}⁻¹ respectivamente. Para facilitar el análisis, se agruparon las fracciones de HAs en Livianos (C9 – C20), Intermedios (C20 – C29) y Pesados (C29 – C35).

En la Figura III.1.B se detallan estas fracciones expresadas como porcentaje, referido al total de hidrocarburos alifáticos. Se puede observar que el suelo está enriquecido en alifáticos livianos e Intermedios (52.9 y 42.6 % respectivamente).

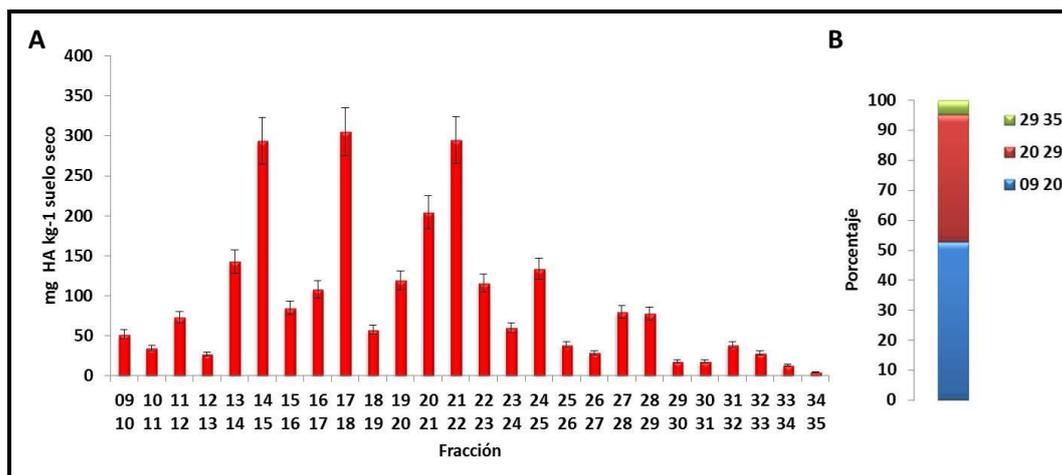


Figura III.1. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) en el suelo original (S_0). A: Contenido de HAs expresado como mg de compuesto Kg_{SS}^{-1} . B: Porcentaje de HAs agrupados según el número de carbono de los compuestos referido al total de HAs.

En la Tabla III.2 se detalla la referencia de cada compuesto enumerado en los análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), así como también se menciona el número de anillos aromáticos de cada compuesto.

Tabla III.2. Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (PAHs). En la columna 1 se presenta el nombre según IUPAC, en la Columna 2 se enumera cada compuesto y en la columna 3 se menciona el número de anillos aromáticos de cada uno de los 16 PAHs.

Compuesto	Número	Número de anillos aromáticos
Naftaleno	1	2
Acenaftileno	2	3
Acenafteno	3	3
Fluoreno	4	3
Fenantreno	5	3
Antraceno	6	3
Fluoranteno	7	4
Pireno	8	4
Benzo [a] antraceno	9	4
Criseno	10	4
Benzo [b] fluoranteno	11	6
Benzo [k] fluoranteno	12	6
Benzo [a] pireno	13	5
Indeno [1, 2, 3 - cd] pireno	14	6
Dibenzo [a, h] antraceno	15	5
Benzo [g, h, i] perileno	16	6

El contenido de PAHs determinado en S_0 fue de 214 ± 21 mg Kg_{SS}^{-1} (ppm). La Figura III.2.A muestra el detalle de la concentración de cada PAH en el suelo. Como puede apreciarse, los compuestos aromáticos predominantes en S_0 fueron pireno,

fenantreno, acenaftileno y fluoranteno, siendo los valores de 49, 34, 22.5 y 22 mg Kg_{SS}⁻¹ respectivamente. En la Figura III.2.B se muestra el porcentaje de acuerdo al número de anillos aromáticos respecto del total de PAHs determinado. Las fracciones de compuestos de 3 y 4 anillos aromáticos fueron las mayoritarias (35 y 50 % respectivamente).

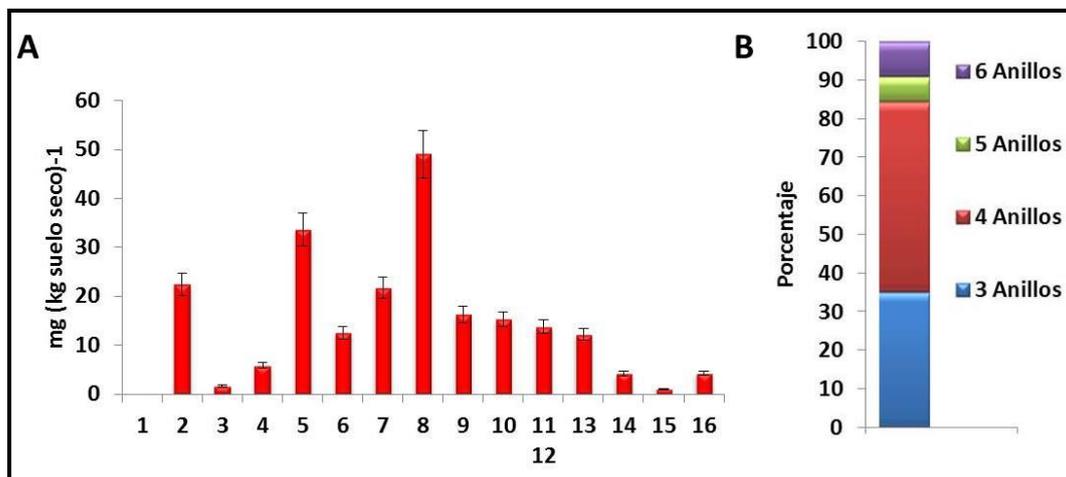


Figura III.2. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (PAHs) en el suelo original (S₀). A. Contenido de PAHs expresado como mg de compuesto Kg_{SS}⁻¹. B. Porcentaje de PAHs agrupados según el número de anillos aromáticos de los compuestos referido al total de PAHs.

Paralelamente a la determinación de hidrocarburos en el suelo, se realizó la determinación de la fracción de PAHs biodisponible, previa extracción con la resina XAD-2. En la Tabla III.3 se presentan los valores de PAHs biodisponible obtenidos. Como puede observarse, los únicos PAHs detectados en los extractos de XAD-2 fueron pireno, benzo [a] antraceno y benzo [a] pireno en aproximadamente 0.3 %, cada uno respecto del total. Estos valores indican que solo el 1 % se encuentra disponible para la degradación microbológica.

Tabla III.3. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (PAHs) biodisponibles del suelo original (S₀). Contenido de PAHs expresado como mg de compuesto Kg_{SS}⁻¹ y como porcentaje respecto del total.

Compuesto	mg Kg _{SS} ⁻¹	Fracción biodisponible [%]
Pireno	0.8	0.36
Benzo [a] antraceno	0.6	0.30
Benzo [a] pireno	0.7	0.33

El contenido de Carbono Total Disuelto (CTD) presente en S₀ fue determinado a partir de un extracto alcalino del suelo, determinándose un valor de 96 ± 3 mg C L⁻¹.

La misma determinación se realizó sobre una muestra de suelo del predio donde se encontraba la empresa (SP), pero fuera del área de influencia del contaminante. Este suelo fue utilizado como línea base de referencia. El valor de CTD determinado fue de $151 \pm 2 \text{ mg C L}^{-1}$.

A partir de los extractos alcalinos de S_0 y SP se analizaron las características espectroscópicas mediante la determinación de los espectros de absorción y las Matrices de Excitación Emisión de Fluorescencia (MEEF). Como medida adicional para la interpretación del análisis, se incluyeron las correspondientes a una solución acuosa saturada (25°C) con los 16 PAHs.

En la Figuras III.3 se presentan los espectros de absorción a los que se ajustó la absorbancia a $\lambda=550 \text{ nm}$ en 0.01 respectivamente. Para ello los extractos se diluyeron 1 en 10 en agua bidestilada.

A partir de los espectros de absorción se calculó la relación E_4/E_6 para el suelo contaminado, dando un valor de ~ 15 , mientras que para el suelo del predio el cociente fue ~ 14 .

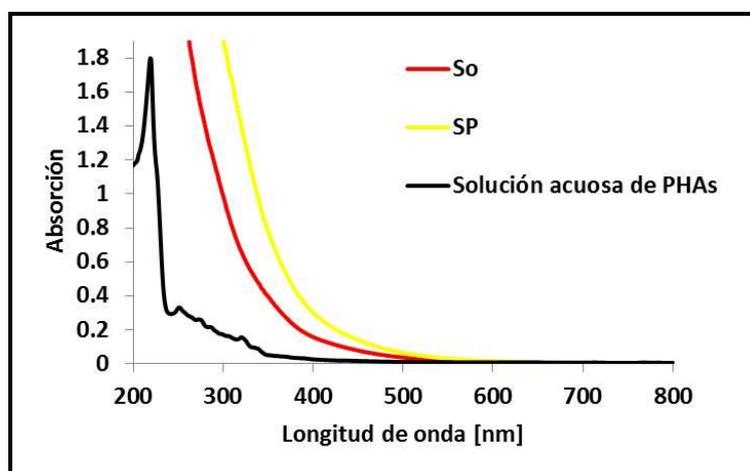


Figura III.3. Espectros de absorción de extractos alcalinos. Espectros del extracto alcalino del suelo original (S_0), extracto alcalino del suelo del predio (SP), de una solución acuosa saturada de 16 PAHs (mezcla de PAHs).

La emisión de las muestras ambientales se debe a la contribución resultante de todas las sustancias presentes en los extractos, con capacidad de emitir fluorescencia. Según se describe en bibliografía, existen compuestos aromáticos con propiedades

fotoquímicas muy diferentes. El fenantreno, por ejemplo, posee solo un máximo de emisión mientras que el pireno presenta 8 picos de emisión de fluorescencia (Ferretto y col., 2014).

La Figura III.4 presenta las matrices de excitación emisión de fluorescencia (MEEF) de los extractos de S_0 , SP, una solución saturada en los 16 PAHs y del agua.

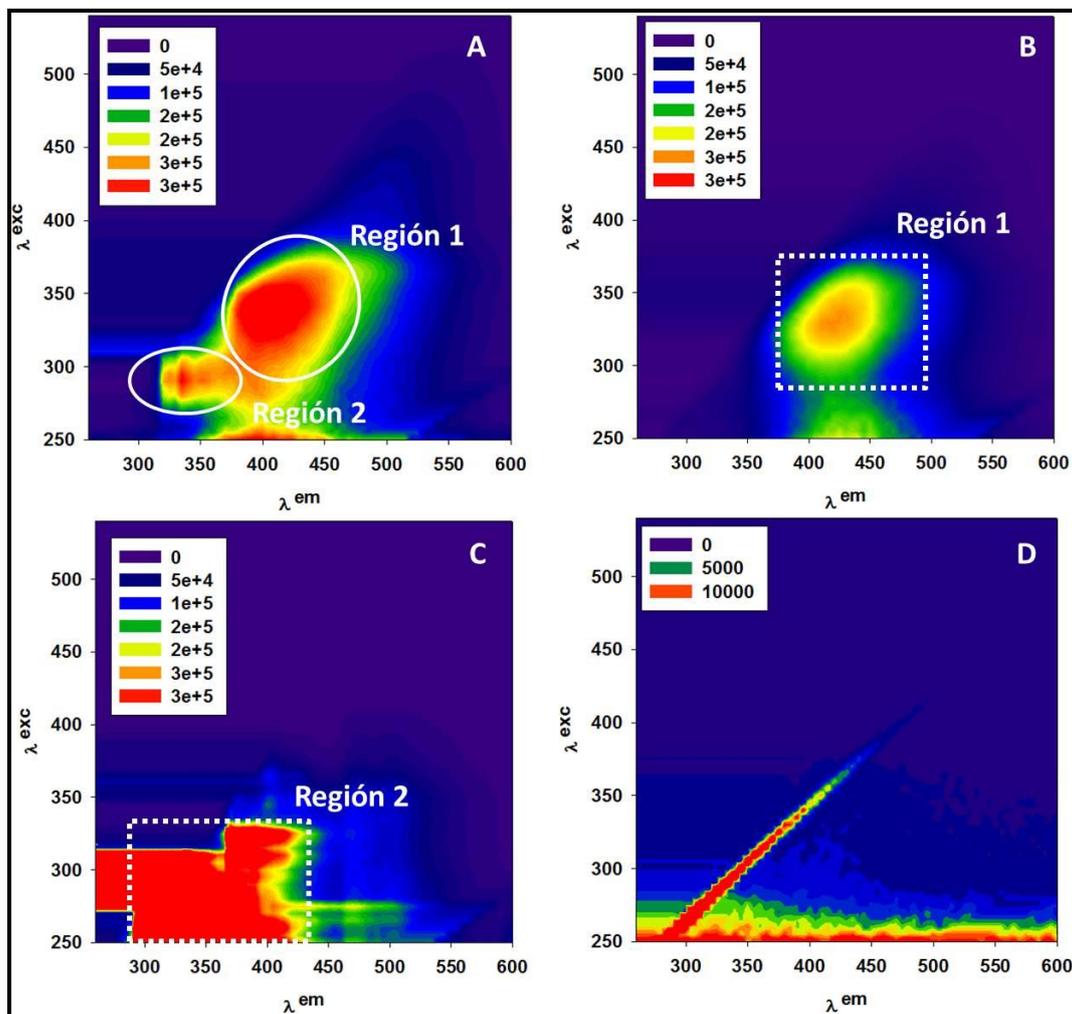


Figura III.4. Matrices de Excitación Emisión de Fluorescencia (MEEF) de extractos alcalinos. A. Extracto alcalino del suelo original (S_0). **B.** Extracto alcalino del suelo del predio (SP). **C.** Solución acuosa saturada de 16 PAHs. **D.** Agua. En la figura B se remarca la Región 1, característica de las sustancias húmicas del suelo, mientras que en la figura C se remarca la Región 2, característica de los PAHs.

En la matriz del extracto de S_0 (Dil 1:10) se encontraron dos regiones, con máximos locales en la Región 1, λ_{exc} 340 - λ_{em} 400 nm y en la Región 2, λ_{exc} 280 - λ_{em} 330 nm.

La matriz generada por los extractos alcalinos provenientes de SP (Dil 1:10) mostró solamente una región de intensa emisión (Región 1), centrada en λ_{exc} 350 - λ_{em} 400 nm.

λ_{em} 440 nm. Esta región es coincidente con la de compuestos orgánicos solubles del tipo de las sustancias húmicas (David Gara y col., 2011; Merdy y col., 2014).

La MEEF de la solución acuosa saturada en los 16 PAHs (Dil 1:2) muestra la complejidad del sistema, ya que se encontró una emisión amplia (Región 2), posicionada en la zona λ_{exc} 250 - 325 - λ_{em} 290 - 430 nm correspondiente a la emisión de fluorescencia de los PAHs (Ferretto y col., 2014; Hanser y col., 2014).

Por lo tanto, la MEEF del extracto alcalino de S_0 puede interpretarse entonces, como resultante de las contribuciones de la materia orgánica natural del suelo (Región 1) y a la presencia de PAHs (Región 2).

En la Tabla III.4 se muestran los rangos de excitación con sus emisiones características, para los 16 PAHs (Goicoechea y col., 2012) y de las sustancias húmicas y fúlvicas (Merdy y col., 2014). Con estos resultados y basados en la bibliografía, podemos asignar la Región 1 como característica de las sustancias húmicas de S_0 mientras que a la Región 2 de los PAHs presentes en él.

Tabla III.4. Regiones de excitación- emisión de fluorescencia característica de las sustancias en estudio.

Compuesto	λ excitación (nm)	λ emisión (nm)
Naftaleno	280.5-285.5	319.9-320.7
Acenafteno	283.0-289.5	319.3-319.1
Fluoreno	281.5-287.5	303.6-305.1
Fenantreno	286.0-290.0	350.4-351.7
Antraceno	282.5-295.0	383.6-384.4
Fluoranteno	280.0-290.0	402.7-403.8
Pireno	280.5-290.0	370.1-371.2
Benzo [a] antraceno	281.0-288.5	381.6-382.4
Criseno	280.0-286.5	362.1-362.8
Benzo [b] fluoranteno	284.5-290.0	398.6-399.5
Benzo [k] fluoranteno	280.0-289.5	401.5-402.4
Benzo [a] pireno	283.0-287.5	400.5-401.5
Indeno [1,2,3-cd] pireno	283.5-290.0	401.5-402.4
Dibenzo [a,h] antraceno	281.0-295.0	390.9-392.1
Benzo [g,h,i] perileno	283.0-288.5	404.6-405.3
Sustancias fúlvicas	230.0-270.0	380.0-480.0
Sustancias húmicas	330.0-370.0	420.0-480.0

Análisis de las poblaciones microbianas cultivables

En la Tabla III.5 se presentan los valores de las poblaciones microbianas estudiadas en la caracterización del suelo original (S_0).

Tabla III.5. Densidad de poblaciones microbianas determinadas en S_0 .

Población	S_0
Bacterias heterótrofas (BH) [log UFC g_{SS}^{-1}]	7.60 ± 0.08
Hongos (RH) [log UFC g_{SS}^{-1}]	5.8 ± 0.2
Bacterias solubilizadoras de P (BSP) [log UFC g_{SS}^{-1}]	3.7 ± 0.8
Bacterias degradadoras de HAs (NMP-BD-HAs) [log NMP g_{SS}^{-1}]	1.8 ± 0.2
Bacterias degradadoras de PAHs (NMP- BD-PAHs) [log NMP g_{SS}^{-1}]	3.4 ± 0.2
Bacterias degradadoras de celulosa (NMP- BD-C) [log NMP g_{SS}^{-1}]	1.1 ± 0.2

La densidad de bacterias heterótrofas y de bacterias degradadoras de hidrocarburos alifáticos obtenidas fueron de un orden por debajo los valores reportados para suelos sin contaminación (Pessacq y col., 2015). Sin embargo, la densidad de la población fúngica y de la población de bacterias degradadoras de PAHs fueron del mismo orden que los encontrados para suelos prístinos.

La densidad de bacterias que solubilizan fósforo fueron del mismo orden a los hallados en suelos agrícolas de la provincia de Buenos Aires (Fernández y col., 2005), aunque de menores que los hallados en suelos rizosféricos; mientras que la densidad de bacterias degradadoras de celulosa fue 4 ordenes menor que los encontrados en suelos rizosféricos (Lizarazo-Medina y Gómez-Vásquez 2015).

Caracterización de la funcionalidad del suelo

La funcionalidad del suelo original se estudió a través de la medida de la actividad enzimática de deshidrogenasa, lipasa, arilsulfatasa, fosfatasa y proteasas. La Tabla III.6 presenta los resultados obtenidos.

Tabla III.6. Actividades enzimáticas estudiadas en la caracterización del suelo contaminado (S₀). Las medidas se realizaron por triplicado.

Actividad enzimática	Valor
Deshidrogenasa [$\mu\text{g TPF g}_{\text{SS}}^{-1}$]	<i>No detectado</i>
Lipasa [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	189 \pm 4
Arilsulfatasa [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	33 \pm 1
Fosfatasa alcalina [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	175 \pm 24
Fosfatasa ácida [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	103 \pm 20
Ureasa [$\mu\text{gN-NH}_4\text{g}_{\text{SS}}^{-1}$]	23 \pm 6
Proteasa [$\text{mg Tyr g}_{\text{SS}}^{-1}$]	<i>No detectado</i>

Todos estos valores fueron menores a los valores reportados en suelos sin historia de contaminación (Pessacq y col., 2015). El hecho de no encontrar actividad deshidrogenasa, indicador de los procesos biológicos globales de óxido-reducción, permite inferir la baja funcionalidad del suelo. La baja actividad lipasa, podría estar asociada a la cronicidad del suelo, ya que es un indicador de procesos biológicos de eliminación de hidrocarburos (Brzeszcz y col., 2016).

Para completar el estudio de funcionalidad del suelo, se evaluó la capacidad de respuesta respiratoria inducida por sustrato (SIR) del suelo frente al agregado de 28 sustratos distintos.

A partir de los nmoles de CO₂ producidos por los 28 sustratos, se calculó el % correspondiente a cada uno de ellos, como lo indican Degens y Harris (1997) en su trabajo. La Tabla III.7 muestra los valores de SIR obtenidos. Solo tres de los sustratos ensayados presentaron una producción de CO₂ mayor al 2 %: glucosa 6 fosfato, ácido cítrico y ácido ascórbico.

Con los sustratos que evidenciaron mineralización mayor al 2 %, se prepararon sistemas con suelo previamente tratado con HgCl₂ (1 % p/p) como biocida, más el

agregado del sustrato, con la finalidad de verificar que los valores de CO₂ medidos con estos sustratos fueran debidos a la mineralización biológica.

En la Figura III.5 se muestra la producción de CO₂ en los sistemas tratados y sin tratar con HgCl₂, utilizando los sustratos antes mencionados. En todos los casos, los sistemas tratados mostraron igual o mayor mineralización que los sistemas sin tratar. Esto indicaría que la producción de CO₂ fue debida principalmente a reacciones abióticas promovidas por el efecto oxidante del HgCl₂ en la matriz de suelo ($E_{\text{HgCl}_2}^{\circ}$ 0.63 volt), por lo que el sistema empleado como control abiótico no resultó adecuado para realizar el objetivo propuesto.

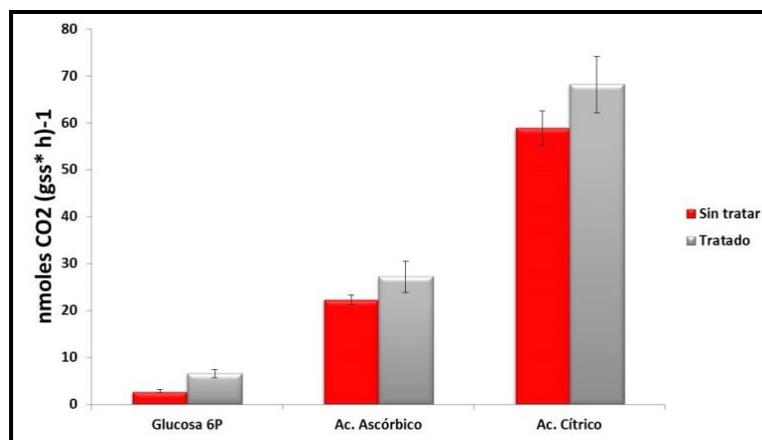


Figura III.5. Producción de CO₂ del suelo tratado con HgCl₂ y del suelo sin tratar (S₀). Los resultados se expresan como nmol de CO₂ (g ss* h)⁻¹.

Tabla III.7. Perfil catabólico de S₀. Producción de CO₂ obtenida para cada sustrato, expresada en nmoles CO₂ (g_{SSh})⁻¹ y en % respecto del total de CO₂ producido.

Sustrato	nmoles CO ₂ (g _{SSh}) ⁻¹	% CO ₂ (g _{SSh}) ⁻¹
Glucosa	0.04 ± 0.06	0.05
Xilosa	0.103 ± 0.007	0.12
Fructosa	<i>No detectado</i>	-
Manitol	<i>No detectado</i>	-
Celobiosa	<i>No detectado</i>	-
Lactosa	0.05 ± 0.04	0.06
Adonitol	<i>No detectado</i>	-
Glucosa 6 fosfato	2.8 ± 0.3	3.15
Glucosa 3 fosfato	<i>No detectado</i>	-
Piruvato de sodio	<i>No detectado</i>	-
Glicina	<i>No detectado</i>	-
Fenilalanina	0.4 ± 0.2	0.48
Taurina	<i>No detectado</i>	-
Arginina	0.2 ± 0.1	0.25
Tirosina	<i>No detectado</i>	-
N acetil glucosamina	<i>No detectado</i>	-
Ácido succínico	<i>No detectado</i>	-
Ácido glutámico	1.16 ± 0.08	1.31
Ácido ascórbico	22 ± 1	25.31
Ácido cítrico	59 ± 4	66.74
Dextrina	<i>No detectado</i>	-
Tween 20	0.59 ± 0.03	0.67
Tween 80	0.3 ± 0.1	0.41
Almidón	<i>No detectado</i>	-
Tetracosano	<i>No detectado</i>	-
Ácido naftoico	1.2 ± 0.1	1.34
Fenantreno	0.08 ± 0.07	0.09
Fluoreno	<i>No detectado</i>	-
Total	88 ± 6	100

En negrita se resaltan los sustratos con producción de CO₂ superior al 2 % del total.

Análisis genómico de la comunidad microbiana de S_0

Se determinó la estructura de la comunidad del suelo mediante dos técnicas independientes de cultivo: PCR-DGGE y pirosecuenciación aplicada a las regiones hipervariables V3-V5 y V4-V5 del gen 16S rARN.

En la Figura III.6 se muestra la imagen de la DGGE obtenida a partir del producto de amplificación por PCR del ADN extraído de S_0 .

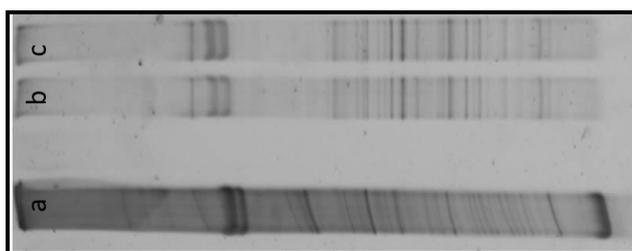


Figura III.6. Estructura de la comunidad microbiana del suelo original (S_0). Gel desnaturalizante con gradiente lineal de urea-formamida 45/70%. La calle “a” corresponde a una muestra control, las calles “b” y “c” corresponden a dos muestras independientes de S_0 .

Las calles “b” y “c” corresponden a dos muestras independientes de S_0 . La calle “a” corresponde a una comunidad de un suelo diferente, utilizada como marcador. Como puede apreciarse, las réplicas biológicas presentadas en las calles “b” y “c” son reproducibles. La técnica PCR-DGGE permitió apreciar bandas discretas en el gel, de lo que se infiere una gran diversidad de poblaciones asociada al proceso de degradación ocurrido durante el tratamiento de biorremediación.

En la Figura III.7 se muestra la estructura de la comunidad obtenida por pirosecuenciación de las regiones hipervariables V3-V5 del gen 16S rARN, y V4-V5, expresado como porcentaje de secuencias encontradas (a nivel de clase).

Mediante la pirosecuenciación de las regiones hipervariables V3-V5 se obtuvo un total de 5.984 secuencias tras aplicar los filtros de calidad, y en promedio 6.078, por el análisis de las regiones V4-V5.

Como se puede apreciar, independientemente del método, se encontró dominancia de las clases *Actinobacteria* (45 % / 43 %), *Alphaproteobacteria* (27 % / 26 %), *Gammaproteobacteria* (16 % / 11 %), y *Betaproteobacteria* (2 % / 4 %) siendo los

miembros de la primera clase pertenecientes al grupo de bacterias Gram positivas (GP) y los siguientes, pertenecientes al grupo de bacterias Gram negativas (GN).

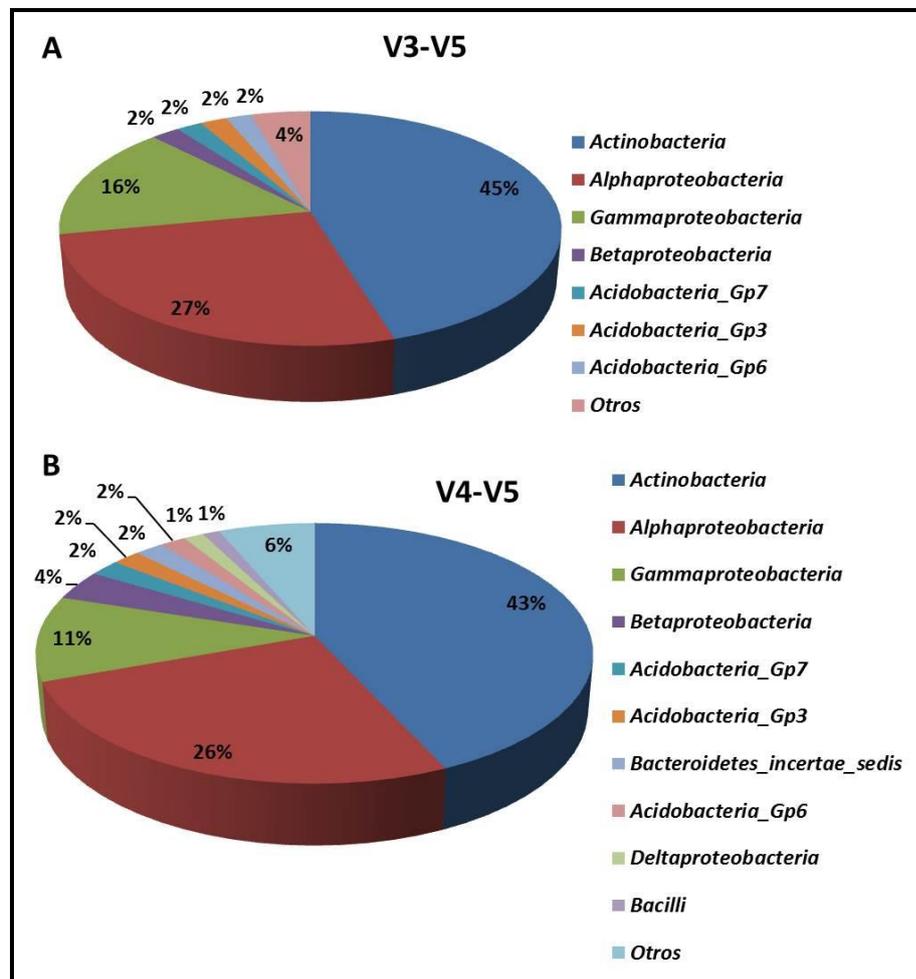


Figura III.7. Estructura de la comunidad microbiana del suelo original (S_0). A. Estructura de la comunidad a nivel de Clase, obtenida por pirosecuenciación de las regiones V3-V5 del gen 16S rARN. B. Estructura de la comunidad a nivel de Clase, obtenida por pirosecuenciación de las regiones V4-V5 del gen 16S rARN. Los resultados se expresan como porcentaje de secuencias de cada clase respecto del total de secuencias obtenidas.

La Tabla III.8 presenta las OTUs observadas, los índices de diversidad estimados y la cobertura encontrada en ambos procesos.

Tabla III.8. Parámetros de diversidad correspondientes a la comunidad microbiana del suelo contaminado (S_0). Resultados obtenidos por análisis de las regiones hipervariables V3-V5 y V4-V5 del gen 16S rARN,

Región	OTUs Observadas	0D	1D	2D	Cobertura [%]
V3-V5	230	473	62	43	85
V4-V5	435	624	70	45	95

Describiendo la comunidad a través de la serie de Hill, es posible inferir que se trata de una comunidad diversa, con gran número de especies (0D), evidenciándose arreglos de comunidades con algunas especies dominantes (2D).

Clonado de genes específicos de degradación de PAHs

A partir de muestras del suelo original, S_0 se clonaron los productos de la amplificación de genes dioxigenasa (PAH-RHD α), tanto para procariontas gram positivos (GP) como gram negativos (GN). En la Figura III.8 se muestra la fotografía de los productos de amplificación para GN y GP.

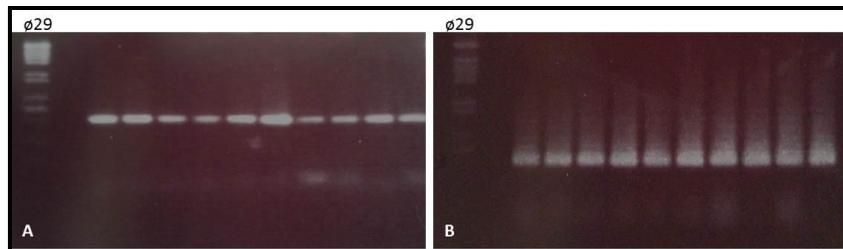


Figura III.8. Fotografía del gel de agarosa 2% (p/v) teñido con Gel red. A. Amplificación de PAH-RHD α GN. **B.** Amplificación de PAH-RHD α GP.

En la Figura III.9 se muestran los clones conteniendo el fragmento del gen PAH-RHD α GP crecidos luego de la transformación de *E. Coli* DH5 α , y la posterior selección.

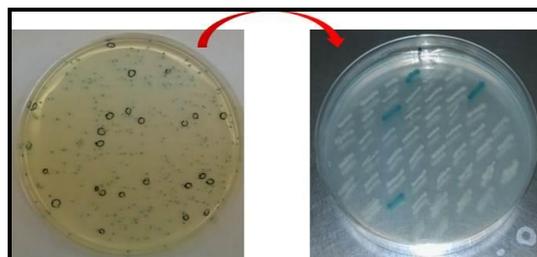


Figura III.9. Clonado del fragmento del gen PAH-RHD α GP. A. Fotografía de los clones recombinantes luego de una noche de incubación a 37°C. **B.** Fotografía de los clones recombinantes (blancos) luego de su selección.

Diez clones de cada población, escogidos al azar se secuenciaron. La Figura III.10 presenta los alineamientos de las secuencias obtenidas para ambas poblaciones, las secuencias obtenidas para cada clon así como el número de acceso con el que se depositaron en la base de datos (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se detallan en el Anexo VI.

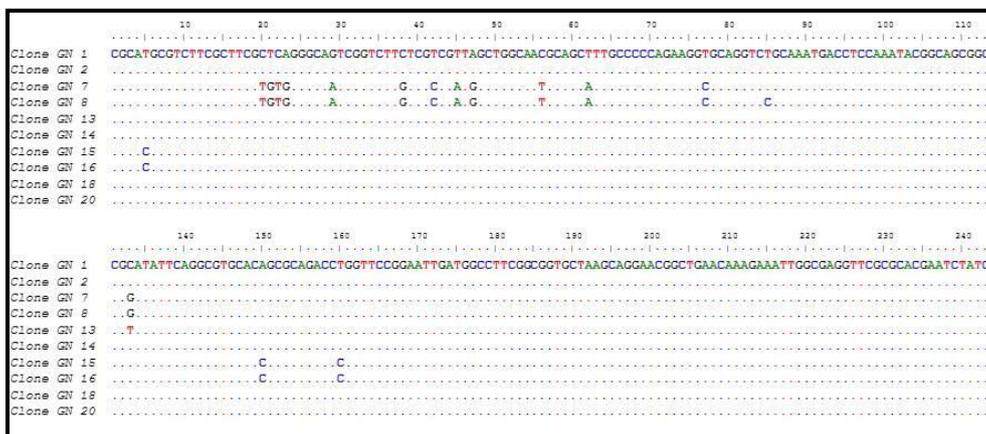


Figura III.10.A. Alineamiento de las secuencias de PAH-RHD α GN. Alineamiento obtenido utilizando el software BioEdit (v7.0.9) *Sequence alignment Editor*. Los puntos representan nucleótidos iguales.

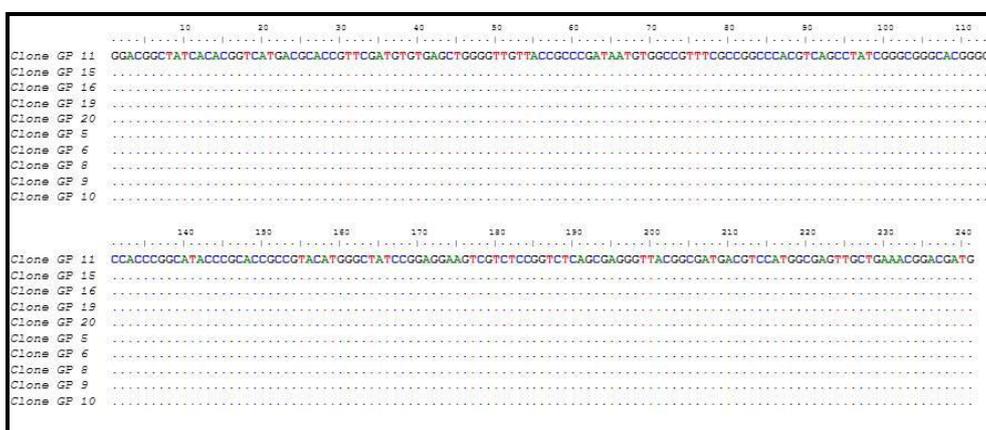


Figura III.10.B. Alineamiento de las secuencias de PAH-RHD α GP. Alineamiento obtenido utilizando el software BioEdit (v7.0.9) *Sequence alignment Editor*. Los puntos representan nucleótidos iguales.

Como primera observación puede apreciarse que la población de genes PAH-RHD α –GN muestra diversidad de secuencias, en cambio en la población de genes PAH-RHD α –GP solo se detectó una única secuencia.

De acuerdo a los alineamientos realizados utilizando la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool (Nucleotide Blast)*, las secuencias encontradas para PAH-RHD α -GN mostraron alta similitud (> 95 %) con el gen correspondiente al género

Pseudomonas. La secuencia encontrada para los genes PAH- RHD α -GP mostró 100 % de identidad con el gen correspondiente al género *Mycobacterium*.

Ensayos de fitotoxicidad

A partir de extractos acuosos obtenidos de S_0 , se determinaron el índice de Inhibición de la germinación (IG %) e índice de Inhibición de la elongación radicular (IE %). La Figura III.11 presenta los resultados del ensayo.

El IG % evidenció un efecto fitotóxico significativo, alcanzando un máximo (28 %) en el extracto sin diluir, con respecto al control.

Se observaron valores negativos para el IE %, es decir, que las raíces generadas fueron de mayor longitud que el control (agua). Debido a la dispersión de los datos, no se encontraron diferencias significativas entre los IE % entre las distintas diluciones del extracto.

La Figura III.12 presenta las fotografías de las plántulas desarrolladas con estos extractos. Las radículas generadas por estos extractos acuosos no solo fueron más largas (aunque sin soporte estadístico) sino que también fueron de menor diámetro que las raíces control y con escasos pelos radiculares. Si bien no se incluyó en el ensayo la medida de la elongación del hipocótilo, se observó que los hipocótilos de las semillas germinadas en presencia del extracto de S_0 fueron más largos que los correspondientes al control.

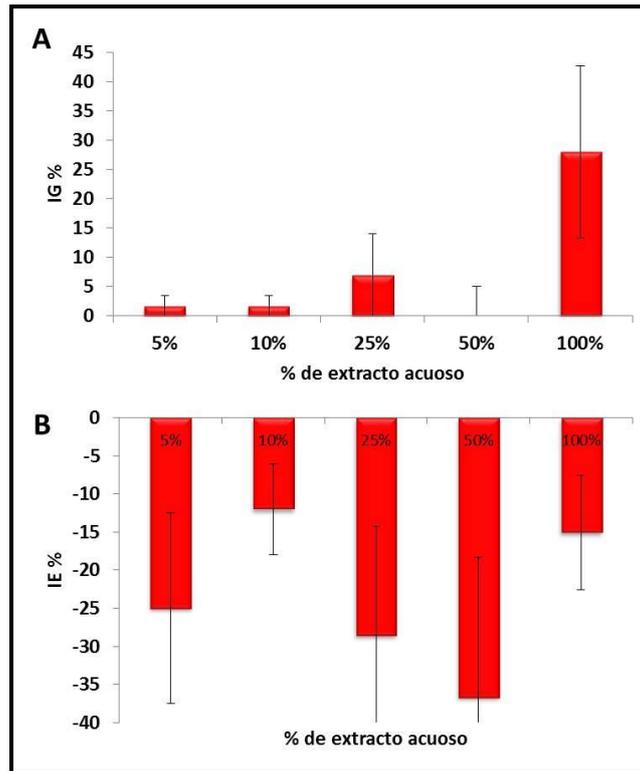


Figura III.11. Ensayos de fitotoxicidad de los extractos acuosos de S_0 . **A:** Índice de Inhibición de la germinación (IG %). **B:** Índice de Inhibición en la elongación radicular (IE %). Los ensayos se realizaron utilizando extractos acuosos del suelo original (S_0).



Figura III.12. Morfología de las plántulas de *Lactuca sativa* L. **A.** Esquema tomado de Sobrero y col., 2004. **B.** Plántulas generadas por tratamiento con agua destilada. **C.** Plántulas generadas por tratamiento con el extracto sin diluir de S_0 .

Discusión

El suelo contaminado bajo estudio corresponde a la clase textural franco, con bajo contenido de materia orgánica, comparado con suelos agrícolas e inclusive con el suelo muestreado del predio industrial (SP).

Particularmente el contenido de carbono orgánico del suelo es considerado como el principal determinante de su productividad a través de los efectos que ejerce sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Martínez y col., 2008).

La relación C:N:P encontrada fue de 0.3:0.03: 1. Tomando como referencia el trabajo de Teng y col., 2010, donde se propone una relación para la biodegradación de hidrocarburos de 33:5:1, el resultado del suelo en estudio indicaría un déficit de carbono y nitrógeno, condición desfavorable para el mantenimiento de una comunidad activa en el ciclo biogeoquímico de la materia.

El potencial redox medido evidenció un entorno aeróbico, lo que resulta positivo para la actividad microbiana, particularmente para microorganismos degradadores aerobios (Husson 2013). La elevada conductividad de S_0 respecto de SP y el pH alcalino serían consecuencia del tratamiento de biorremediación del barro petroquímico.

Dicho tratamiento habría dejado en el suelo una concentración residual de hidrocarburos totales de 2600 ppm, correspondiendo 2456 ppm a los HAs y 214 ppm a los PAHs, ambos pertenecientes principalmente a las fracciones de menor peso molecular. La baja biodisponibilidad de los PAHs determinada en S_0 , sería indicadora de la cronicidad de la contaminación, haciendo relevante el *secuestro* de los PAHs durante el proceso de biodegradación de la MOS por la comunidad autóctona (Huesemann y col., 2004; Bamforth y Singleton 2005; Lladó y col., 2009).

La relación E_4/E_6 determinada en los extractos de S_0 (15) fue similar a la encontrada en el suelo del predio, SP (14), sugiriendo que el tipo de sustancias húmicas proveniente de ambos suelos son similares (Morán Vieyra y col., 2009; David Gara y col., 2011). El estudio de los extractos alcalinos de S_0 , realizado a través de las matrices de excitación emisión de fluorescencia (MEEF), permitió discriminar dos regiones, evidenciando la presencia de sustancias húmicas del suelo (Región 1) y PAHs

(Región 2). La Región 1 de estos extractos fue similar a la encontrada en SP, aunque algo desplazada y de mayor intensidad de emisión.

La determinación de poblaciones bacterianas heterótrofas y degradadoras de hidrocarburos, sumado a las solubilizadoras del P, indicaría la presencia de una comunidad microbiana autóctona capaz de intervenir en las diferentes rutas degradativas de la materia orgánica, y también de los hidrocarburos.

La mayor abundancia de miembros de las clases *Proteobacteria* y *Actinobacteria* en la comunidad autóctona de S₀ es un rasgo frecuentemente hallado en comunidades de suelos contaminados con hidrocarburos (Scherr y col., 2012; Sawulski, Clipson y Doyle 2014; Lladó y col., 2014; Liao y col., 2015).

Las *proteobacterias* son microorganismos Gram negativos, muy abundantes en suelo y con una gran diversidad metabólica. Son considerados microorganismos de crecimiento rápido ante una fuente de carbono fácilmente asimilable (estrategas *r*), que incluyen por ejemplo a miembros del género *Pseudomonas*. Los miembros del género *Pseudomonas* se caracterizan por poseer una alta capacidad de metabolizar distintos compuestos, entre ellos hidrocarburos (Festa, y col., 2013; Brzeszcz y col., 2016). Por su parte, las *actinobacterias* son un filo y una clase de bacterias Gram positivas de crecimiento lento (estrategas *k*) y adaptadas a un ambiente con baja disponibilidad de recursos. Al igual que las *proteobacterias*, poseen amplia diversidad de metabolizar distintos sustratos, y debido a esto han sido ampliamente estudiadas durante los últimos años para su empleo en remediación ambiental (Smyth y col., 2010; Brzeszcz y col., 2016). El hallazgo de genes dioxigenasa con elevada similitud a los correspondientes a *Pseudomonas* y a *Mycobacterium* evidenció el potencial degradador de PAHs de la comunidad microbiana autóctona del S₀.

Integrando los resultados obtenidos, el proceso de *landfarming* finalizado al menos dos años atrás, habría dejado un residual de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en el suelo, escasamente biodisponibles, con una comunidad microbiana autóctona diversa, medianamente equitativa, y potencialmente degradadora de PAHs. El proceso de biodegradación implicó también la degradación de la MOS, como lo evidencia el valor más bajo de CTD de S₀ respecto de SP, aun de calidad degradable.

Sin embargo, los valores de actividad enzimática fueron más bajos que los frecuentemente encontrados en suelos sin contaminación, SP (Pessacq y col., 2015). La baja funcionalidad de S_0 sería indicativa de una comunidad con un bajo potencial metabólico, una propiedad asociada a suelos que han sido intensivamente aprovechados, en largos periodos de cultivo (Degens y col., 2001) o por tecnologías de biorremediación (Del Panno y col., 2005; Griffiths y Philippot 2013; Pessacq y col., 2015).

La fitotoxicidad evidenciada en S_0 resultó también indicadora de la acumulación de metabolitos intermedios de la degradación de PAHs, o bien a la acumulación relativa de PAHs genotóxicos de alto peso molecular (Morelli y col., 2001), probablemente potenciada por la elevada salinidad (Esechie 1994).

Si bien la toxicidad de compuestos derivados del petróleo puede disminuir durante su biodegradación, ciertos compuestos o sus productos de degradación también pueden asociarse a la matriz del suelo (SH), reduciendo así el efecto fitotóxico (Scelza y col., 2010). La disminución de la toxicidad dependiente del tiempo no siempre ocurre, y esto puede estar relacionado con las propiedades del suelo, incluida su comunidad microbiana, factores ambientales y la naturaleza de los compuestos involucrados en la toxicidad (Scelza y col., 2010).

Conclusiones

El suelo crónicamente contaminado (S_0), pobre en materia orgánica, evidenció una baja funcionalidad y significativa toxicidad. Se evidenció una comunidad microbiana diversa, con un arreglo uniforme, adaptada a las condiciones del suelo original y con potencial capacidad degradadora de PAHs.

Por lo expuesto, mediante la corrección del déficit nutricional por aporte de materia orgánica, como así también de las variables humedad, temperatura, aireación sería posible estimular la comunidad microbiana autóctona promoviendo la eliminación de forma co-metabólica, de los hidrocarburos residuales y productos de degradación acumulados y/o secuestrados en la matriz de S_0 .

Capítulo IV: Tecnologías de remediación biológicas aplicadas al suelo crónicamente contaminado



En el presente capítulo desarrolla la hipótesis

La aplicación de estrategias de compostaje al suelo crónicamente contaminado promueve la eliminación de los hidrocarburos y la recuperación de las capacidades funcionales de suelos crónicamente contaminados, mejorando así la calidad del suelo

planteada a través del siguiente objetivo:

Estudiar la eficiencia de las tecnologías de remediación biológicas aplicadas al suelo crónicamente contaminado, particularmente de estrategias de compostaje, en la eliminación de hidrocarburos y en la recuperación de su funcionalidad.

Para tal fin, se aplicaron los siguientes tratamientos:

- a) Acondicionamiento del suelo mediante termostatación y riego (SA)
- b) Compostaje del suelo (SC)
- c) Estimulación del suelo con compost maduro (SE)
- d) Estimulación del suelo con fertilizantes (SF)

Los tratamientos se analizaron a través de los cambios producidos en:

- a) La concentración de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en el suelo
- b) La fracción biodisponible de PAHs del suelo.
- c) La estructura de la comunidad microbiana del suelo, mediante métodos dependientes e independientes de cultivo (PCR/DGGE, y por pirosecuenciación de las regiones hipervariables V3-V5 del gen 16S rARN).
- d) La actividad biológica, medida a través de la actividad deshidrogenasa.

Se evaluó la calidad final del suelo remediado, considerando los cambios generados en la matriz del suelo, su funcionalidad y fitotoxicidad.

Acondicionamiento del suelo crónicamente contaminado (SA)

Estudios químicos y físicos

En los microcosmos de suelo acondicionado (SA) durante 12 meses de tratamiento, se observó un descenso en los valores de pH, con respecto al valor de S_0 , tal como se detalla en la Tabla IV.1. No se encontraron variaciones en la conductividad eléctrica, pero sí un descenso del potencial redox, con respecto al S_0 . No se observaron cambios significativos en el contenido de CO ni de N. Se encontró un descenso significativo en el contenido de P con respecto a S_0 .

Tabla IV.1. Análisis químico del suelo original (S_0) y del microcosmos de suelo acondicionado (SA) luego de 12 meses de tratamiento. Medida de pH, Conductividad Eléctrica (CE, [$\mu\text{S cm}^{-1}$]), Potencial redox (Eh, [mV]), Carbono Orgánico (CO %), Nitrógeno total (N %) y Fósforo disponible (P, [mg Kg^{-1}]).

Propiedades	S_0	SA
pH	8.8 ± 0.1	7.6 ± 0.1
CE [$\mu\text{S cm}^{-1}$]	634 ± 12	549 ± 42
Eh [mV]	236 ± 2	219.9 ± 0.5
CO [%]	2.2 ± 0.9	2 ± 1
N [%]	0.2 ± 0.1	0.20 ± 0.03
C:N	11	10
P [mg Kg^{-1}]	8.3 ± 0.6	6.0 ± 0.3
C:N:P	0.3: 0.03:1	0.3: 0.03:1

La Tabla IV.2 y la Figura IV.1 presentan el contenido de HAs en los microcosmos S_0 y SA, donde puede apreciarse que el tratamiento no produjo una eliminación significativa en la concentración de HAs.

Tabla IV.2. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) en el suelo original (S_0) y microcosmos de suelo acondicionado (SA) luego de 12 meses de tratamiento.

Microcosmos	HAs [$\text{mg Kg}_{\text{SS}}^{-1}$]	C9 – C20 [%]	C20 – C29 [%]	C29 – C 35 [%]
S_0	2456 (a)	52.9	42.1	5.0
SA	3239 (a)	52.8	41.4	5.8

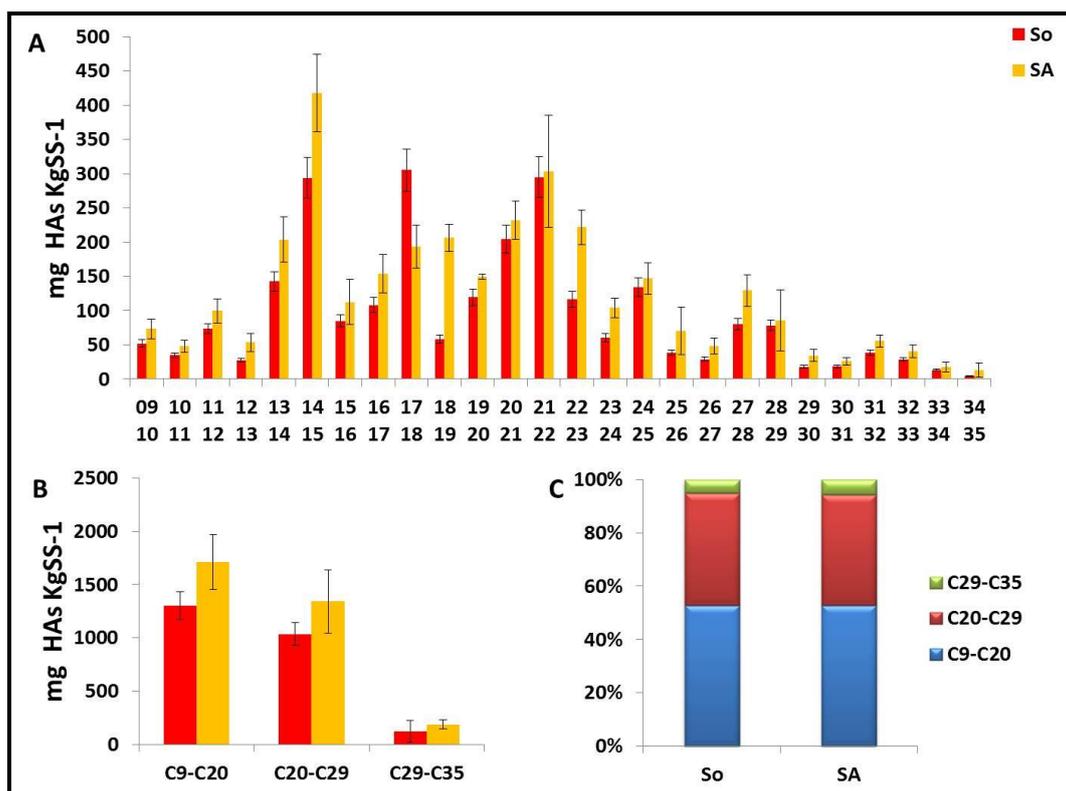


Figura IV.1. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) de los sistemas suelo original (S_0) y suelo acondicionado (SA) luego de 12 meses de tratamiento. A. Detalle de cada fracción de HAs, expresado como mg de compuesto $\text{kg}_{\text{SS}}^{-1}$. B. Contenido de HAs según el número de átomos de carbono. C. Composición relativa [%]. Los valores numéricos se presentan en la Tabla IV.2.

La Tabla IV.3 y la Figura IV.2 presentan el contenido de PAHs en los microcosmos S_0 y SA. Si bien no se observó eliminación significativa con respecto al suelo original, hubo una eliminación significativa de fluoreno (86.6 %).

Tabla IV.3. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (PAHs) de los sistemas suelo original (S_0) y suelo acondicionado (SA) luego de 12 meses de tratamiento.

Microcosmos	PAHs [$\text{mg Kg}_{\text{SS}}^{-1}$]	3 anillos [%]	4 anillos [%]	5 anillos [%]	6 anillos [%]
S_0	214 (a)	35.6	47.8	6.2	10.4
SA	279 (a)	31.7	48.4	7.3	12.6

No se encontraron diferencias en el contenido de PAHs biodisponibles luego de 12 meses de tratamiento en SA con respecto a S_0 .

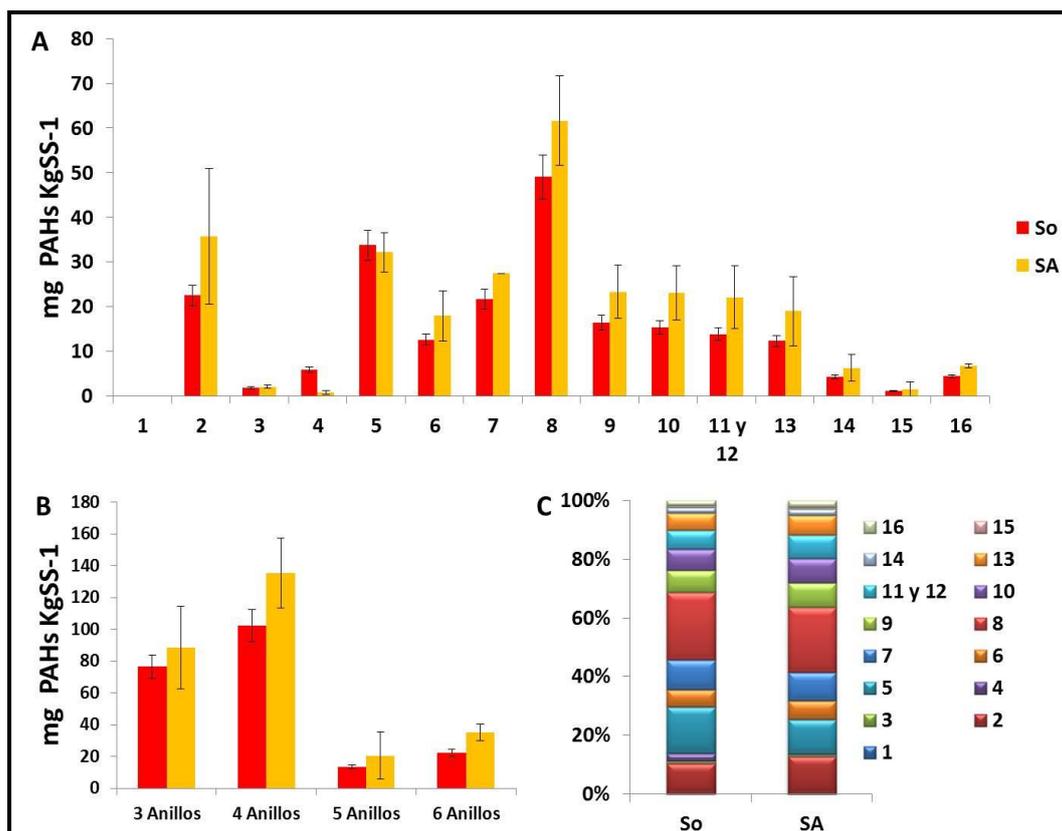


Figura IV.2. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs) de los sistemas suelo original (S_0) y suelo acondicionado (SA) luego de 12 meses de tratamiento. A. Detalle de cada fracción de PAHs, expresado como mg de compuesto kg_{SS}^{-1} . B. Contenido de PAHs según el número de átomos de carbono. C. Composición relativa [%]. Los valores numéricos se presentan en la Tabla IV.3.

Mediante el análisis de los extractos alcalinos de suelo de los microcosmos SA luego de 12 meses de tratamiento, se observó un descenso significativo del Carbono Total Disuelto (CTD), cuya medida fue de $46.5 \pm 0.8 \text{ mg C L}^{-1}$.

La Figura IV.3 presenta el estudio espectroscópico de los extractos alcalinos al finalizar el tratamiento. El espectro de este extracto, con la absorción ajustada en 0.01 a 550 nm, mostró un cambio que puede asignarse al menor contenido de CTD. La relación E_4/E_6 de este extracto fue de 3.25. En la matriz de emisión de fluorescencia, al igual que en S_0 , se encontraron dos regiones (Región 1 y Región 2) de emisión de fluorescencia, una región centrada en $\lambda_{exc} 330 - \lambda_{em} 420 \text{ nm}$ correspondiente a las sustancias húmicas y la otra centrada en $\lambda_{exc} 375 - \lambda_{em} 330 \text{ nm}$ correspondiente a la emisión de los PAHs.

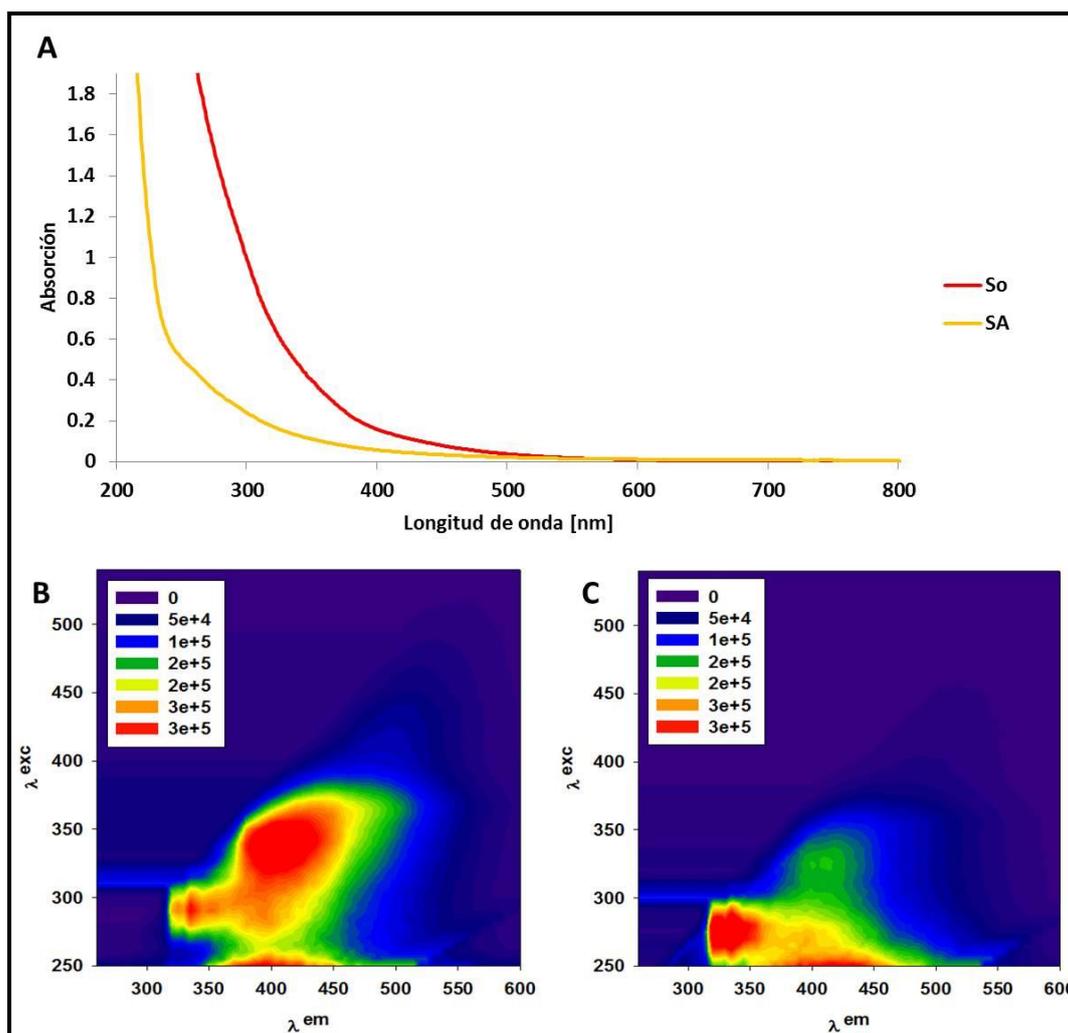


Figura IV.3. Análisis de los extractos alcalinos. A. Espectros de absorción de S_0 y SA. **B.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de S_0 . **C.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de SA.

Análisis de las poblaciones microbianas cultivables

Las Figuras IV.4 y IV.5 describen la dinámica de las poblaciones cultivables durante el tratamiento. Para los microcosmos SA la densidad de BH durante el primer mes osciló sin grandes cambios en torno al valor del S_0 . Luego de este período, la densidad decreció significativamente. En el caso de la población de hongos, se observó un descenso significativo durante los primeros dos meses y luego esta población se estabilizó. Para completar el análisis de las poblaciones cultivables, podemos decir que la comunidad de bacterias solubilizadoras de P inicialmente mostró un incremento significativo respecto a S_0 sin mostrar grandes modificaciones durante el tratamiento.

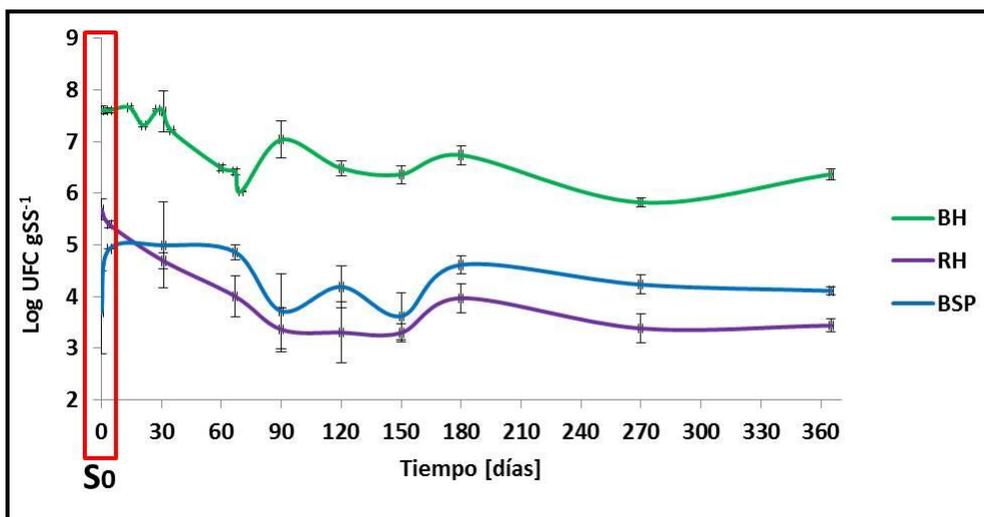


Figura IV.4. Dinámica de las poblaciones de bacterias heterótrofas (BH), hongos (RH) y bacterias que solubilizan fósforo (BSP) durante el tratamiento en el microcosmos SA.

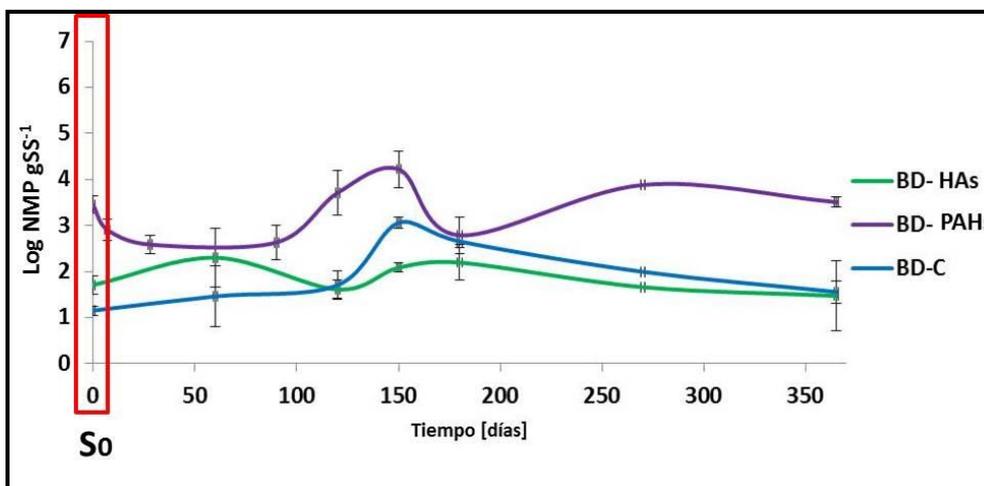


Figura IV.5. Dinámica de las poblaciones de bacterias degradadoras de HAs (BD-HAs), degradadoras de PAHs (BD-PAHs) y degradadoras de celulosa (BD-C) durante el tratamiento en el microcosmos SA.

No se observaron variaciones significativas a lo largo del tratamiento en la densidad de la población BD-HAs con respecto al valor determinado en S_0 . La población de BD-PAHs varió en un rango entre 10^3 – 10^4 UFC g_{SS}^{-1} a lo largo del tratamiento, mostrando un valor máximo luego de 150 días de tratamiento. La población de BD-C varió entre 10^2 – 10^3 NMP g_{SS}^{-1} durante el tratamiento, alcanzando un valor máximo a los 150 días de tratamiento.

Caracterización de la funcionalidad del suelo

La Tabla IV.4 describe los resultados encontrados para las distintas actividades enzimáticas analizadas al finalizar el tratamiento. No se detectó actividad deshidrogenasa ni proteasa a lo largo de todo el tratamiento.

No se encontraron diferencias significativas en las actividades lipasa y ureasa, con respecto a S_0 . Se observó un descenso significativo en los valores de arilsulfatasa y fosfatasa ácida, y se observó un incremento significativo en la actividad fosfatasa alcalina.

Tabla IV.4. Actividades enzimáticas determinadas en el microcosmos suelo acondicionado (SA) luego de 12 meses de tratamiento. Comparación con los valores determinados en el suelo original (S_0). Las medidas se realizaron por triplicado.

Actividad	S_0	SA
Deshidrogenasa [$\mu\text{g TPF g}_{\text{SS}}^{-1}$]	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>
Lipasa [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	189 ± 4 (a)	174 ± 3 (a)
Arilsulfatasa [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	33 ± 1	<i>No detectado</i>
Fosfatasa alcalina [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	175 ± 24 (b)	303 ± 15 (a)
Fosfatasa ácida [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	103 ± 20 (a)	42 ± 29 (b)
Ureasa [$\mu\text{gN-NH}_4\text{g}_{\text{SS}}^{-1}$]	23 ± 6 (a)	17 ± 2 (a)
Proteasa [$\text{mg Tyr g}_{\text{SS}}^{-1}$]	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>

Ensayos de fitotoxicidad

La Figura IV.6 muestra el efecto de extractos acuosos del microcosmos SA sobre el índice de inhibición de la germinación (IG %) y el índice de inhibición en la elongación radicular (IE %). No se evidenció efecto fitotóxico significativo en el IG % en ninguna dilución del extracto de suelo del microcosmos SA con respecto al control (agua), a diferencia de lo observado en S_0 . Tampoco se observaron efectos sobre el IE % estadísticamente significativos.

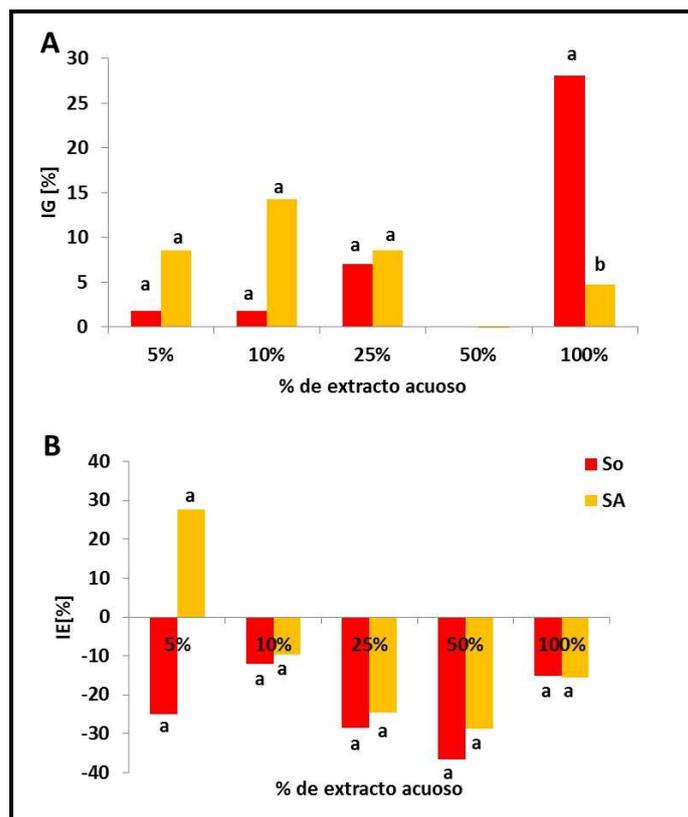


Figura IV.6. Ensayos de fitotoxicidad de los extractos acuosos de S₀ y SA. A. Índice de Inhibición de Germinación (IG %) **B.** Índice Inhibición en la Elongación (IE %). Los ensayos se realizaron utilizando extractos acuosos del suelo original (S₀) y de microcosmos SA, luego de 12 meses de tratamiento.

La Figura IV.7 muestra el aspecto de las plántulas desarrolladas en presencia de agua (control), extracto acuoso de S₀ y extracto acuoso de SA. Se observó una tendencia a generar radículas de mayor longitud, enredadas y menor diámetro (carentes de raíces secundarias) a partir del extracto de SA, similares a lo observado con los extractos provenientes de S₀. También se observó que las plántulas desarrollaron hipocótilos de mayor longitud que el control (agua).

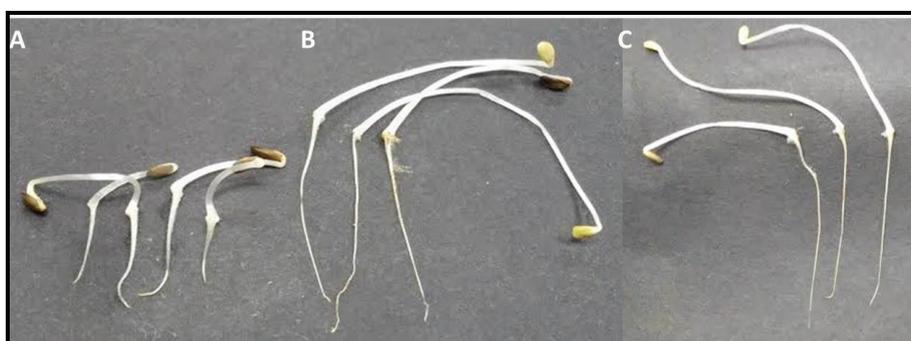


Figura IV.7. Morfología de las plántulas de *Lactuca sativa* L. A. Plántulas generadas por tratamiento con agua destilada. **B.** Plántulas generadas por tratamiento con el extracto sin diluir de S₀. **C.** Plántulas generadas por tratamiento con el extracto sin diluir de SA luego de 12 meses de tratamiento.

Discusión

La estrategia de acondicionamiento mediante riego (humedad 20-25 %) y termostatación (25°C) del suelo crónicamente contaminado, mantenida durante un año, no produjo cambios significativos en el contenido de CO ni de N. El descenso del pH, CTD, Eh y P son indicadores del metabolismo microbiano durante el tratamiento (Breedveld y Sparrevik 2000; Morán Vieyra y col., 2009). A pesar del descenso observado del potencial redox, el valor obtenido fue característico de ambientes óxicos.

Al finalizar el tratamiento no se observó eliminación significativa de HAs totales ni de PAHs. Asimismo, la estrategia aplicada no produjo cambios en la biodisponibilidad de los PAHs.

Resultados similares fueron presentados por otros autores (Antizar- Ladislao y col., 2006b; Antizar- Ladislao y col., 2008; Mao y col., 2012). Antizar-Ladislao y col., 2006b y 2008, aplicando una estrategia similar (riego y 38°C en el microcosmos control) en un suelo crónicamente contaminado con unas 100 ppm PAHs, observaron una baja eliminación de PAHs (9.5 %). Mao y col., 2012 en su tratamiento control (riego y 28°C) de un suelo crónicamente contaminado con unas 10.000 ppm de PAHs obtuvo resultados similares (eliminación del 7.1 %). Si bien los autores, utilizaron temperaturas consideradas como óptimas para cada tratamiento, la baja eficiencia de eliminación observada, aún en condiciones de contaminación tan diferentes (100 veces), puede ser atribuida al envejecimiento de la contaminación, y se explicaría por el fenómeno de *secuestro* (debido a la inmovilización en microporos o a cambios en las formas de unión con la MOS, etc.) lo que reduce la biodisponibilidad de los PAHs.

La determinación de la biodisponibilidad depende de la metodología utilizada. Sin embargo, los valores obtenidos en esta tesis con XAD-2 coinciden con lo informado por otros autores utilizando la resina Tenax (Ouvrard y col., 2011; Cébron y col., 2013). Estos autores concluyen que la baja disponibilidad del contaminante se debe a la complejidad de los mismos y al proceso de envejecimiento de la contaminación. El envejecimiento es más marcado en suelos ricos en MOS. Un alto contenido de MOS favorece la difusión y secuestro del contaminante en los nanoporos, haciéndolo

inaccesible para los microorganismos y enzimas extracelulares (Semple y col., 2004). Por lo tanto, la naturaleza y la abundancia de la MOS influyen fuertemente a la disponibilidad de los PAHs. Si bien algunos autores han correlacionado la eliminación de este tipo de contaminantes con el CTD (Chung y Alexander 1998; Chung y Alexander 1999), no es el único componente de la MOS que afecta los procesos de secuestro y de desorción.

El análisis espectroscópico del suelo tratado evidenció una relación E_4/E_6 significativamente menor ($p < 0.05$) que la encontrada en el S_0 , sugiriendo que las sustancias húmicas de estos extractos poseen mayor grado de condensación y menor número de grupos carboxílicos (Lguirati y col., 2005). De estos resultados se infiere que el tratamiento SA estimuló la actividad microbiana a expensas del consumo de sustancias fácilmente asimilables, evidenciado en el descenso del CTD, resultando el enriquecimiento en la fracción húmica, más recalcitrante.

Por otro lado, en la MEEF se encontraron las dos regiones de emisión de fluorescencia (1 y 2). Sin embargo la Región 1 (correspondiente a sustancias húmicas propias del suelo) mostró menor intensidad con respecto a la encontrada en S_0 , lo que atribuirse a la menor concentración de CTD.

Estos cambios se correspondieron con pequeñas variaciones observadas en la concentración de las poblaciones cultivables durante el tratamiento. Particularmente, las poblaciones de BH y hongos evidenciaron un paulatino descenso, atribuido al consumo de la materia orgánica disponible. El incremento en la población degradadora de celulosa apreciado entre los 5 y 6 meses de tratamiento, podría estar asociado a un cambio metabólico de las poblaciones hacia el consumo de fuentes de carbono más complejas, como se evidencia en el cambio detectado en la MEEF. Así mismo, el incremento de la población solubilizadora de P mostró evidencias de la actividad de poblaciones movilizadoras de P, pudiendo asociar este comportamiento al incremento en la actividad fosfatasa alcalina y a la disminución de P observado al final del tratamiento. Los menores cambios evidenciados en las poblaciones cultivables, no se vieron reflejados en la actividad deshidrogenasa, que permaneció por debajo del límite de detección.

Las variaciones en las poblaciones de BH y hongos fueron son similares a los encontrados en otros trabajos con suelos crónicamente contaminados sometidos a tratamientos de riego y termostatación (Del Panno y col., 2005; Teng y col., 2010; Gandolfi y col., 2010).

Respecto de la calidad del suelo al finalizar el tratamiento SA, la actividad microbiana fue sólo evidenciada a través de los cambios en la actividad arilsulfatasa y fosfatasas, no detectándose mayor actividad de proteasa, lipasa ni ureasa, con respecto a S_0 . Estos resultados indican que en los microcosmos SA el flujo de energía es limitado, por lo que se puede concluir que la estrategia de acondicionamiento no logró recuperar la funcionalidad de la comunidad.

La disminución encontrada en el índice de inhibición de la germinación (IG %) con respecto a los valores hallados en S_0 podrían atribuirse a la actividad de la comunidad microbiana autóctona estimulada durante el tratamiento, capaz de degradar intermediarios tóxicos. Sin embargo, dicha actividad degradadora no pudo reducir los efectos tóxicos sobre la elongación de radículas, obteniéndose raíces de igual morfología que con extractos del S_0 .

Morelli y col., 2005 en su trabajo utilizando un residuo con contaminación aguda describieron el incremento de la toxicidad luego de 6 meses de tratamiento y un posterior descenso hasta los valores iniciales. Este comportamiento se atribuyó a la formación y posterior degradación de intermediarios metabólicos más recalcitrantes y genotóxicos. Teniendo en cuenta que el S_0 presenta una contaminación crónica, puede ser que su fitotoxicidad sea consecuencia de la acumulación de este tipo de intermediarios y que el tratamiento SA produce la eliminación de los intermediarios metabólicos tóxicos. Este razonamiento explicaría también el incremento observado en la población de BD-PAHs a pesar de no observarse cambios en el contenido de PAHs.

Compostaje del suelo crónicamente contaminado

Optimización del tratamiento de compostaje

Como se detalló en Materiales y métodos, en la primera serie de experimentos de compostaje se probaron distintas proporciones de suelo:estiércol, con el objetivo de encontrar la proporción óptima (C:N:P) para llevar a cabo el tratamiento. Como control (SA) se incluyó un microcosmos de suelo contaminado que fue regado (20-25 % de humedad) y volteado durante el tratamiento.

En la Figura IV.8 se puede observar que en todas las proporciones ensayadas (S1, S2 y S3) se obtuvo un registro de temperatura ligeramente mayor que en el microcosmos control (SA).

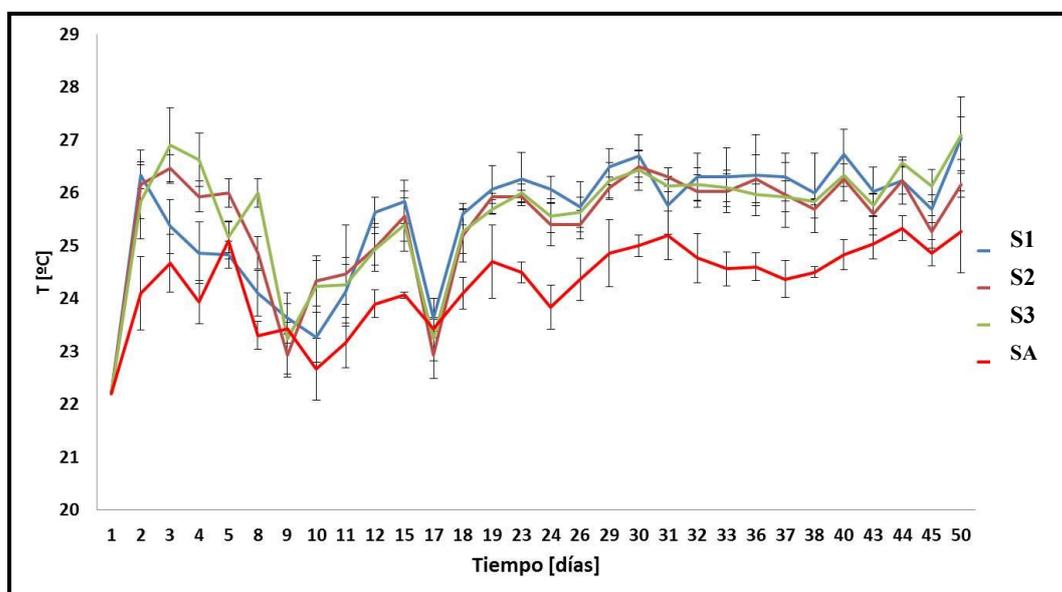


Figura IV.8. Perfil de temperatura obtenido para los microcosmos S1, S2, S3 y del control (SA) durante los 45 días de tratamiento.

Los microcosmos se monitorearon a lo largo del tratamiento mediante la medida de la actividad deshidrogenasa, como se muestra en la Figura IV.9. Todos los microcosmos mostraron elevada actividad deshidrogenasa durante el tratamiento, con un máximo al día 4, aunque sin diferencias significativas entre las distintas proporciones ensayadas.

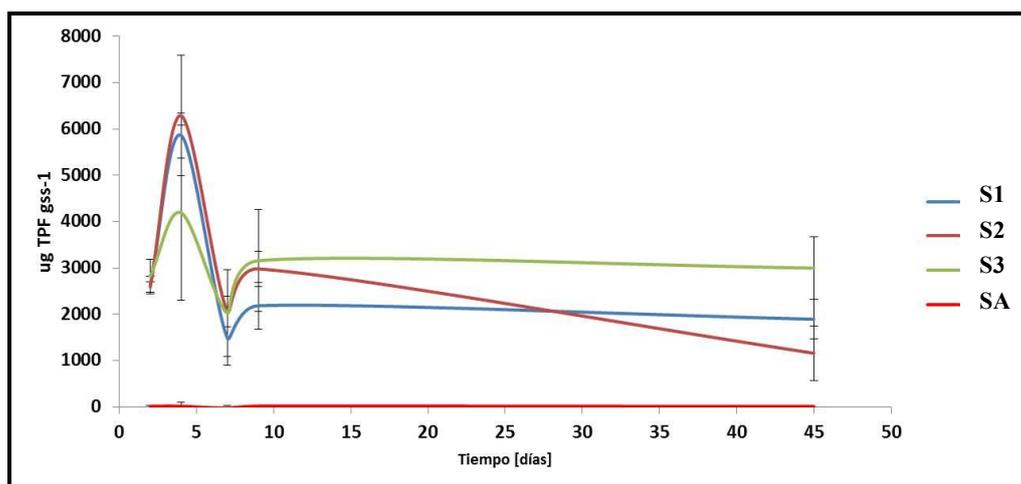


Figura IV.9. Dinámica de la actividad deshidrogenasa durante el tratamiento en los microcosmos S1, S2, S3 y control (SA).

La Tabla IV.5 presenta los valores de densidad de población de BD-PAHs y actividad lipasa y ureasa determinados a los 7 y 45 días de tratamiento. Todas las proporciones mostraron un incremento significativo de la población de BD-PAHs con respecto a SA, tanto al día 7 como al día 45. La actividad lipasa fue significativamente mayor en todos los sistemas compostados respecto a SA al día 7. Al día 45, únicamente S3 conservó una significativamente aumentada actividad lipasa, atribuible a la mayor proporción de estiércol en este sistema. No se detectó actividad ureasa en ninguno de los microcosmos.

Tabla IV.5. Densidad de población de Bacterias Degradadoras de PAHs expresada como Log NMP BD-PAHs g_{SS}^{-1} y actividad lipasa ($ng\ pNP\ g_{SS}^{-1}$) de los microcosmos compostados (S1, S2 y S3) y del control (SA). Las determinaciones se realizaron a los días 7 y 45 de iniciado el tratamiento.

Microcosmos	[Log NMP BD-PAHs g_{SS}^{-1}]		Act. Lipasa [$ng\ pNP\ g_{SS}^{-1}$]	
	(día 7)	(día 45)	(día 7)	(día 45)
S1	6.8 ± 0.1 (a)	6.6 ± 0.5 (a)	6100 ± 2800 (a)	<i>No detectado</i>
S2	6.2 ± 0.2 (a)	5.7 ± 0.4 (a)	5600 ± 1300 (a)	<i>No detectado</i>
S3	6.3 ± 0.3 (a)	6.0 ± 0.2 (a)	7000 ± 2500 (a)	7800 ± 2100 (a)
SA	2.9 ± 0.2 (b)	2.2 ± 0.1 (b)	475 ± 50 (b)	212 ± 57 (b)

Las tres proporciones ensayadas mostraron resultados similares. La única excepción fue la actividad lipasa luego de los 45 días para S3. Considerando estos resultados, se decidió utilizar la proporción $0.7\ g_{SS} : 0.3\ estiercol\ seco$ para los tratamientos siguientes, tanto de compostaje como de estimulación con enmienda orgánica (compost maduro).

Compostaje del suelo crónicamente contaminado

Estudios químicos y físicos

Este tratamiento se realizó en recipientes de 34 L. La Figura IV.10 describe el registro la temperatura durante los primeros 4 meses de tratamiento. Como control (SA) se incluyeron microcosmos del suelo original que fueron regados y aireados durante el tratamiento. En este período la temperatura del suelo compostado (SC) fue superior a la del control (SA). Cuando se observó coincidencia entre la temperatura de los dos microcosmos, se suspendió el registro de esta medida.

Al igual que en el ensayo anterior, no fue posible detectar la fase termófila del tratamiento.

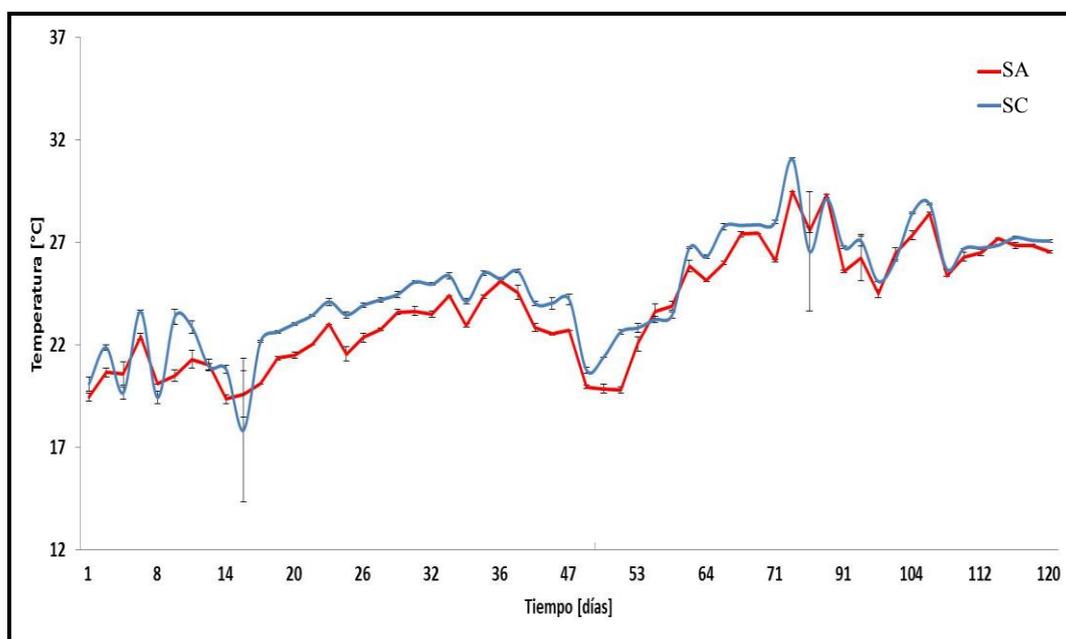


Figura IV.10. Perfil de temperatura obtenido para los microcosmos compostados (SC) y acondicionados (SA) durante los primeros 4 meses de tratamiento.

Durante el tratamiento se observó un descenso en los valores de pH, con respecto al valor de S_0 , como se detalla en la Tabla IV.6. También se observaron incrementos significativos de la conductividad, del contenido de CO, N y P disponible.

Tabla IV.6. Análisis químico del suelo original (S₀) y del microcosmos de suelo compostado (SC) luego de 12 meses de tratamiento. Medida de pH, Conductividad Eléctrica (CE, [$\mu\text{S cm}^{-1}$]), Potencial redox (Eh, [mV]), Carbono Orgánico (CO %), Nitrógeno total (N %) y Fósforo disponible (P, [mg Kg^{-1}]).

Propiedades	S ₀	SC
pH	8.8 ± 0.1	7.2 ± 0.1
CE [$\mu\text{S cm}^{-1}$]	634 ± 12	6995 ± 1124
Eh [mV]	236 ± 2	234 ± 3
CO [%]	2.2 ± 0.9	10.7 ± 0.5
N [%]	0.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1
C:N	11	12
P [mg Kg^{-1}]	8.3 ± 0.6	153.0 ± 0.1
C:N:P	0.3: 0.03:1	0.07:0.006:1

La Figura IV.11 evidencia el cambio macroscópico del material del microcosmos a los 4 meses de iniciado el tratamiento de compostaje, producto de la biodegradación del agente de volumen.

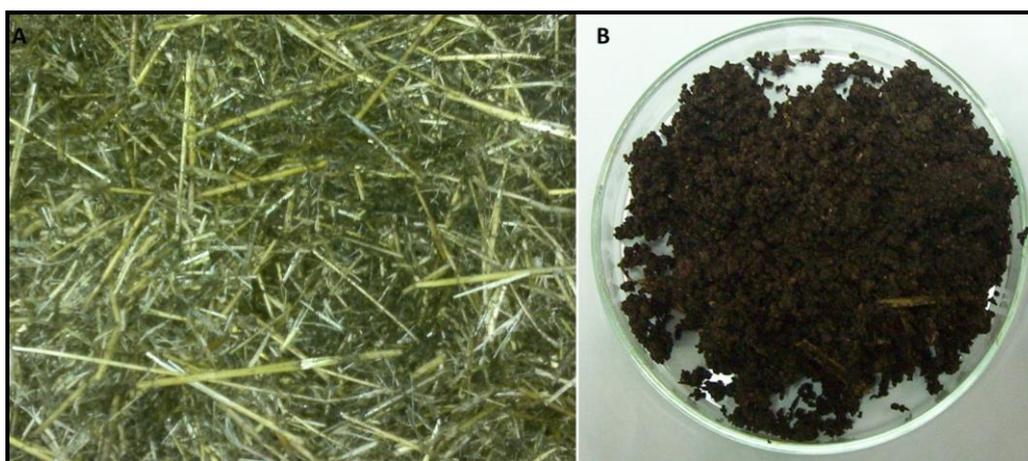


Figura IV.11. Aspecto macroscópico del microcosmos SC. A. Momento de inicio del tratamiento. **B.** Luego de 4 meses de tratamiento.

Las Tabla IV.7 y la Figura IV.12 muestran la concentración de HAs, determinada en los microcosmos luego de 4 y 12 meses de iniciado el tratamiento. Como se detalla, el contenido de HAs se incrementó un 200 % luego de 4 meses, siendo la fracción de compuestos de C₂₉ – C₃₅ la que mostró el mayor incremento porcentual con respecto a S₀. Luego de 12 meses, se observó eliminación significativa del 35 % en el contenido de HAs con respecto de S₀, y se encontró que el material estaba enriquecido en la fracción de C₂₉ – C₃₅.

Tabla IV.7. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) de los sistemas suelo original (S₀) y de los microcosmos de suelo compostado (SC) a los 4 y 12 meses de tratamiento. Se incluyeron los valores correspondientes al compost, tomado como referencia, con fines comparativos.

Microcosmos	HAs [mg Kg _{SS} ⁻¹]	C9 – C20 [%]	C20 – C29 [%]	C29 – C35 [%]
S ₀	2456 (b)	52.9	42.1	5.0
SC 4 m	7290 (a)	41.6	37.2	21.2
SC 12 m	1602 (c)	39.6	35.8	24.6
Compost	2401 (b)	40.9	35.1	24.0

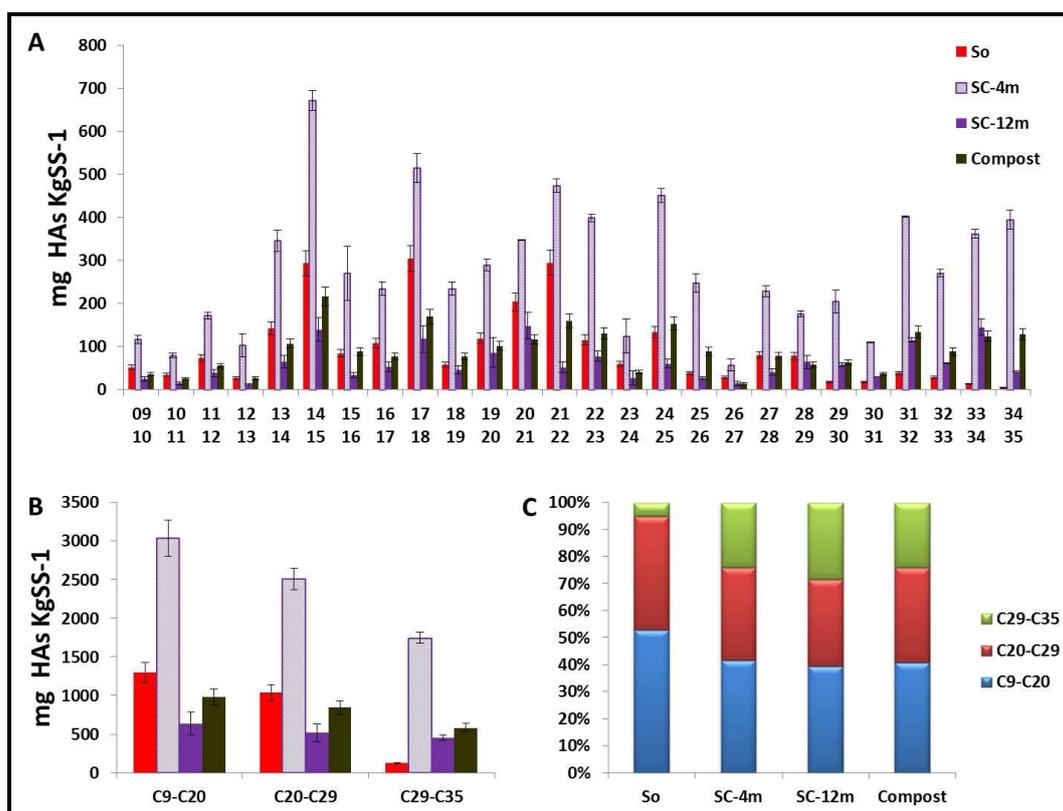


Figura IV.12 Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) de los microcosmos de suelo original (S₀), suelo compostado (SC), 4 y 12 meses y microcosmos de compost (sin suelo), tomado como referencia. A. Detalle de cada fracción de HAs, expresado como mg de compuesto kg_{SS}⁻¹. B. Contenido de HAs según el número de átomos de carbono. C. Composición relativa [%]. Los valores numéricos se presentan en la Tabla IV.7.

Paralelamente fue preparado un microcosmos de compostaje tradicional (agente de volumen y estiércol) como referencia, a partir de cual se realizó el análisis de hidrocarburos, determinándose un contenido de 2400 mg de HAs totales Kg_{SS}⁻¹ en el material. Como se detalla en la Tabla IV.7, este compost posee un 41 % de hidrocarburos livianos, un 35 % de intermedios y un 24 % de los que denominamos pesados. Por otro lado, no se detectaron PAHs en el compost.

La Tabla IV.8 y la Figura IV.13 presentan los resultados correspondientes al contenido de PAHs en estos microcosmos, luego de 4 y 12 meses de tratamiento.

Tabla IV.8. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (PAHs) de los microcosmos de suelo original (S_0) y de los microcosmos de suelo compostado (SC) a los 4 y 12 meses de tratamiento.

Microcosmos	PAHs [mg Kg _{ss} ⁻¹]	3 anillos [%]	4 anillos [%]	5 anillos [%]	6 anillos [%]
S_0	214 (a)	35.6	47.8	6.2	10.4
SC 4 m	220 (a)	30.8	48.5	6.9	13.8
SC 12 m	270 (a)	24.5	49.9	6.3	19.3

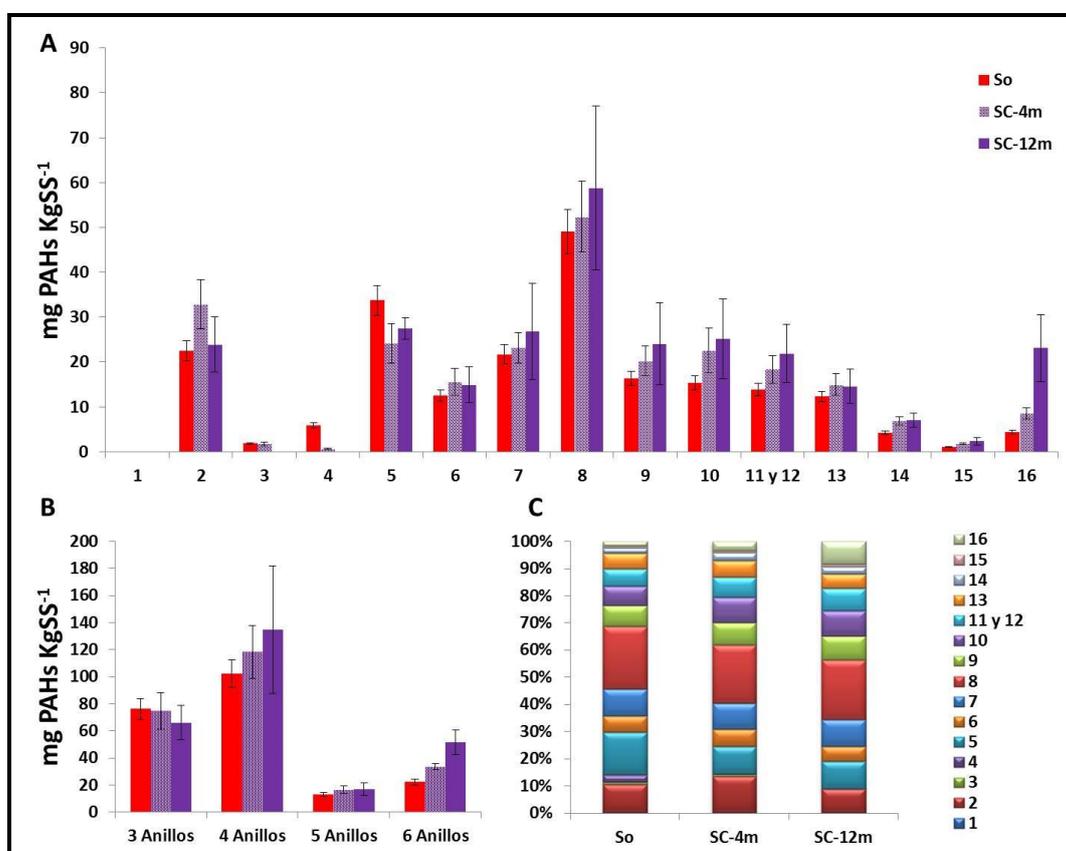


Figura IV.13 .Contenido de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs) de los microcosmos de suelo original (S_0), microcosmos de suelo compostado SC (4 y 12 meses) de tratamiento. A. Detalle de cada fracción de PAHs, expresado como mg de compuesto kg_{ss}⁻¹. B. Contenido de PAHs según el número de átomos de carbono. C. Composición relativa [%]. Los valores numéricos se presentan en la Tabla IV.8.

Si bien no hay eliminación significativa con respecto a S_0 en el contenido total de PAHs de los microcosmos SC (tanto a los 4 como a los 12 meses), se observaron cambios en la proporción relativa de estos compuestos a lo largo del tratamiento. Luego de 4 meses hubo una eliminación del 89 % de fluoreno y 28 % de fenantreno. La

eliminación de fluoreno se incrementó al 100 % transcurrido el tiempo de tratamiento. En el caso del acenafteno, no se encontraron cambios luego de 4 meses, pero se observó eliminación del 100 % luego de 12 meses de tratamiento. Se detectó un incremento en algunos compuestos de alto peso molecular: dibenzo [*a*, *h*] antraceno y benzo [*g*, *h*, *i*] perileno.

El microcosmos SC evidenció un incremento en la biodisponibilidad de los PAHs respecto de S_0 , determinado mediante la resina XAD-2. El valor medido a los 12 meses fue 5.7 % y correspondió al incremento en la disponibilidad del benzo [*a*] pireno.

El valor de CTD, $97 \pm 1 \text{ mg C L}^{-1}$, determinado a partir del microcosmos SC luego de 12 meses, no fue significativamente diferente del determinado en S_0 .

La Figura IV.14 presenta los resultados espectroscópicos de los extractos alcalinos del microcosmos SC a los 12 meses (dilución 1:10) y del compost de referencia (dilución 1:20) en comparación con el obtenido de S_0 . Puede apreciarse que el extracto alcalino obtenido de muestras del microcosmos SC fue diferente del obtenido a partir del S_0 determinando una relación $E_4/E_6 = 32$, mayor que la determinada para S_0 . La MEEF en este caso tuvo solo una región de emisión, centrada en $\lambda_{exc} 320 - \lambda_{em} 420 \text{ nm}$, correspondiente a la Región 1.

El análisis de los extractos alcalinos provenientes del compost tradicional utilizado como control, evidenció un valor de CTD de $363 \pm 3 \text{ mg C L}^{-1}$ y una relación E_4/E_6 de 4.6 según el espectro de absorción. La MEEF correspondiente presentó una única zona de mayor emisión, cuyo máximo se posicionó en la Región 1.

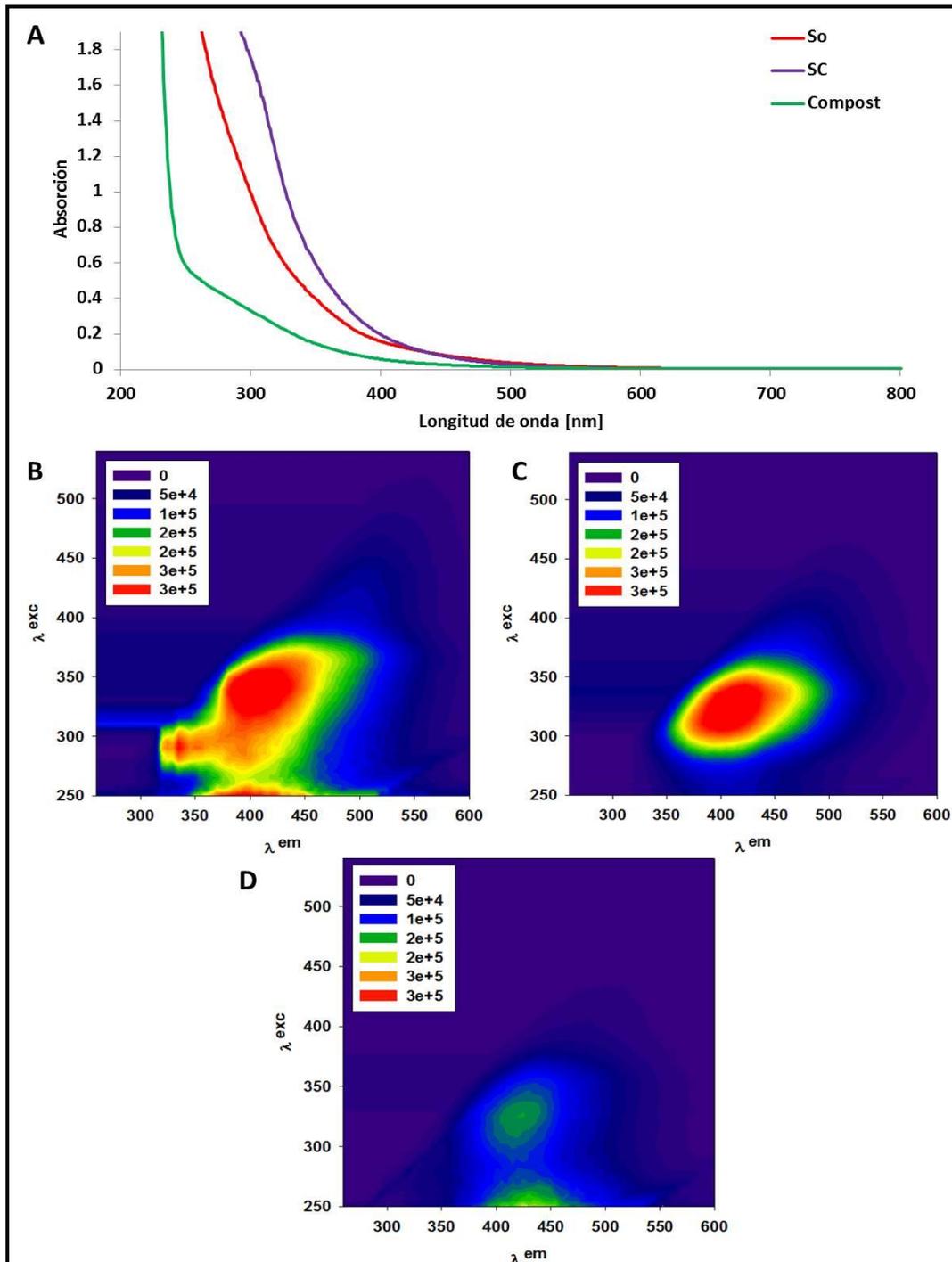


Figura IV.14. Análisis de los extractos alcalinos. A. Espectros de absorción de S_0 , SC y Compost. **B.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de S_0 . **C.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de SC a los 12 meses. **D.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia del compost.

Análisis de las poblaciones microbianas cultivables

La caracterización microbiológica de los materiales utilizados para el compostaje del suelo se describe en el *Anexo I*. El estiércol de cabra y el rastrojo de avena poseen una carga de bacterias heterótrofas y de hongos superior a la presente en S_0 . En el estiércol de cabra fueron detectadas poblaciones bacterianas que solubilizan fósforo, degradadoras de HAs, degradadoras de PAHs y degradadoras de celulosa. El agente de volumen (rastrojo de avena) presentó una comunidad potencialmente degradadora de HAs y celulosa.

La Figura IV.15 muestra la dinámica de las poblaciones de bacterias heterótrofas BH, hongos y BSP en los microcosmos SC. Se puede apreciar que la densidad de BH se mantuvo estable durante el tratamiento y la población fúngica mostró un pequeño descenso, con respecto al valor observado en S_0 . En el caso de la población de BSP se observó un incremento durante los 3 primeros meses. En el periodo comprendido entre los meses 9 y 11 se observó un nuevo incremento en los valores de esta población. Este incremento fue seguido de un descenso significativo, medido a los 12 meses.

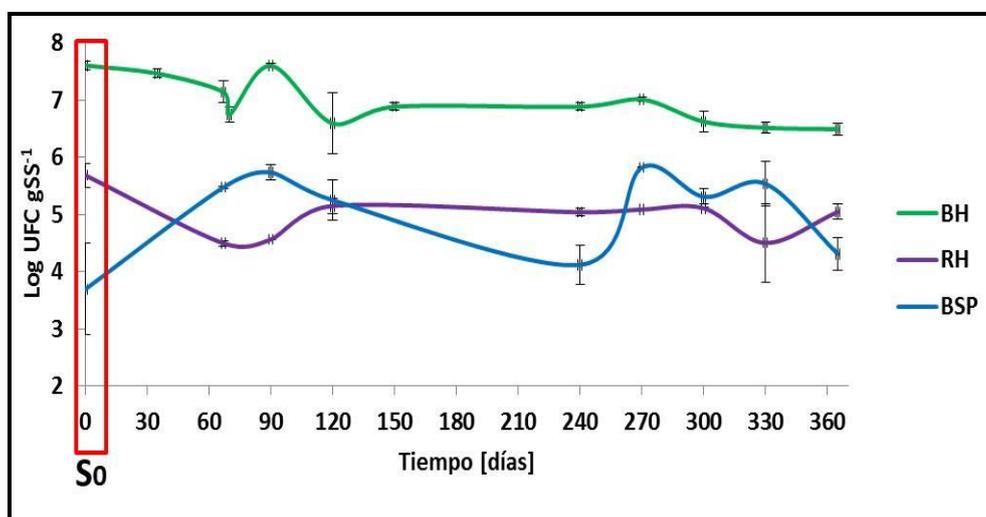


Figura IV.15. Dinámica de las poblaciones de bacterias heterótrofas (BH), hongos (RH) y bacterias que solubilizan fósforo (BSP) durante el tratamiento en el microcosmos SC.

La Figura IV.16 muestra la dinámica de la concentración de poblaciones bacterianas degradadoras de HAs (BD-HAs), degradadoras de PAHs (BD-PAHs) y degradadoras de celulosa (BD-C) durante el tratamiento en el microcosmos SC.

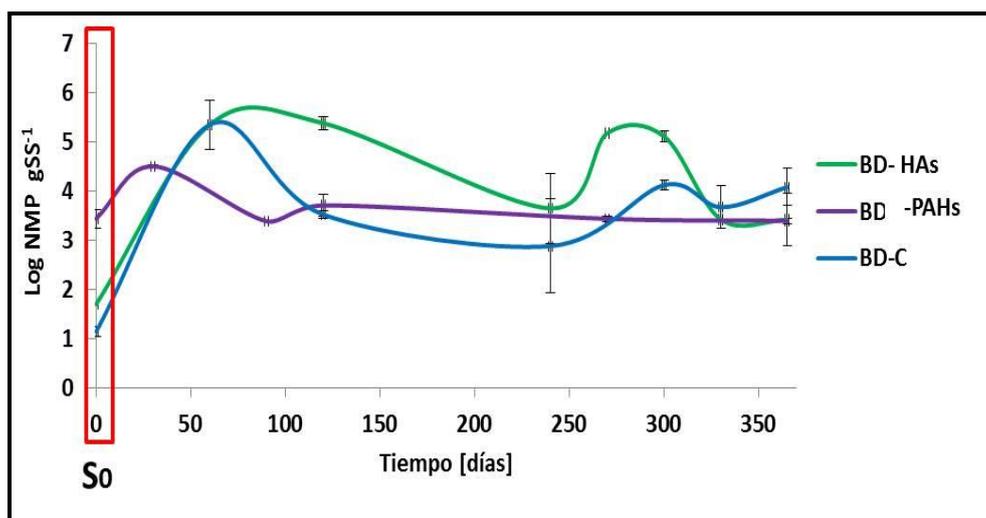


Figura IV.16. Dinámica de las poblaciones de bacterias degradadoras de HAs (BD-HAs), degradadoras de PAHs (BD-PAHs) y degradadoras de celulosa (BD-C) durante el tratamiento en el microcosmos SC.

Los valores de BD-HAs aumentaron, mostrando un máximo a los 4 meses de iniciado el tratamiento y luego disminuyeron. Un nuevo máximo en la densidad se registró entre los meses 9 y 10. En la última etapa del tratamiento, comprendida entre los meses 11 y 12, se observó un descenso significativo con respecto al valor del período previo. Cabe destacar, el valor al final del tratamiento fue significativamente superior al determinado en S_0 . Un comportamiento similar se observó para los valores de BD-C. Durante todo el tratamiento fueron significativamente superiores a los valores determinados para S_0 . Se observó un valor máximo a los 4 meses de iniciado el tratamiento; transcurridos 10 meses se detectó un nuevo aumento. El NMP de BD-PAHs mostró un máximo luego de 1 mes que luego disminuyó hasta valores similares al de S_0 .

Caracterización de la funcionalidad del suelo

La Figura IV.17 muestra la dinámica de la actividad deshidrogenasa, determinada durante todo el tratamiento. Se observó un incremento significativo de la actividad enzimática con un máximo al día 4. A partir del octavo mes la medida se estabilizó con un valor promedio de $50 \pm 16 \mu\text{g TPF g}_{\text{SS}}^{-1}$. Es de destacar que a tiempos cortos, los desvíos estándar fueron elevados debido a la heterogeneidad del material, que dificultó el muestreo.

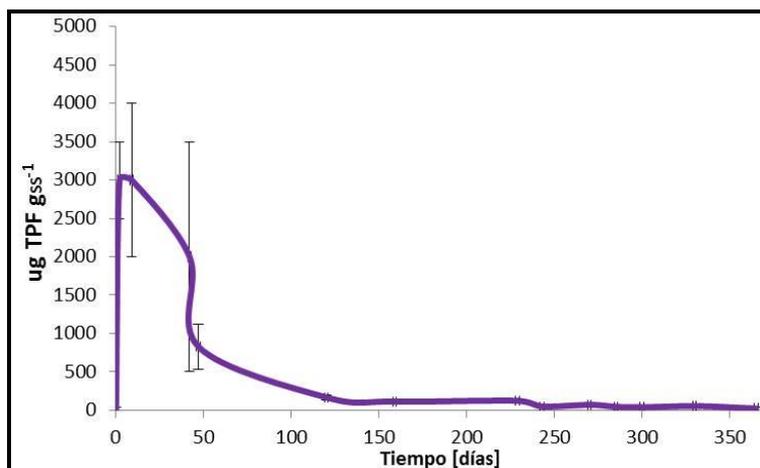


Figura IV.17. Actividad deshidrogenasa de los microcosmos SC durante el tratamiento de compostaje del suelo contaminado. S₀: no detectado.

La Tabla IV.9 presenta los resultados del análisis enzimático al finalizar el tratamiento. Se observó un incremento significativo respecto de S₀ en todas las actividades enzimáticas evaluadas.

Tabla IV.9. Actividades enzimáticas determinadas en el microcosmos suelo compostado luego de 12 meses de tratamiento (SC). Comparación con los valores determinados en el suelo original (S₀). Las medidas se realizaron por triplicado. Las medidas se realizaron por triplicado.

Actividad	S ₀	SC
Deshidrogenasa [$\mu\text{g TPF g}_{\text{SS}}^{-1}$]	<i>No detectado</i>	24 ± 13
Lipasa [$\text{ng pNP g}_{\text{SS}}^{-1}$]	189 ± 4 (b)	260 ± 36 (a)
Arilsulfatasa [$\text{ng pNP g}_{\text{SS}}^{-1}$]	33 ± 1 (b)	47 ± 2 (a)
Fosfatasa alcalina [$\text{ng pNP g}_{\text{SS}}^{-1}$]	175 ± 24 (b)	819 ± 100 (a)
Fosfatasa ácida [$\text{ng pNP g}_{\text{SS}}^{-1}$]	103 ± 20 (b)	1448 ± 412 (a)
Ureasa [$\mu\text{gN-NH}_4\text{g}_{\text{SS}}^{-1}$]	23 ± 6 (b)	64 ± 6 (a)
Proteasa [$\text{mg Tyr g}_{\text{SS}}^{-1}$]	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>

Ensayos de fitotoxicidad

La Figura IV.18 muestra la dinámica del índice de inhibición de la germinación (IG %) obtenidos a partir de los extractos acuosos de los microcosmos SC.

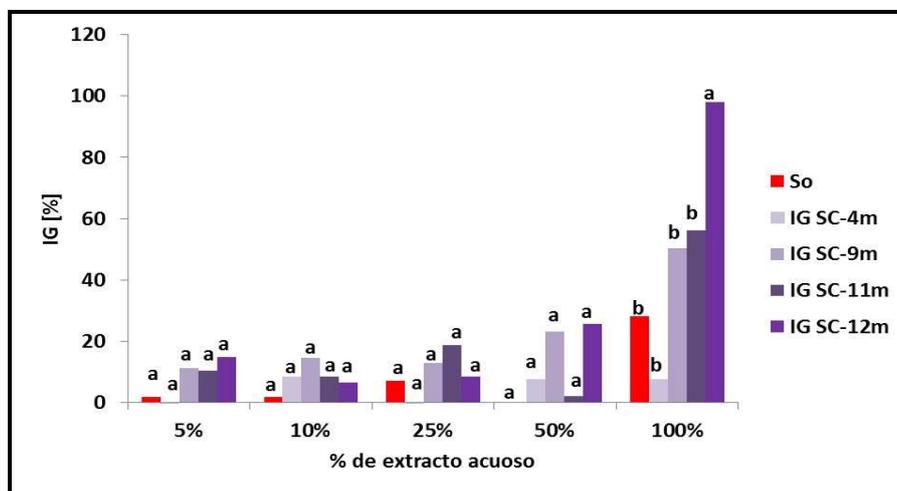


Figura IV.18. Ensayos de fitotoxicidad de los extractos acuosos de S₀ y SC. Dinámica del índice de inhibición de la germinación (IG %) utilizando extractos acuosos de S₀ y de los microcosmos SC luego de 4, 9, 11 y 12 meses de tratamiento.

Se observó que el IG % aumenta conforme aumenta la concentración del extracto, aunque sin mostrar diferencias significativas con los valores encontrados en S₀, a excepción del extracto sin diluir luego de 12 meses de tratamiento que alcanza el 98 % de inhibición.

No se observaron efectos significativos sobre el índice de inhibición en la elongación radicular (IE %), probablemente debido a la gran dispersión de la medida. Una observación relevante es que las radículas generadas por estos extractos fueron más parecidas a las desarrolladas en el control (agua), en grosor y en la presencia de raíces secundarias.

En la Figura IV.19 se presenta el desarrollo del test de producción vegetal utilizando una mezcla de semillas de césped sembradas sobre material del microcosmos SC al finalizar el tratamiento. La producción vegetal luego de un mes de la siembra de las semillas fue de $6.82 \text{ mg}_{\text{SECO}} (\text{cm}^2)^{-1}$.

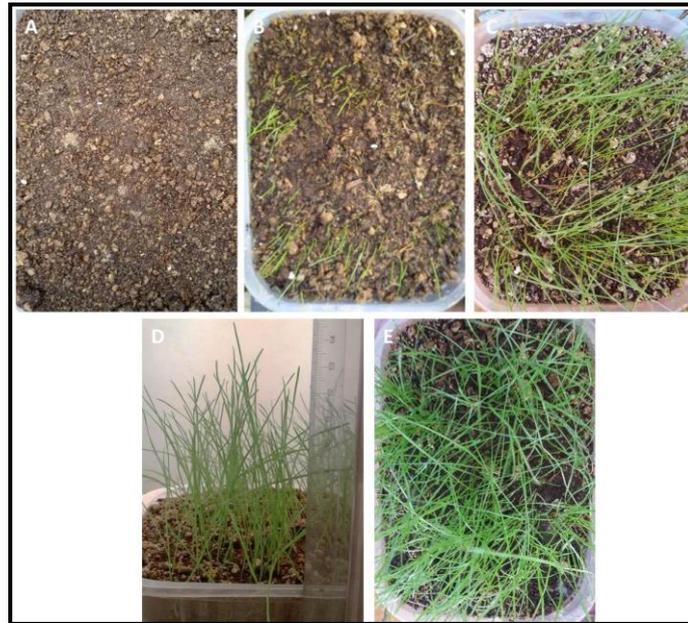


Figura IV.19. Desarrollo del test de germinación de césped de los microcosmos SC luego 12 meses de tratamiento, realizado durante un mes. A. Inicio del ensayo. B. 14 días de ensayo. C. y D. 21 días de ensayo. E. 28 días de ensayo.

Discusión

El tratamiento de compostaje produjo el incremento de CO, N y P en el suelo compostado al cabo de un año de tratamiento. La actividad biológica se evidenció a través de la dinámica de las poblaciones microbianas, la actividad enzimática y en el descenso del pH en el suelo compostado (una unidad aproximadamente). El descenso del pH puede atribuirse a la liberación de compuestos ácidos de bajo peso molecular producto del metabolismo microbiano (Morán Vieyra y col., 2009).

No se observó fase termófila durante el tratamiento, aunque sí se comprobó que la temperatura de los microcosmos SC fue superior a la del control. El avance del proceso se evidenció por los cambios macroscópicos observados. La ausencia de la fase termófila puede ser atribuida al uso de materiales relativamente estables utilizados para el compostaje (Semple y col., 2001).

En relación con estos resultados, otros autores evaluaron el efecto de la temperatura durante el proceso de compostaje en suelos con contaminación crónica y aguda (Antizar-Ladislao y col., 2006a; Sayara y col., 2010a). Los autores comprobaron una disminución en la eliminación de hidrocarburos al incubar los microcosmos a una temperatura equivalente a la alcanzada en la fase termófila, sugiriendo que

temperaturas mayor 45°C resultaría inhibidora de las poblaciones activamente degradadoras (generalmente mesófilas).

En general, los sustratos orgánicos utilizados como agentes de volumen en el tratamiento de compostaje son ricos en celulosa, proteínas, lípidos y lignina. En particular, la lignocelulosa (principal componente del agente de volumen) es una macromolécula formada por celulosa, hemicelulosa y lignina (Tuomela y col., 2000). La incorporación de estos materiales al suelo contaminado significa una fuente de C y energía asequible a los microorganismos durante su biodegradación. De este modo, el compostaje resulta un proceso dinámico y activo en el que el material utilizado es microbiológicamente transformado dependiendo de la capacidad de las poblaciones microbianas del suelo. Las enmiendas orgánicas poseen sustancias tipo húmicas caracterizadas por el alto carácter alifático y la heterogeneidad molecular (Senesi y col., 2007). Plaza y col., 2009 concluyen que durante el compostaje se producen modificaciones estructurales y químicas de las SH de las enmiendas orgánicas, que se traducen en la liberación de compuestos alifáticos y de carbohidratos.

Los aumentos de poblaciones degradadoras de alifáticos y de celulosa observados durante el compostaje (a los 2 y 8 meses) podrían asociarse a la transformación microbiana de los materiales del compost (rastrojo de avena y estiércol de cabra) y posterior eliminación de HAs. La transformación macroscópica del material a su vez podría asociarse al incremento en el contenido de HAs observado luego de 4 meses de tratamiento. Avanzado el mismo, se observó la eliminación de al menos el 35 % del contenido de HAs, con respecto a S_0 , con la acumulación relativa de HAs de alto peso molecular.

Respecto de los PAHs, no se observó eliminación neta durante el tratamiento, en concordancia con la estabilidad de los recuentos de la población degradadora de PAHs. El análisis diferencial de los 16 PAHs evidenció cambios individuales que se tradujeron en un cambio de la composición relativa del contenido de PAHs, representado por el descenso de la fracción de PAHs de 3 anillos. Esta eliminación fue compensada con un incremento de la fracción de PAHs de 6 anillos.

Oleszczuk (2007) en sus estudios de compostaje, utilizando residuos municipales conteniendo PAHs, describe que durante la primera fase del compostaje la reducción

del contenido de PAHs ocurrió a expensas de la fracción biodisponible, mientras que en la segunda fase, predominaron los procesos de *secuestro* del contaminante por la matriz del suelo, principalmente de los PAHs de mayor número de anillos. En nuestro caso, el incremento observado en PAHs de alto peso molecular, luego de 12 meses de tratamiento, así como el aumento de la biodisponibilidad atribuido al benzo [a] pireno (5 anillos), indicarían un cambio en la extractabilidad, probablemente promovida por el “*desequestro*” de los mismos de la matriz del suelo. Varios trabajos han demostrado que la calidad de la materia orgánica y el tiempo de interacción con los contaminantes contribuyen al *secuestro* de los PAHs, modulando la eficiencia de su eliminación (Bamforth y Singleton 2005; Lladó y col., 2009; Wu y col., 2013).

Así mismo, otros autores concluyen en sus resultados que el agregado de materia orgánica fácilmente asimilable al suelo contaminado (o bien su presencia en suelo) puede tener como efecto el “desvío del metabolismo” hacia estos sustratos más fácilmente asimilables, retardando o limitando la degradación de los contaminantes (Dias y col., 2012). Teng y col., 2010 han demostrado que las diferentes fuente de carbono y concentraciones cumplen distintos roles en la estimulación de las poblaciones degradadoras de PAHs. Esto se debe a que los sustratos que son degradados lentamente y que no pueden ser utilizados de modo directo por la mayoría de los microorganismos pueden permanecer en el suelo más tiempo y así favorecer la eliminación de los compuestos más recalcitrantes por co-metabolismo.

Varios autores describen que, durante las primeras etapas del compostaje se incrementa el contenido de CTD, el cual desciende a medida que avanza el proceso (Antizar-Ladislao y col., 2006b; Said-Pullicino y Gigliotti 2007; Hua y col., 2008). Los distintos autores atribuyen este descenso al consumo de compuestos fácilmente asimilables. El contenido de CTD final encontrado en los microcosmos SC, similar al de S_0 , podría ser indicador del avance del tratamiento, reflejando la actividad de la comunidad microbiana durante el compostaje.

El análisis espectroscópico del extracto del SC evidenció una relación E_4/E_6 superior a la determinada en S_0 , indicando el predominio de sustancias de bajo peso molecular, fácilmente asimilables (Morán Vieyra y col., 2009). En este punto, cabe

recordar que la relación E_4/E_6 del compost de referencia fue aún menor a la determinada en S_0 , correspondiéndose con la presencia de compuestos orgánicos de alto grado de condensación (Lguirati y col., 2005) en el compost de referencia, y sugiriendo la madurez del mismo. En función de los resultados obtenidos luego de un año de compostaje, la relación E_4/E_6 significativamente superior a la determinada en S_0 podría sugerir que el compostaje continúa activo a expensas de compuestos orgánicos fácilmente metabolizables, conduciendo eventualmente a una gradual liberación de los PAHs.

También la matriz de fluorescencia (MEEF) de SC fue indicadora de los cambios ocurridos durante el tratamiento, evidenciando solo la Región 1, como en los extractos del compost, y desplazada respecto de la generada por S_0 . Estos resultados sugieren un cambio sustancial en la matriz del SC, producto de la transformación de la materia orgánica por la comunidad microbiana en el proceso de humificación (Antizar-Ladislao y col., 2006b).

La actividad microbiana durante el compostaje fue evidenciada durante todo el tratamiento a través de los valores aumentados de la actividad deshidrogenasa, atribuibles al desarrollo de la población degradadoras de HAs (especialista) que condujo a la significativa eliminación de HAs. Resultados similares fueron obtenidos por Namkoong y col., 2002 en sus ensayos utilizando suelos con contaminación aguda, logrando correlacionar positivamente la eliminación de hidrocarburos y la actividad deshidrogenasa.

El significativo aumento de actividades lipasa, ureasa, arilsulfatasa y fosfatasas (ácida y alcalina) determinado al cabo de un año de compostaje indica el establecimiento de poblaciones metabólicamente activas, pudiendo contribuir a la degradación de los hidrocarburos (Cole y col., 1995). El aumento de actividad lipasa, asociada al metabolismo de hidrocarburos (Brzeszcz y col., 2016), se correspondió con la eliminación de HAs detectada en SC. El aumento de la actividad ureasa es indicador de la funcionalidad del ciclo del nitrógeno, probablemente debido al constante suministro de compuestos nitrogenados producto de la degradación de la materia orgánica agregada.

La actividad arilsulfatasa y la actividad fosfatasas indican la movilización de sulfatos (Whalen y Warman 1996) y fosfatos por la comunidad microbiana. Particularmente, la actividad fosfatasa también se evidenció por el aumento de la población solubilizadora de fosfatos, estimulada por el aporte de P.

Los procesos degradativos evidenciados durante el tratamiento se reflejaron en la toxicidad aguda del material compostado al cabo de un año. El incremento en el índice de inhibición de la germinación (IG %) puede atribuirse en parte a la acumulación de productos metabólicos solubles de mayor toxicidad, incluidos los PAHs. Un resultado similar fue observado por Morelli y col., 2001 durante el tratamiento de biorremediación de un barro petroquímico. Los autores comprobaron un aumento en la toxicidad aguda y también en la mutagenicidad durante las etapas intermedia y final del tratamiento.

Así mismo, el aumento de la conductividad eléctrica (CE) pudo haber sido otro factor contribuyente al incremento del IG %, resultando en el retardo de la germinación de las semillas, como lo describe Esehie (1994) en su trabajo. El autor estudió el efecto de la temperatura y salinidad sobre la germinación de semillas de Sorgo, e informó que la salinidad y la temperatura son factores que modulan la germinación: a temperaturas menores a 30°C, el aumento de la salinidad resulta en el descenso del IG %. A pesar de la gran dispersión de datos, fue significativo el cambio morfológico observado en las raíces obtenidas a partir de los extractos acuosos del suelo compostado, siendo éstas similares a las raíces desarrolladas en el control (con agua). Los resultados sugieren que los compuestos del extracto influyen de maneras diferentes en la germinación de semillas y en la elongación de las raíces. Por esta razón, ambas determinaciones son indispensables para monitorear la toxicidad del sistema a lo largo del tratamiento.

Durante la imbibición de las semillas, el agua ingresa a la célula vegetal, facilitada por el potencial osmótico, y la germinación se inicia por las hidrólisis de hidratos de carbono de reserva, presentes en las mismas. Cuando las semillas son embebidas en extractos acuosos con elevado potencial osmótico, o presencia de hidrocarburos o productos metabólicos, estos pueden ingresar a la célula vegetal, inhibiendo o alterando la hidrólisis del material de reserva, proceso necesario para la germinación

(Masakorala y col., 2013). De esta manera se podría atribuir a ambos factores, intermediarios tóxicos más solubles y la mayor conductividad, la reducción en la germinación.

Estimulación con enmienda orgánica (SE)

Estudios químicos y físicos

La Tabla IV.10 muestra el análisis químico de los microcosmos de suelo estimulado con compost, SE, al finalizar el tratamiento (60 días). Puede apreciarse que el valor de pH fue menor respecto al valor de S_0 , mientras que la conductividad eléctrica fue significativamente mayor. Se encontró que los contenidos de CO, N y P se incrementaron con respecto a S_0 . La relación C:N:P encontrada fue menor que la correspondiente a S_0 poniendo en evidencia el significativo aporte de P por el compost.

Tabla IV.10. Análisis químico del suelo original (S_0) y del microcosmos de suelo estimulado con compost (SE) al finalizar el tratamiento. Medida de pH, Conductividad Eléctrica (CE, [$\mu\text{S cm}^{-1}$]), Potencial redox (Eh, [mV]), Carbono Orgánico (CO %), Nitrógeno total (N %) y Fósforo disponible (P, [mg Kg^{-1}]).

Propiedades	S_0	SE
pH final	8.8 ± 0.1	7.6 ± 0.1
CE [$\mu\text{S cm}^{-1}$]	634 ± 12	6540 ± 28
Eh [mV]	236 ± 2	236.6 ± 0.3
CO [%]	2.2 ± 0.9	9.3 ± 0.5
N [%]	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1
C:N	11	13
P [mg Kg^{-1}]	8.3 ± 0.6	159.0 ± 0.7
C:N:P	0.3: 0.03:1	0.06:0.004:1

La Tabla IV.11 y la Figura IV.20 muestran la concentración de HAs y la relación porcentual de las diferentes fracciones. El contenido de HAs se incrementó un 44 %. La fracción de compuestos de C29 – C35 fue la que mostró el mayor incremento porcentual con respecto a S_0 .

Tabla IV.11. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) de los sistemas suelo original (S_0) y microcosmos de suelo estimulado con compost (SE) al finalizar el tratamiento. Se incluyeron los valores correspondientes al compost utilizado para la estimulación con fines comparativos.

Microcosmos	HAs [$\text{mg Kg}_{\text{ss}}^{-1}$]	C9 – C20 [%]	C20 – C29 [%]	C29 – C35 [%]
S_0	2456 (b)	52.9	42.1	5.0
SE	3531 (a)	46.4	35.6	18.0
Compost	2401 (b)	40.9	35.1	24.0

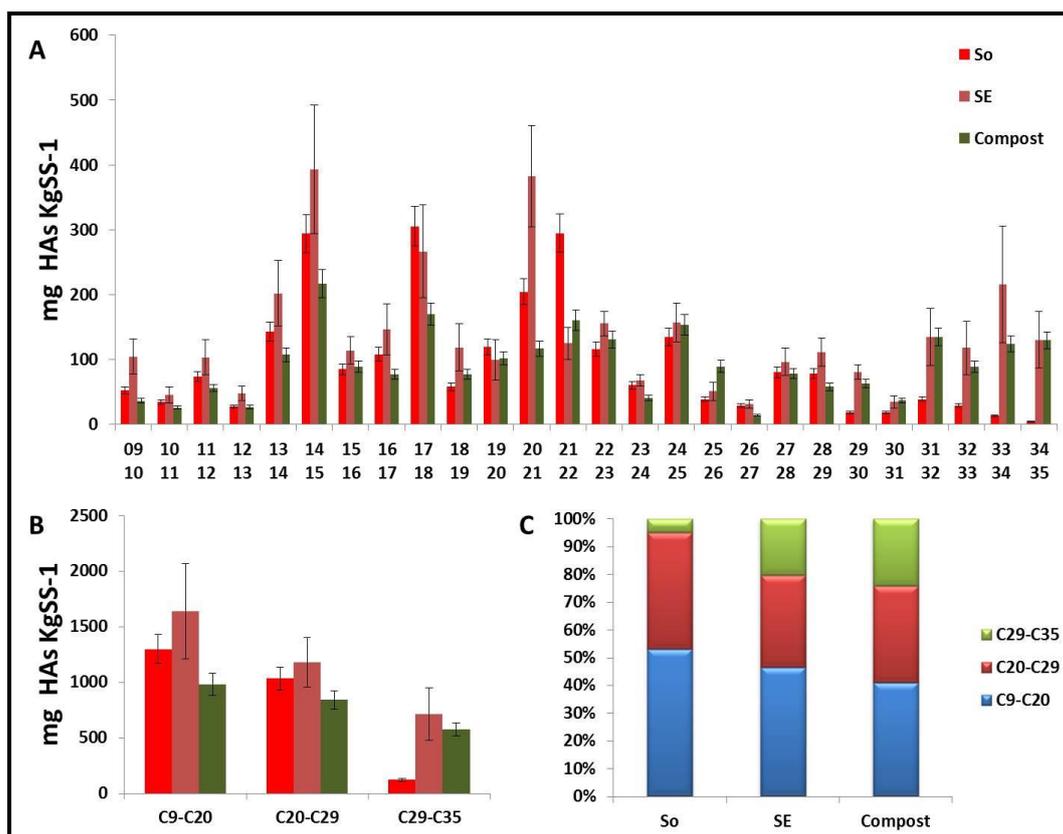


Figura IV.20. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) de los sistemas suelo original (S_0), microcosmos de suelo estimulado (SE) y del compost utilizado para la estimulación. **A.** Detalle de cada fracción de HAs, expresado como mg de compuesto kg_{SS}^{-1} . **B.** Contenido de HAs según el número de átomos de carbono. **C.** Composición relativa [%]. Los valores numéricos se presentan en la Tabla IV.11

Al igual que en SC, no es posible discriminar con certeza el porcentaje de eliminación de los HAs del suelo debido al tratamiento, ya que se cuenta con el aporte de HAs de dos orígenes distintos: generados por la contaminación crónica del sitio y derivados del metabolismo de la enmienda orgánica.

La Tabla IV.12 y la Figura IV.21 muestran la concentración de PAHs totales y la composición según el número de anillos. El tratamiento de estimulación con compost provocó una disminución del 32 % en la concentración total de PAHs. Así mismo se detectó una disminución en la concentración de acenafteno, fluoreno, fenantreno, fluoranteno y pireno del 97 %, 49 %, 9 % y 3 % respectivamente.

Tabla IV.12. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (PAHs) de los sistemas suelo original (S₀) y de los microcosmos de suelo estimulado con compost (SE) al final del tratamiento.

Microcosmos	PAHs [mg Kg _{ss} ⁻¹]	3 anillos [%]	4 anillos [%]	5 anillos [%]	6 anillos [%]
S ₀	214 (a)	35.6	47.8	6.2	10.4
SE	147 (b)	28.5	50.1	7.4	14.0

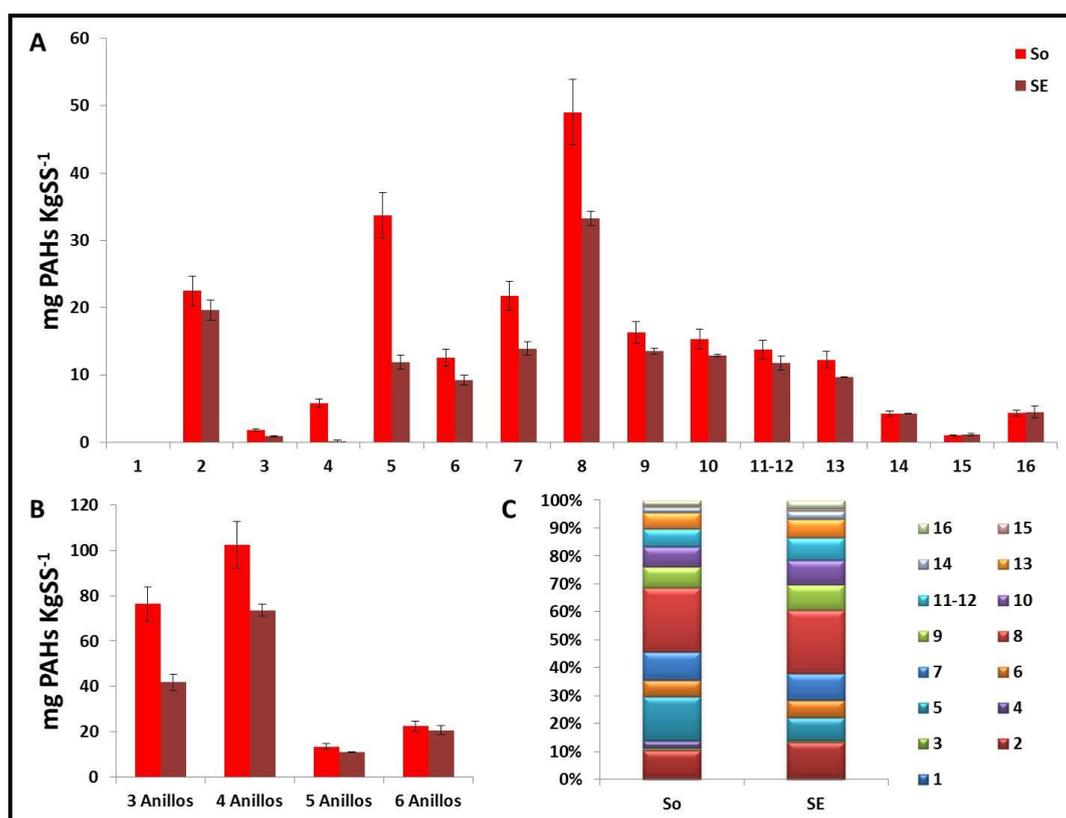


Figura IV.21. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs) de los sistemas suelo original (S₀), y microcosmos de suelo estimulado (SE). A. Detalle de cada fracción de PAHs, expresado como mg de compuesto kg_{ss}⁻¹. **B.** Contenido de PAHs según el número de átomos de carbono. **C.** Composición relativa [%]. **Los valores numéricos se presentan en la Tabla IV.12.**

La estimulación con compost provocó un incremento de la biodisponibilidad de los PAHs respecto de S₀, determinada usando la resina XAD-2. El valor medido fue de 16 ± 2 % respecto del total, es decir unos 23 mg PAH Kg_{ss}⁻¹. Los compuestos que incrementaron en mayor medida su biodisponibilidad fueron el acenaftileno, el benzo [a] pireno y la mezcla de benzo [b] fluoranteno / benzo [k] fluoranteno.

El resultado del análisis del extracto alcalino evidenció valores de CTD en el microcosmos SE de 125.9 ± 0.8 mg C L⁻¹, significativamente superior al valor encontrado en S₀.

La Figura IV.22 presenta los resultados del análisis espectroscópico de estos extractos (dilución 1:10).

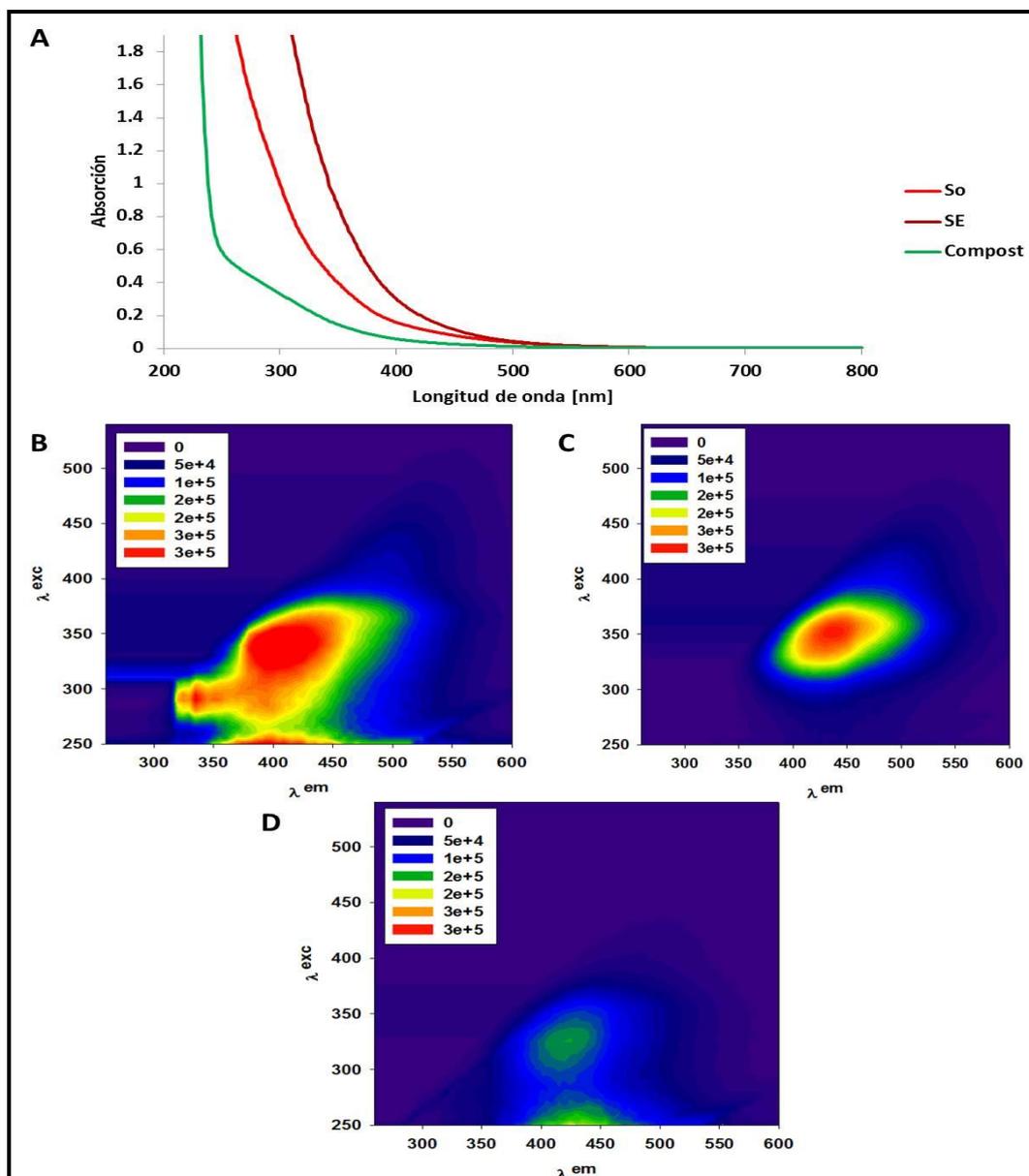


Figura IV.22. Análisis de los extractos alcalinos. A. Espectros de absorción de S₀, SE y Compost. **B.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de S₀. **C.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de SE. **D.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia del Compost.

En la Figura IV.22.A se evidenció un cambio en el espectro de absorción del extracto alcalino de SE respecto de S₀, con un marcado aumento de la relación E₄/E₆ (23 y 15 para SE y S₀ respectivamente). La MEEF del extracto SE mostró una única región de emisión, con máximo en la Región 1, similar a la observada en los extractos de SC pero con un leve corrimiento a mayor longitud de onda.

Análisis de las poblaciones microbianas cultivables

La Figura IV.23 presenta la dinámica de las poblaciones de bacterias heterótrofas (BH), hongos (RH) y bacterias que solubilizan fósforo (BSP) en los microcosmos SE. Se aprecia que la densidad de BH osciló en torno al valor del suelo original, sin cambios significativos durante los 2 meses de tratamiento. Durante el primer mes, la concentración de población fúngica no mostró diferencias con respecto al valor observado en S_0 . Al final del tratamiento, esta población evidenció un descenso significativo con respecto a S_0 . La población de BSP se mantuvo con valores significativamente superiores al determinado para S_0 , durante todo el tiempo de tratamiento.

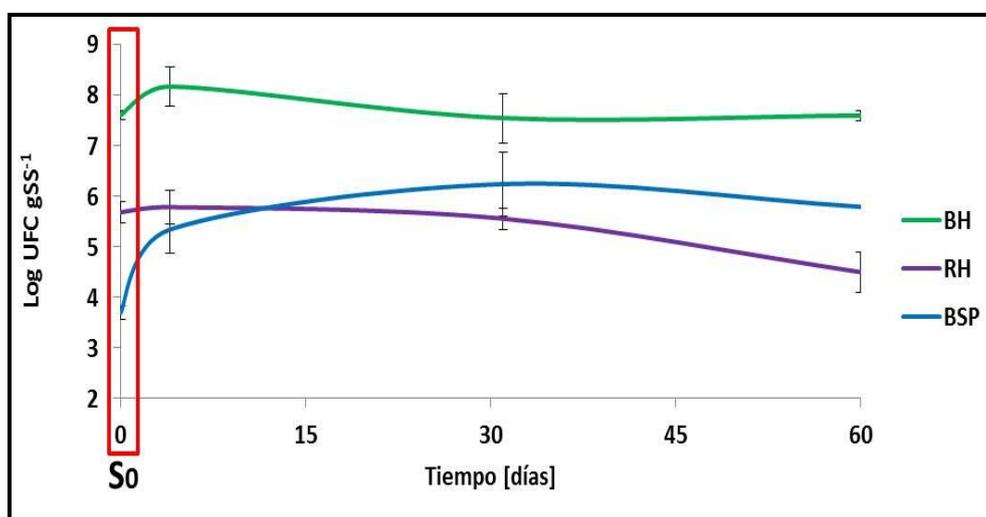


Figura IV.23. Dinámica de las poblaciones de bacterias heterótrofas (BH), hongos (RH) y bacterias que solubilizan fósforo (BSP) durante el tratamiento en el microcosmos SE.

La Figura IV.24 muestra la dinámica de las poblaciones de BD-HAs, BD-PAHs y BD-C durante el tratamiento en el microcosmos SE. No se observan cambios significativos en ninguna de las poblaciones durante el tratamiento.

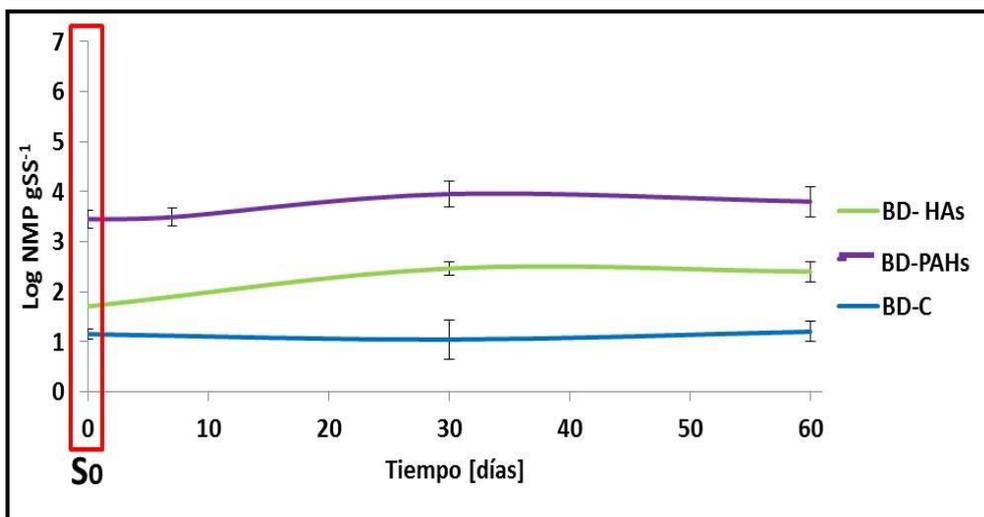


Figura IV.24. Dinámica de las poblaciones de bacterias degradadoras de HAs (BD-HAs), degradadoras de PAHs (BD-PAHs) y degradadoras de celulosa (BD-C) durante el tratamiento en el microcosmos SE.

Caracterización de la funcionalidad del suelo

La Figura IV.25 muestra la dinámica de la actividad deshidrogenasa durante el tratamiento, donde puede apreciarse que la medida fue significativamente superior al valor de S_0 durante todo el tiempo de ensayo. El gran desvío apreciado en las determinaciones tempranas, puede atribuirse a la heterogeneidad del material analizado.

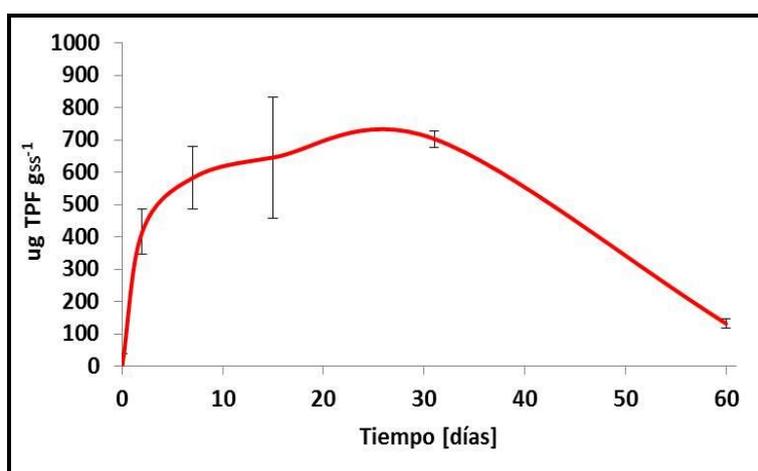


Figura IV.25. Actividad deshidrogenasa de los microcosmos SE durante el tratamiento.

Se observó un incremento significativo de la actividad deshidrogenasa, con un máximo el día 31. Luego del primer mes de tratamiento, la medida de la actividad disminuyó hasta alcanzar un valor de $132 \pm 14 \mu\text{g TPF g}_{\text{SS}}^{-1}$ al final del tratamiento.

La Tabla IV.13 presenta los resultados de las actividades enzimáticas determinadas al finalizar el tratamiento, donde se puede apreciar que la estimulación con compost luego de dos meses provocó un incremento significativo de todas las actividades enzimáticas determinadas.

Tabla IV.13. Actividades enzimáticas determinadas en el microcosmos de suelo estimulado con compost (SE) al final del tratamiento. Comparación con los valores determinados en el suelo original (S₀). Las medidas se realizaron por triplicado.

Actividad enzimática	S ₀	SE
Deshidrogenasa [$\mu\text{g TPF g}_{\text{SS}}^{-1}$]	<i>No detectado</i>	132 ± 14
Lipasa [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	189 ± 4 (b)	320 ± 34 (a)
Arilsulfatasa [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	33 ± 1 (b)	59 ± 1 (a)
Fosfatasa alcalina [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	175 ± 24 (b)	1340 ± 70 (a)
Fosfatasa ácida [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	103 ± 20 (b)	670 ± 109 (a)
Ureasa [$\mu\text{gN-NH}_4\text{g}_{\text{SS}}^{-1}$]	23 ± 6 (b)	76 ± 5 (a)
Proteasa [$\text{mg Tyr g}_{\text{SS}}^{-1}$]	<i>No detectado</i>	0.20 ± 0.01

Ensayos de fitotoxicidad

La Figura IV.26 muestra los valores del índice de inhibición de la germinación (IG %) y de inhibición en la elongación (IE %), obtenidos a partir de los extractos acuosos obtenidos de microcosmos SE.

Los extractos acuosos sin diluir (100 %) evidenciaron diferencias significativas con respecto al control (agua) en el IG %. Este valor fue de 42 ± 20 %, superior al encontrado para S₀. No se observaron efectos significativos sobre el IE %, probablemente debido a la gran dispersión de la medida. Sin embargo, se observa un efecto inverso al encontrado con los extractos acuosos de S₀, evidenciando un acortamiento de las radículas.

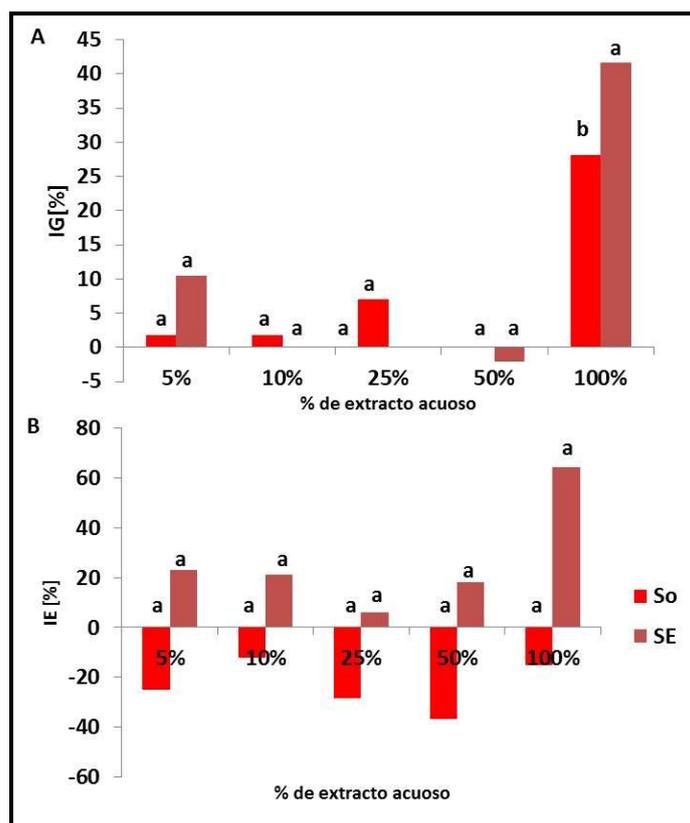


Figura IV.26. Ensayos de fitotoxicidad de los extractos acuosos de S₀ y SE. A. Índice de inhibición en la germinación (IG %). B. Índice de inhibición de la elongación (IE %). Los ensayos se realizaron utilizando extractos acuosos del suelo original (S₀) y de microcosmos SE, luego de 45 días de tratamiento.

La Figura IV.27 muestra una imagen de las plántulas desarrolladas, donde se aprecia que las raíces generadas por estos extractos son de calibre similar al control (agua) y con raíces secundarias. También se aprecia el acortamiento de la longitud del hipocótilo de las plántulas, respecto de lo observado con los extractos de S₀.

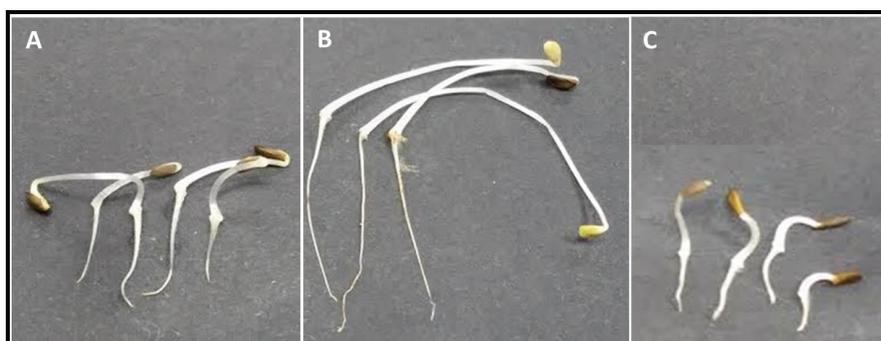


Figura IV.27. Morfología de las plántulas de *Lactuca sativa* L. A. Plántulas generadas por tratamiento con agua destilada. B. Plántulas generadas por tratamiento con el extracto sin diluir de S₀. C. Plántulas generadas por tratamiento con el extracto sin diluir de SE.

Discusión

La estrategia de estimulación con compost del suelo contaminado fue monitoreada a través de la actividad deshidrogenasa, registrándose un periodo de gran actividad durante los primeros 30 días de tratamiento. Posteriormente se observó un descenso, llegando a valores inferiores al 20 % del máximo a los 60 días. Esta enzima se considera un indicador del metabolismo microbiano general (Salazar y col., 2011), porque refleja una amplia gama de procesos oxidativos que ocurren en el suelo, resultando informativa del progreso de la biodegradación de hidrocarburos (Brzeszcz y col., 2016). Por esta razón, se decidió elegir 60 días como el tiempo final del tratamiento.

La incorporación de compost incrementó el contenido de CO₂, N y P en los microcosmos SE. Como se mencionó anteriormente, el uso de enmiendas orgánicas proporciona al suelo una variedad de nutrientes mejorando su calidad (Ceccanti y col., 2006; Sayara y col., 2010b; Wu y col., 2013). También se registró un descenso del pH al finalizar el tratamiento, atribuido a la actividad de la comunidad microbiana (Morán Vieyra y col., 2009).

El incremento detectado en el contenido de HAs en los microcosmos SE concuerda con lo observado durante las primeras etapas de un compostaje, sugiriendo el desarrollo de un proceso de transformación y degradación de la materia orgánica que deja en evidencia que el material utilizado para la estimulación aún no se encontraba estabilizado. Probablemente, un aumento del tiempo de tratamiento conduciría a la disminución de la fracción de alifáticos liviana.

Contrariamente a lo observado para los HAs, la estrategia de estimulación promovió la eliminación de 31 % del contenido de PAHs, principalmente a los de 3 anillos (acenafteno, fluoreno, fenantreno, fluoranteno), que fueron los más abundantes en S₀. Así mismo, el agregado de compost también incrementó la biodisponibilidad de PAHs, principalmente de alto peso molecular, mostrando un comportamiento similar al apreciado en la estrategia de compostaje en suelo. Resultados similares fueron descritos por Wu y col., 2013, para suelos crónicamente contaminados tratados con enmienda orgánica, en tiempos cortos de ensayo (3

meses), donde determinó un 29 % de eliminación de PAHs. Los autores describen también el aumento en la concentración de PAHs de alto peso molecular, atribuido a la desorción de los mismos de la matriz del suelo.

Ha sido ampliamente documentado que a medida que aumenta el peso molecular de los PAHs, aumenta su hidrofobicidad, disminuyendo así su biodisponibilidad (Huesemann y col., 2004; Oleszczuk 2007; Asquith y col., 2012; Wu y col., 2013). Sin embargo, la biodisponibilidad de estos compuestos depende también del tiempo de interacción con las sustancias húmicas del suelo, donde pueden ser fuertemente adsorbidos (Bamforth y Singleton 2005; Antizar-Ladislao y col., 2006b). La falta de una correspondencia entre el peso molecular de los PAHs con su biodisponibilidad y/o su concentración pone en evidencia que el tiempo de la contaminación y la naturaleza de la materia orgánica del suelo juegan un papel relevante en la movilización de los PAHs en suelos crónicos (Alexander 2000; Jonsson y col., 2007; Kästner y Miltner 2016).

El mayor contenido de CTD determinado en el microcosmos SE podría ser atribuido al relativamente corto periodo de tratamiento.

El incremento de la relación E_4/E_6 de los extractos alcalinos de SE con respecto al valor de S_0 , sugiere la presencia compuestos solubles fácilmente asimilables, producto de la actividad microbiana degradadora (Morán Vieyra y col., 2009). Además, siendo que este valor también es mayor que para el compost control, podría suponerse que el tratamiento SE aún está en una etapa de transformación activa de la materia orgánica.

La MEEF correspondiente a los extractos de los microcosmos SE, al igual que en SC, mostró una única región de emisión, asociada a compuestos orgánicos solubles propios del suelo (Región 1). Esta región está desplazada respecto a la determinada en S_0 , lo que indicaría diferencias en la naturaleza de los compuestos disueltos en ambos extractos. El corrimiento de la Región 1 en los extractos provenientes de SE con respecto a la encontrada en SC sería otra indicación del corto tiempo de maduración del material compostado utilizado como enmienda (Antizar-Ladislao y col., 2006b).

La dinámica de las poblaciones bacterianas y fúngicas analizadas no evidenciaron los cambios apreciados en la concentración de hidrocarburos y en la MOS. No

obstante, la permanencia de las poblaciones en los valores originales durante el tiempo de tratamiento podría ser atribuida a la alta disponibilidad de nutrientes aportados por la estimulación con la enmienda. Únicamente se observó un incremento en la población solubilizadora de P. Esta última observación junto con el aumento en las actividades enzimáticas de ureasa, proteasa, arilsulfatasa y fosfatasa, evidencian la movilización de N, P y S en el suelo. Este comportamiento fue acompañado de la estimulación de actividad lipasa, asociada al metabolismo de los hidrocarburos (Brzeszcz y col., 2016). Los valores obtenidos para la actividad de deshidrogenasa indican la estimulación de las comunidades tras el agregado de materia orgánica fácilmente asimilable.

Los procesos de transformación y degradación durante el tratamiento SE se evidenciaron también en la mayor inhibición de la germinación, y sería atribuible a la acumulación de productos intermediarios solubles de la degradación de PAHs y a la mayor biodisponibilidad (Morelli y col., 2001). Al igual que lo observado en SC, la mayor conductividad eléctrica de estos microcosmos podría ser otro factor inhibitorio de la germinación (Esechie 1994). De modo análogo a lo observado por efecto del compostaje en el suelo, la estimulación promovió el desarrollo de plántulas similares a las obtenidas en el control (agua), por lo que el efecto fitotóxico observado podría deberse a un retardo de la germinación de las semillas debido a la acumulación de intermediarios metabólicos y el incremento de la conductividad.

Estimulación con sales (SF)

Estudios químicos y físicos

La Tabla IV.14 muestra los resultados del análisis químico en una muestra del microcosmos SF luego de 90 días de tratamiento. Se observa que el agregado de NH_4NO_3 provocó un descenso del pH, dejando el doble de concentración de N respecto del valor de S_0 . El tratamiento no afectó el contenido de CO. Sin embargo, se encontró un descenso en el contenido de P.

Tabla IV.14. Análisis químico del suelo en estudio (S_0) y del microcosmos de suelo estimulado con NH_4NO_3 (SF) al finalizar el tratamiento. Medida de pH, Carbono Orgánico (CO %), Nitrógeno total (N %) y Fósforo disponible (P, [mg Kg^{-1}]).

Propiedades	S_0	SF
pH final	8.8 ± 0.1	7.6 ± 0.1
CO [%]	2.2 ± 0.9	2.20 ± 0.05
N [%]	0.2 ± 0.1	0.39 ± 0.01
C:N	11	5.6
P [mg Kg^{-1}]	8.3 ± 0.6	6.0 ± 0.1
C:N:P	0.3: 0.03:1	0.4:0.06:1

La Tabla IV.15 y la Figura IV.28 muestran la concentración de HAs y la relación porcentual de las diferentes fracciones. Como puede verse, no se observaron diferencias significativas en el contenido de HAs totales ni en sus fracciones con respecto a S_0 .

Tabla IV.15. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) de los sistemas suelo original (S_0) y estimulado con NH_4NO_3 (SF) al finalizar el tratamiento.

Microcosmos	HAs [$\text{mg Kg}_{\text{SS}}^{-1}$]	C9 – C20 [%]	C20 – C29 [%]	C29 – C35 [%]
S_0	2456 (a)	52.9	42.1	5.0
SF	2848 (a)	52.9	41.7	5.4

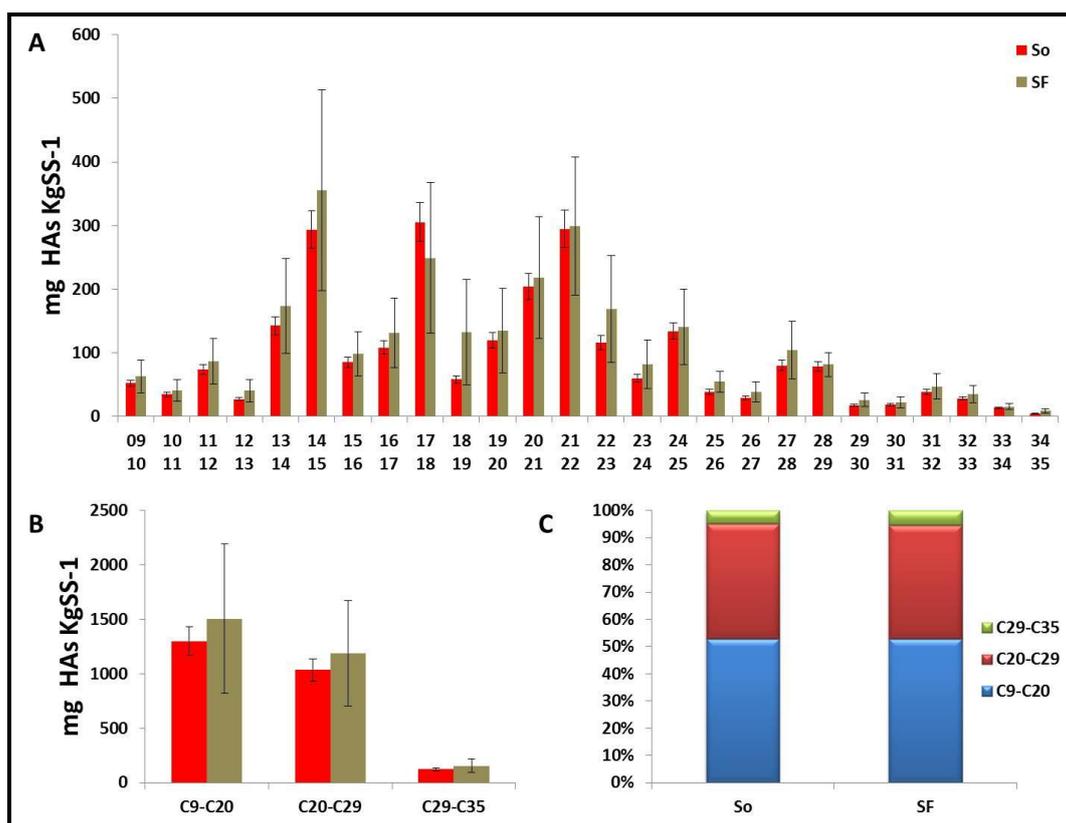


Figura IV.28. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) de los sistemas suelo original (S_0), y microcosmos de suelo fertilizado (SF). A. Detalle de cada fracción de HAs, expresado como mg de compuesto kg_{SS}^{-1} . **B.** Contenido de HAs según el número de átomos de carbono. **C.** Composición relativa [%]. **Los valores numéricos se presentan en la Tabla IV.15.**

La Tabla IV.16 y la Figura IV.29 muestran la concentración de PAHs totales y el contenido porcentual según el número de anillos de estos microcosmos. Como puede apreciarse, no se observaron diferencias significativas con respecto a S_0 .

Tabla IV.16. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (PAHs) de los sistemas suelo original (S_0) y estimulado con NH_4NO_3 (SF) al finalizar el tratamiento.

Microcosmos	PAHs [mg Kg _{SS} ⁻¹]	3 anillos [%]	4 anillos [%]	5 anillos [%]	6 anillos [%]
S_0	214 (a)	35.6	47.8	6.2	10.4
SF	256 (a)	33.4	48.1	6.8	11.7

El agregado de NH_4NO_3 no produjo cambios en la biodisponibilidad de los PAHs.

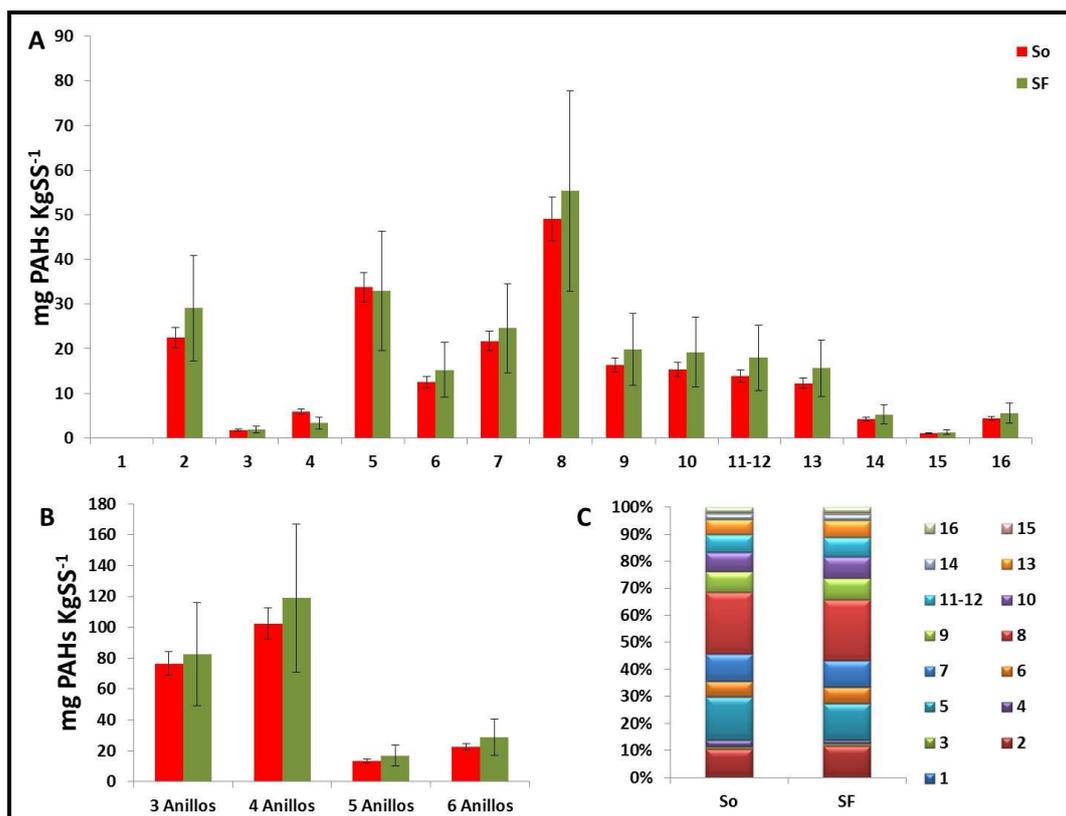


Figura IV.29. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs) de los sistemas suelo original (S_0) y microcosmos de suelo fertilizado (SF). A. Detalle de cada fracción de PAHs, expresado como mg de compuesto kg_{SS}^{-1} . **B.** Contenido de PAHs según el número de átomos de carbono. **C.** Composición relativa [%]. Los valores numéricos se presentan en la Tabla IV.16.

La medida del CTD determinada luego de los 90 días de tratamiento en los microcosmos SF fue significativamente menor a la encontrada en S_0 , con un valor de $71.4 \pm 0.3 \text{ mg C L}^{-1}$.

La Figura IV.30 muestra el estudio espectroscópico de los extractos alcalinos, donde puede apreciarse un cambio en el espectro de absorción. La relación E_4/E_6 para estos microcosmos fue de 11, significativamente menor a la correspondiente a S_0 . La MEEF de estos extractos mostró dos regiones de emisión. La zona más intensa correspondiente a la Región 1, y la otra, menos intensa, correspondiente a la Región 2, ambas levemente desplazadas con respecto a las encontradas en los extractos de S_0 .

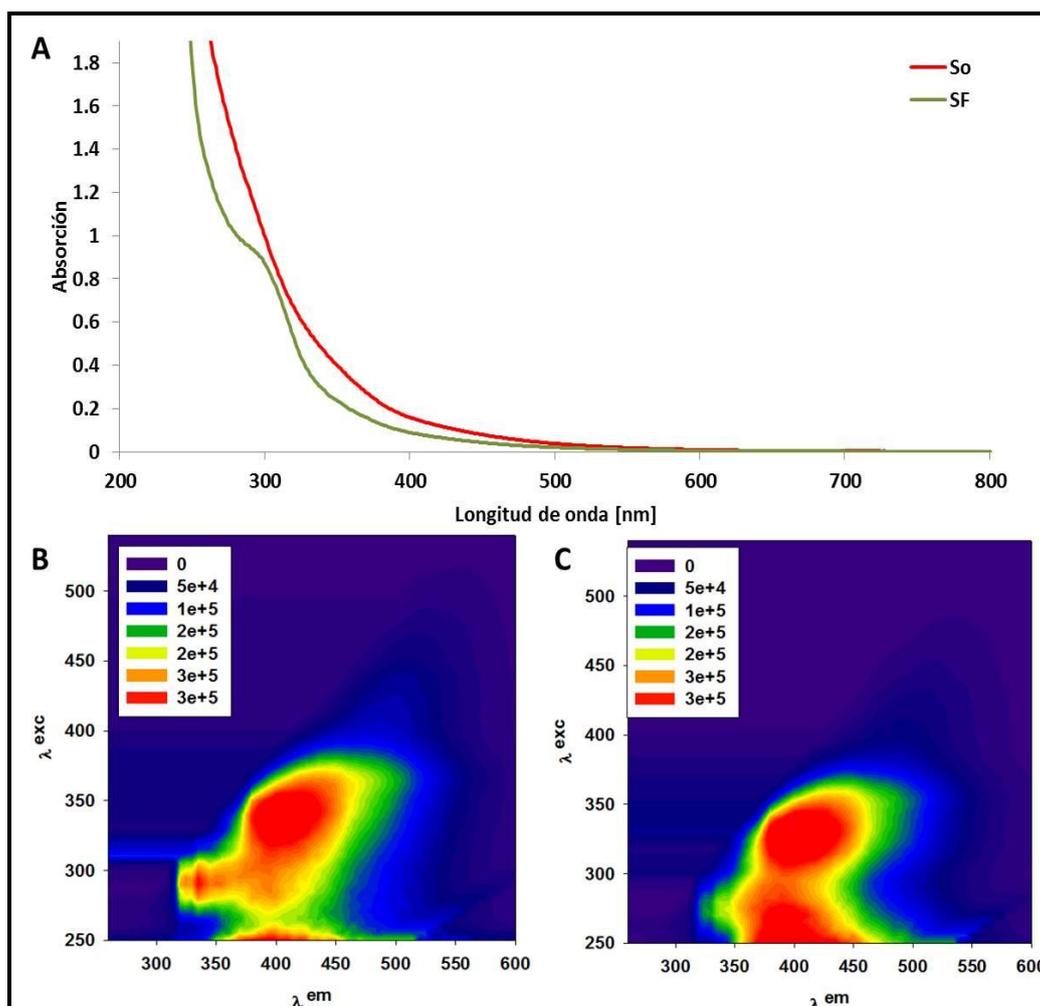


Figura IV.30. Análisis de los extractos alcalinos. A. Espectros de absorción de S_0 y SF. B. Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de S_0 . C. Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de SF.

Análisis de las poblaciones microbianas cultivables

La Figura IV.31 muestra la dinámica de las poblaciones de bacterias heterótrofas BH en los microcosmos SF. Se observó que la densidad de la población de BH durante el primer mes de tratamiento fue igual al valor de S_0 , dentro del error experimental ($p > 0.05$). Transcurrido el segundo mes, la población descendió paulatinamente a valores significativamente menores al valor de S_0 .

La Figura IV.32 muestra la dinámica de las poblaciones de BD-HAs, BD-PAHs y BD-C en SF. Se aprecia que el agregado de NH_4NO_3 provocó un incremento significativo en la población de BD-HAs con respecto a S_0 , medido el día 7. Este incremento no fue sostenido durante el tratamiento, ya que al día 60 los valores observados no presentaron diferencias significativas con S_0 . La concentración de la población BD-PAHs

también mostró un incremento durante el primer mes de tratamiento, alcanzando un máximo al día 30. Al final del tratamiento, esta población no mostró diferencias significativas con respecto a S_0 . La población de BD-C se incrementó significativamente luego de una semana de realizada la aplicación de NH_4NO_3 , y luego se mantuvo a lo largo del tratamiento.

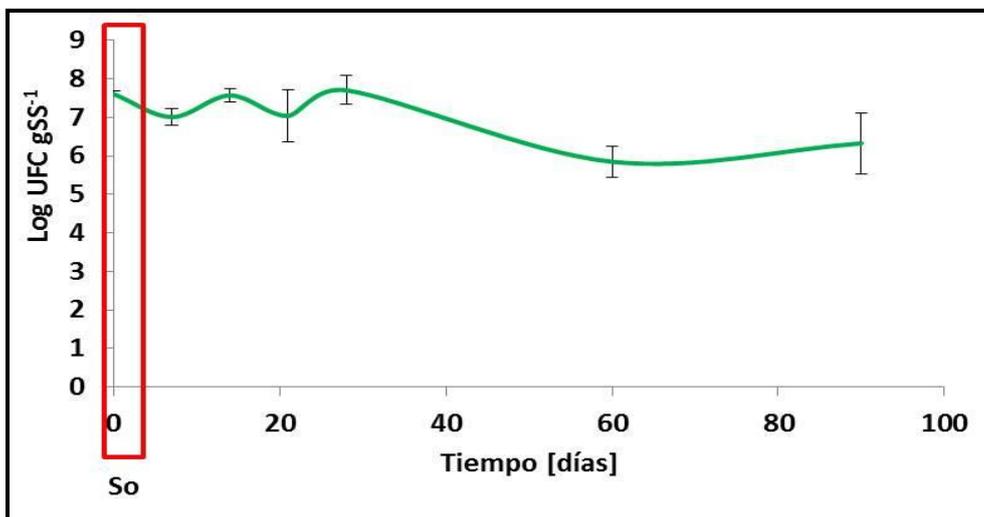


Figura IV.31. Dinámica de la población de bacterias heterótrofas (BH) durante el tratamiento en el microcosmos SF.

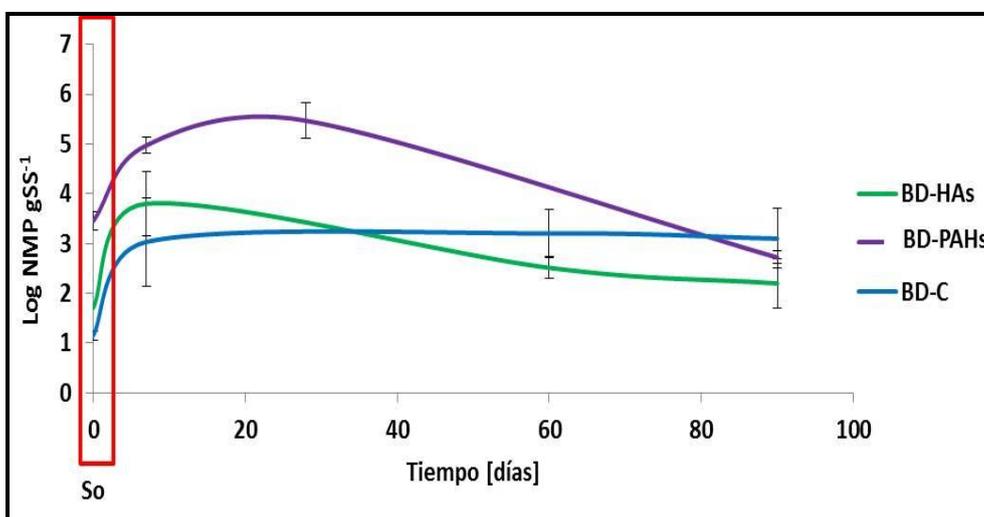


Figura IV.32. Dinámica de las poblaciones de bacterias degradadoras de HAs (BD-HAs), degradadoras de PAHs (BD-PAHs) y degradadoras de celulosa (BD-C) durante el tratamiento en el microcosmos SF.

Caracterización de la funcionalidad del suelo

No se detectó actividad deshidrogenasa durante el tratamiento.

La Tabla IV.17 muestra los resultados enzimáticos de estos microcosmos luego de 90 días, donde se observa un descenso significativo en la actividad ureasa, con respecto a S₀, atribuido al efecto inhibitorio por el aporte de amonio. No se observaron cambios significativos en las demás enzimas analizadas.

Tabla IV.17. Actividades enzimáticas determinadas en el microcosmos de suelo suplementado con NH₄NO₃ al final del tratamiento. Comparación con los valores determinados antes del tratamiento, en el suelo original. Las medidas se realizaron por triplicado.

Actividad	S ₀	SF
Deshidrogenasa [$\mu\text{g TPF g}_{\text{SS}}^{-1}$]	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>
Lipasa [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	189 ± 4 (a)	183 ± 1 (a)
Arilsulfatasa [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	33 ± 1 (a)	35.6 ± 0.4 (a)
Fosfatasa alcalina [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	175 ± 24 (a)	114 ± 27 (b)
Fosfatasa ácida [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	103 ± 20 (a)	137 ± 20 (a)
Ureasa [$\mu\text{gN-NH}_4\text{g}_{\text{SS}}^{-1}$]	23 ± 6	<i>No detectado</i>
Proteasa [$\text{mg Tyr g}_{\text{SS}}^{-1}$]	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>

Ensayos de fitotoxicidad

La Figura IV.33 muestra los resultados de los ensayos de fitotoxicidad de los microcosmos SF. Como puede verse, los extractos acuosos sin diluir provenientes de SF presentaron diferencias significativas con respecto de los extractos de S₀, tanto en el índice de inhibición de la germinación (IG %) como en el índice de inhibición en la elongación radicular (IE %).

El IG % para este extracto fue de 41 ± 26, mientras que el IE % fue de 67 ± 32, ambos significativamente superiores a los determinados en S₀. Si bien no se encontraron diferencias significativas (p>0.05) con el control (agua), las raíces desarrolladas fueron de menor longitud que las desarrolladas con extractos de S₀.

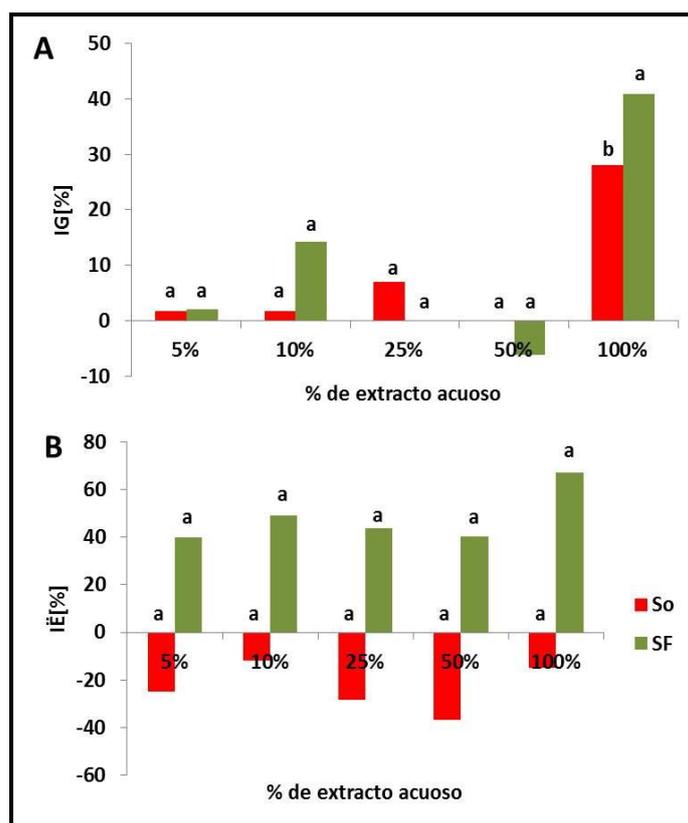


Figura IV.33. Ensayos de fitotoxicidad de los extractos acuosos de S₀ y SF. A. Índice de inhibición de la germinación (IG %). **B.** Índice de inhibición de la elongación (IE %). Los ensayos se realizaron utilizando extractos acuosos del suelo original (S₀) y de microcosmos SF, luego de 3 meses de tratamiento.

Discusión

La estrategia de fertilización con NH₄NO₃ del suelo contaminado dejó un contenido de nitrógeno superior al valor original, aún luego del tratamiento de 90 días. El valor al final del tratamiento representó un 56 % del valor inicial en los microcosmos SF. Es decir que parte del nitrógeno (44 %, aproximadamente) fue utilizado en los procesos de denitrificación (metabolismo desasimilador de N) como así también, en procesos abióticos.

El desarrollo temprano de las poblaciones bacterianas degradadoras puede ser atribuido al efecto de la fertilización, que provee nitrógeno fácilmente asimilable promoviendo el consumo de las fuentes de carbono disponibles. Este incremento fue superior al observado en el tratamiento SA.

Sin embargo, esta actividad microbiana no se vio reflejada en un descenso de la concentración de HAs ni de PAHs. La ausencia de degradación puede atribuirse a la baja biodisponibilidad medida para los PAHs y/o a la falta de sustratos co-metabólicos.

Respecto de las actividades enzimáticas estudiadas, el descenso de la actividad ureasa puede interpretarse como una inhibición enzimática por producto, generada por el agregado de NH_4^+ .

El análisis espectroscópico mostró cambios evidentes en la composición de los extractos alcalinos, con una disminución en el valor del CTD y de la relación E_4/E_6 , lo que sugiere un enriquecimiento en compuestos de alto peso molecular (o alto grado de condensación), debido a la asimilación de compuestos solubles fácilmente asimilables (Lguirati y col., 2005). Comparando con lo observado en ausencia de fertilización, SA, ambos valores fueron superiores sugiriendo que el tratamiento SF podría prolongarse más allá de los 90 días.

La transformación de la materia orgánica inducida por la fertilización también se evidenció en el aumento de la toxicidad sobre la germinación de las semillas. Sin embargo, las raíces desarrolladas mostraron características similares a las del control. Esto indica que el tratamiento SF, al igual que SC y SE, revirtió el efecto encontrado con los extractos de S_0 . Estas observaciones evidencian las transformaciones de la MOS mediadas por la comunidad microbiana, con la liberación de compuestos solubles con diferentes efectos sobre células y tejidos vegetales.

Comparación de los tratamientos

Las estrategias de biorremediación utilizadas para promover la eliminación de hidrocarburos del suelo crónicamente contaminado pudieron ser divididas según el modo de incrementar la actividad biológica del suelo.

- a) A través de la corrección y mantenimiento de la humedad, temperatura y aireación del suelo en los microcosmos SA o por el agregado de NH_4NO_3 , como fertilizante en los microcosmos SF, con la intención de aumentar la actividad de la comunidad microbiana autóctona.
- b) Mediante el agregado de materia orgánica y comunidad asociada (alóctona) con la intención de aumentar la concentración de materia orgánica disponible y densidad de poblaciones microbianas, en los microcosmos SE y SC.

Dependiendo de la modalidad de la estrategia, fue apreciado un comportamiento diferente tanto a nivel de la eliminación de hidrocarburos como de actividad biológica.

Las Figuras IV.34 y IV.35 muestran la concentración de HAs y PAHs remanente en los microcosmos al final de sus respectivos tiempos de tratamiento, en comparación con el valor de concentración determinado en el suelo original, S_0 .

Puede apreciarse que los tratamientos de estimulación microbiana autóctona (SA y SF) no promovieron la eliminación de hidrocarburos, ni modificaron las proporciones relativas de HAs. A diferencia de estos tratamientos, fueron apreciados significativos cambios cuando se aplicaron enmiendas orgánicas (SC y SE) para la estimulación biológica del suelo.

El tratamiento de compostaje del suelo produjo, en una etapa temprana, un incremento de la concentración de HAs. Sin embargo, al cabo de un año la concentración de HAs fue menor al valor del S_0 . Esta dinámica fue acompañada por un cambio de proporciones de las fracciones de HAs debido a la reducción de la fracción liviana e intermedia, con la consecuente acumulación de la fracción pesada. Un comportamiento similar se observó con la estrategia de estimulación con compost, atribuyéndose la mayor concentración de HAs a un proceso de transformación de los materiales del compost, debido a su inmadurez.

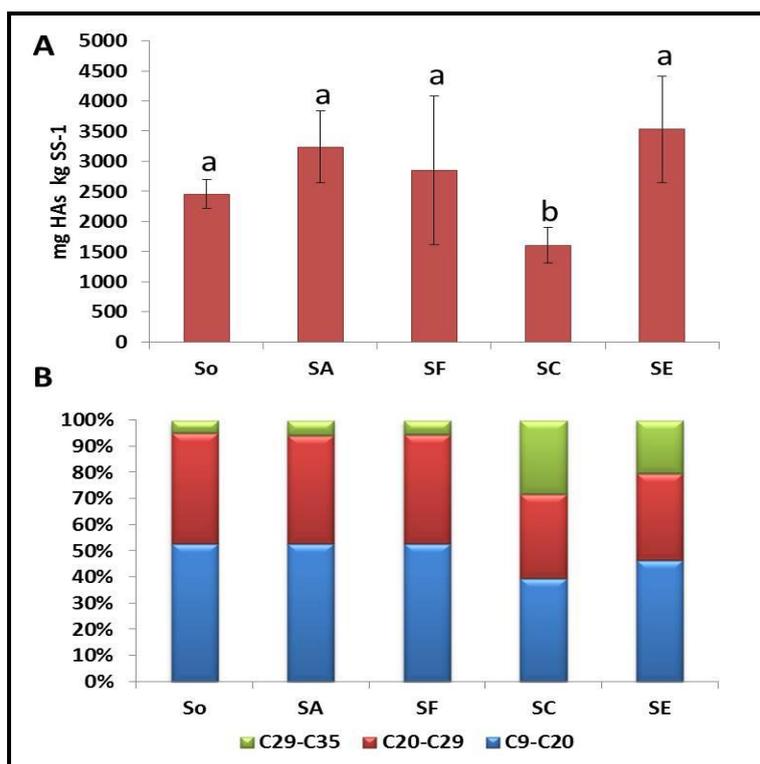


Figura IV.34. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos de los sistemas suelo original (S_0), y microcosmos de suelo acondicionado (SA), suelo fertilizado (SF), suelo estimulado (SE) y del suelo compostado (SC) al finalizar los tratamientos. A. Contenido total de HAs, expresado como mg de compuesto kg_{SS}^{-1} . B. Composición relativa [%].

Únicamente se observó eliminación de PAHs totales en los microcosmos SE, 31 %, reflejada principalmente en compuestos de 3 y 4 anillos aromáticos. El compostaje no produjo eliminación de PAHs, aunque luego de un año, se apreció una tendencia hacia la disminución de la fracción de PAHs de 3 anillos, con la acumulación de la fracción de PAHs de 6 anillos, más recalcitrantes.

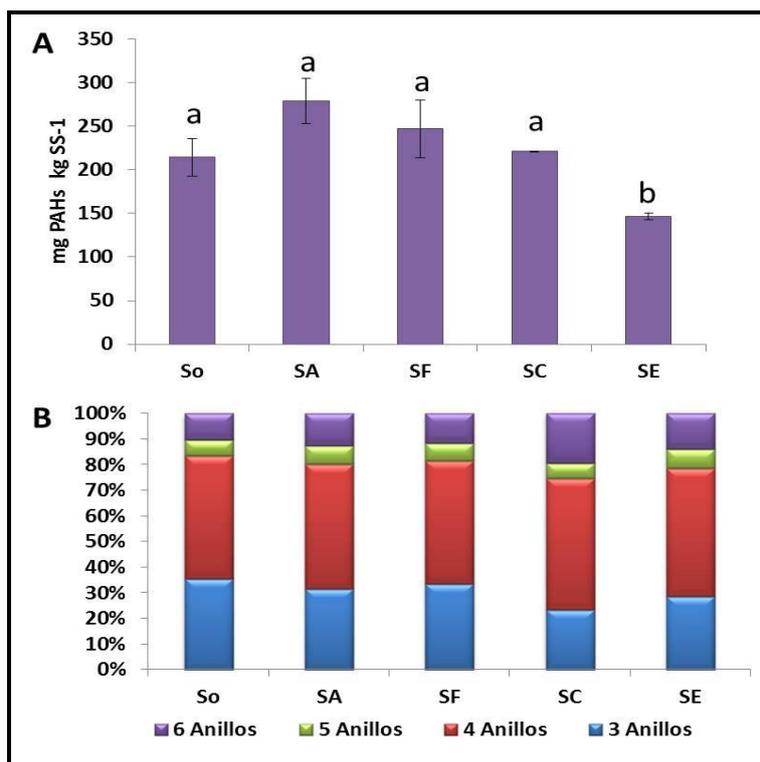


Figura IV.35. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs) de los sistemas suelo original (S_0), y microcosmos de suelo acondicionado (SA), suelo fertilizado (SF), suelo estimulado (SE) y suelo compostado (SC) al finalizar los tratamientos. A. Contenido total de PAHs, expresado como mg de compuesto kg_{SS}^{-1} . B. Composición relativa [%].

Con la intención de hacer un análisis comparativo de los tratamientos, evaluando su efecto en las propiedades de los microcosmos, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP). La Figura IV.36 muestra el gráfico obtenido según los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2), que explican el 82.0 % de la varianza total. Las líneas punteadas en violeta representan la distancia euclídea entre sistemas. La Tabla IV.18 presenta la contribución de cada variable, en PC1 y PC2.

Puede apreciarse una clara separación entre los tratamientos según la modalidad de estimulación aplicada. La proximidad de los tratamientos SA y SF al suelo original S_0 , y su ubicación hacia la izquierda del PC1 sugiere que ambos tratamientos no lograron estimular la actividad específica de la comunidad microbiana autóctona, manteniendo invariantes la concentración y composición relativa de las fracciones de hidrocarburos.

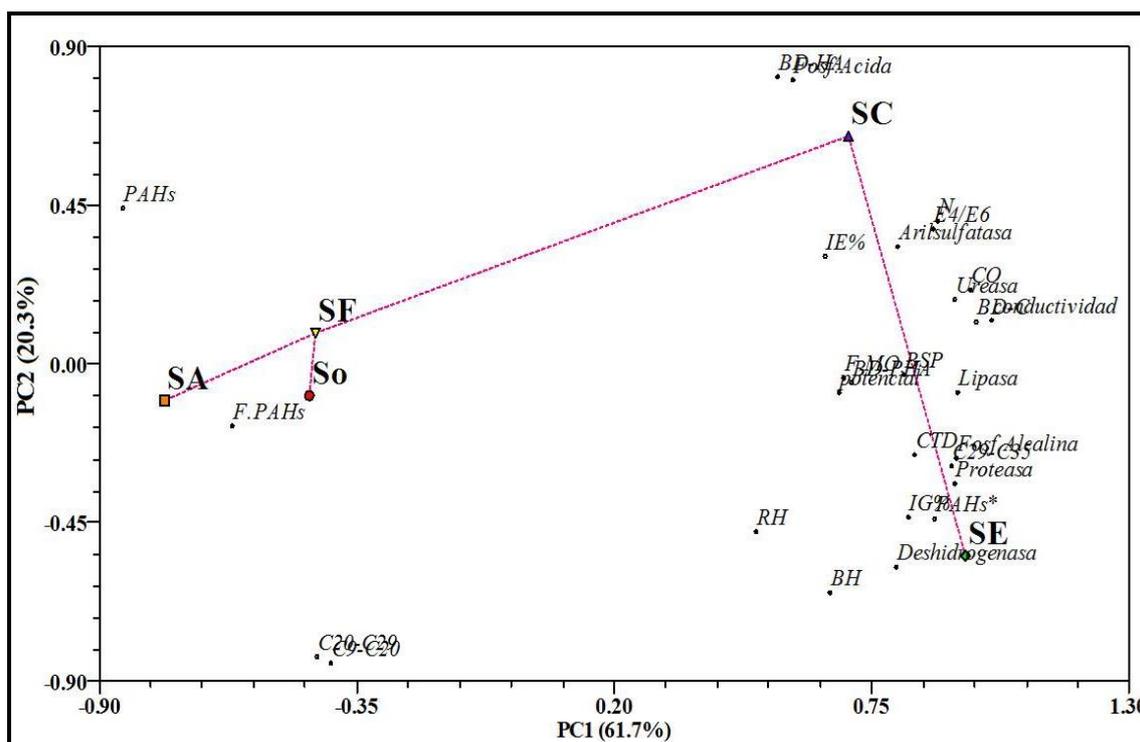


Figura IV.36. Análisis de Componentes Principales (ACP) aplicado a las variables fisicoquímicas y biológicas determinadas en las muestras de suelo original (S_0) y microcosmos SA, SC, SE y SF al finalizar los tratamientos.

Las estrategias de compostaje (SC) y estimulación con compost (SE) incrementaron significativamente la actividad biológica del suelo destacándose la actividad lipasa, deshidrogenasa, ureasa y fosfatasa alcalina. También fue significativo el incremento de las poblaciones de BSP y de BD-C. Así mismo, el aumento de los procesos degradativos de la matriz del suelo, la mayor conductividad y la mayor biodisponibilidad de PAHs y de fuentes de carbono fácilmente asimilables también fueron efectos dominantes en los microcosmos SC y SE, sugiriendo la movilización de los ciclos del C, N y P durante los tratamientos.

El comportamiento de ambos tratamientos pudo ser diferenciado según el PC2. El tratamiento SC resultó más eficiente en la estimulación de la población bacteriana degradadora de hidrocarburos, provocando la reducción de las fracción de HAs livianos e intermedios. La posición relativa de SE en el PC2 evidencia la acumulación de HAs en este microcosmos, comportamiento atribuible a un tiempo de maduración insuficiente. Este menor tiempo dejó mayor proporción de HAs livianos (C9 – C20) e intermedios (C20 – C29).

Tabla IV.18. Detalle de la contribución de cada variable en el Componente Principal 1 (PC1) y en el Componente Principal 2 (PC2), derivada del ACP realizado sobre los distintos tratamientos.

Variable	PC1	PC2
CO	0.96	0.21
N	0.89	0.40
CTD	0.84	-0.26
E ₄ /E ₆	0.88	0.38
Conductividad	1.00	0.13
Potencial redox	0.68	-0.07
F. MO	0.69	-0.04
F. PAHs	-0.61	-0.17
C9 – C20	-0.40	-0.85
C20 – C29	-0.43	-0.83
C29 – C35	0.92	-0.29
PAHs	-0.85	0.44
PAHs* (Biodisponibles)	0.88	-0.44
Deshidrogenasa	0.80	-0.57
Lipasa	0.93	-0.08
Arilsulfatasa	0.81	0.33
Ureasa	0.92	0.18
Proteasa	0.93	-0.34
Fosfatasa alcalina	0.93	-0.27
Fosfatasa acida	0.58	0.81
BH	0.66	-0.65
BSP	0.82	-0.03
RH	0.50	-0.47
BD-PAHs	0.70	-0.05
BD-HAs	0.55	0.82
BD-C	0.97	0.12
IG %	0.83	-0.43
IE %	0.65	0.30

En negrita se resaltan los valores que fueron mayor o igual a 2/3 del valor máximo encontrado en cada componente, lo que indica que la variable contribuye a explicar la varianza del sistema en ese componente.

Así mismo, resultó significativo el incremento de la actividad fosfatasa ácida producido en SC, respecto de SE. El aumento de actividad fosfatasa (ácida y alcalina) sumado a la presencia de la población solubilizadora de P, principalmente en SC, ponen de manifiesto el potencial del suelo compostado para movilizar el fósforo orgánico. Resultados similares han sido observados en estudios de sistemas de labranza que incorporan residuos y fertilizantes orgánicos (Fernández y col., 2008), donde utilizan estas propiedades como indicadores de calidad del suelo por responder rápidamente a los cambios de las condiciones ambientales.

Análisis multivariado de las matrices de excitación emisión de fluorescencia

Con la intención de interpretar los cambios observados en las matrices de excitación emisión de fluorescencia de los extractos alcalinos luego de cada tratamiento se realizó el estudio integrado, mediante el análisis *Parallel Factor* (PARAFAC).

Para tal fin se preparó un extracto del suelo SP, un extracto del compost maduro y una solución saturada de los 16 PAHs (mix) para identificar e interpretar la contribución de cada familia de compuestos, y su naturaleza, en los extractos de los suelos, antes y después de los distintos tratamientos.

Para obtener un resultado satisfactorio, es decir la resolución de los espectros logrando observar un máximo de emisión por especie (familia de compuestos con un mismo comportamiento), se requirieron un mínimo de 11 especies de fluoróforos distintas en el análisis. La Figura IV.37 presenta los espectros de emisión correspondiente a cada familia encontrada.

En la Figura IV.38 presenta la contribución relativa de cada familia en el análisis integral, para los extractos alcalinos de los sistemas estudiados. La referencia de color de las especies se corresponde en ambas figuras (37 y 38). Los fluoróforos que mostraron su máximo de emisión a mayor longitud de onda se corresponden con las SH, mientras que los de menor longitud de onda (< 350 nm) se asocian a los PAHs (Ferretto y col., 2014).

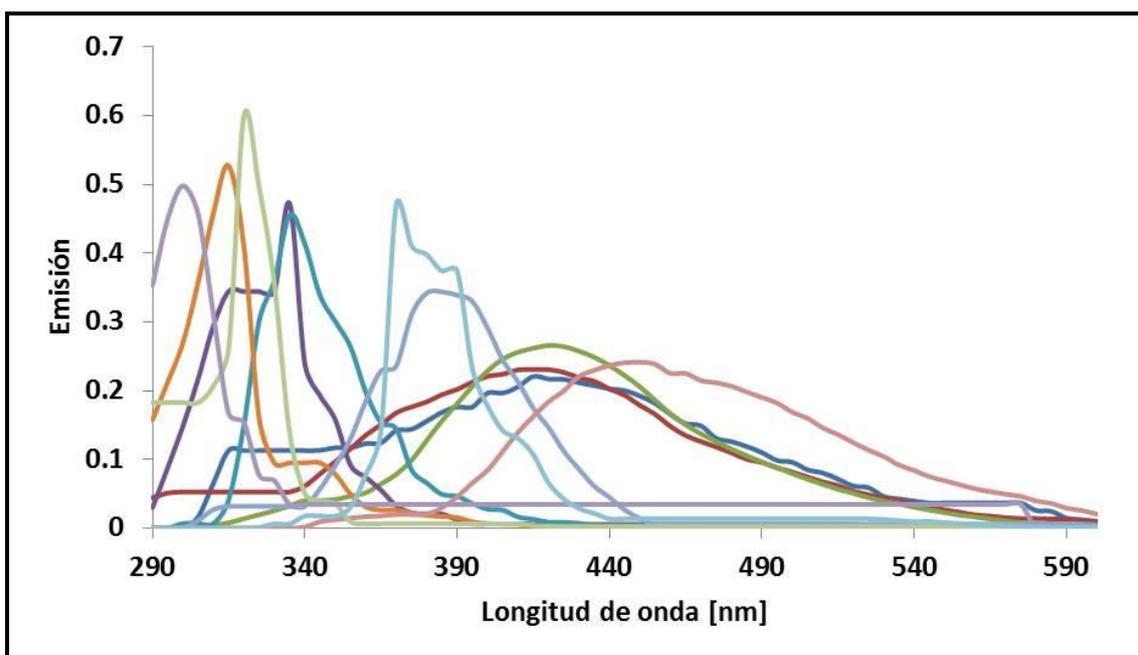


Figura IV.37. Espectros de emisión de las 11 especies fluoróforas encontradas.

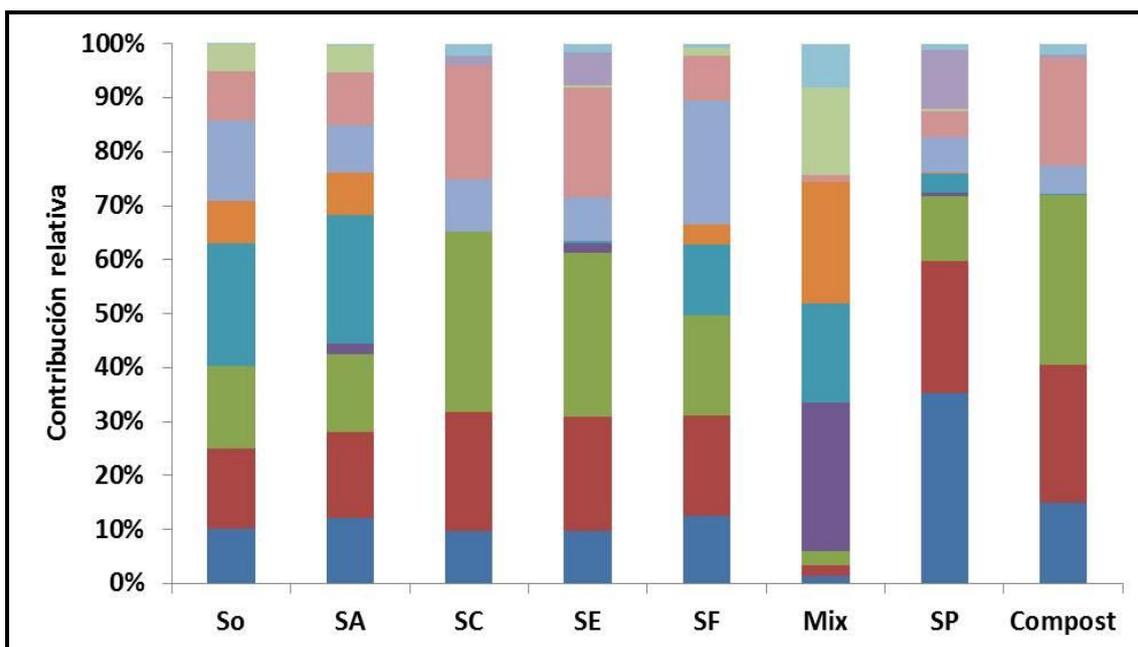


Figura IV.38. Contribución relativa de cada familia de fluoróforos (11 especies) presentes en los extractos de cada microcosmos, solución saturada de PAHs (Mix) y extractos de suelo del predio (SP) y del Compost.

Para la solución saturada de los 16 PAHs (mix) se distinguieron 5 especies como principales contribuyentes. En el extracto de SP se encontraron 6 especies de fluoróforos, 5 de las cuales también se detectaron en el extracto de compost. Se observó que las especies principales para SP y para el compost no se distinguieron en

la mezcla de PAHs (o su contribución fue despreciable). Del mismo modo, no se apreció la contribución de los fluoróforos de PAHs en el extracto de compost. Sin embargo, se encontró una pequeña contribución de estas especies en el extracto de SP, que podría atribuirse a la contaminación difusa. Por lo tanto, se puede afirmar que el análisis realizado resuelve correctamente los 3 controles utilizados (SP, Mix y compost).

En la Figura IV.39.A se muestra la intensidad de fluorescencia de cada extracto, y en la Figura IV.39.B la contribución de la fluorescencia aportada por los PAHs y por la MOS a la fluorescencia total de cada extracto.

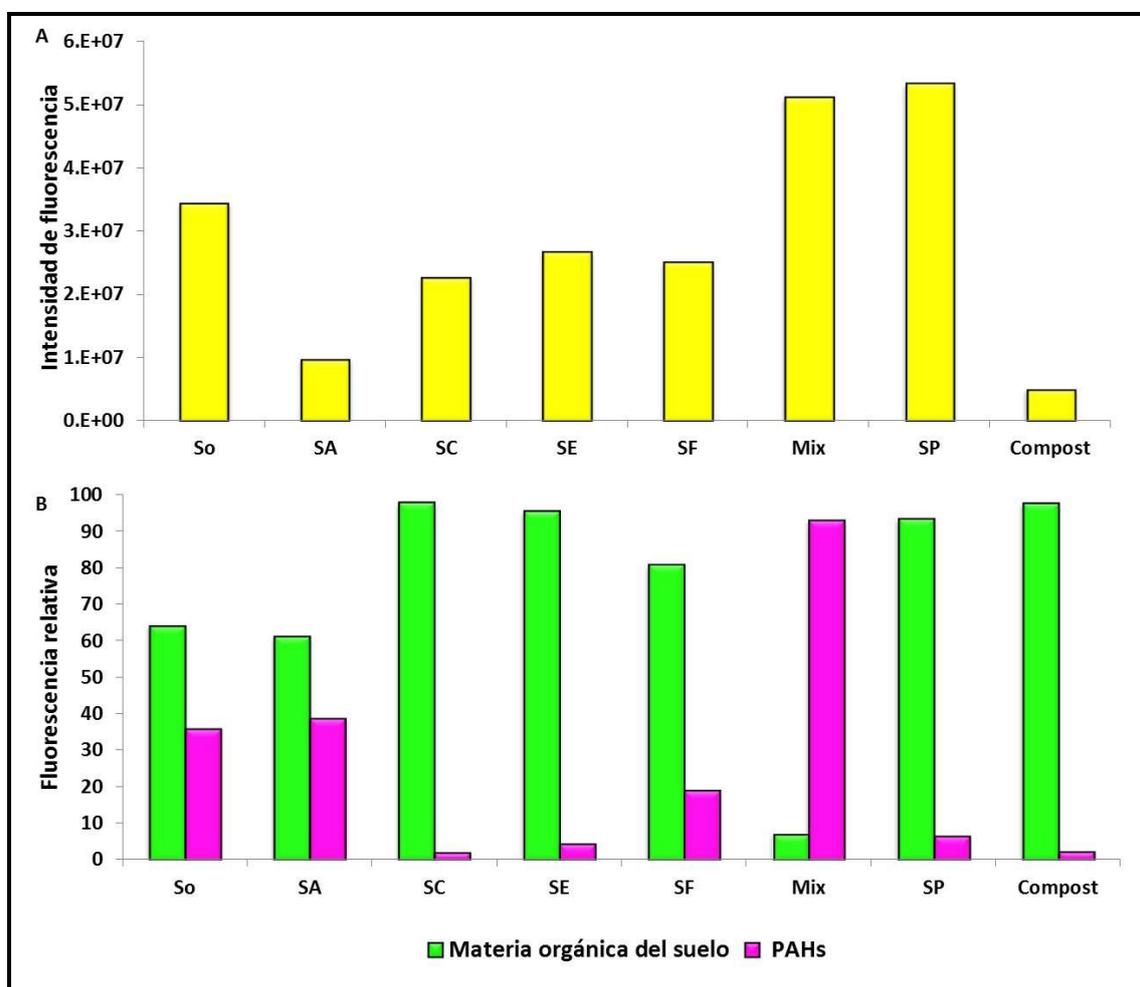


Figura IV.39. A. Fluorescencia total en cada microcosmos. B. Contribución a la fluorescencia total aportada por los PAHs y por la materia orgánica del suelo en los extractos de cada microcosmos.

Para completar el análisis se consideraron los parámetros CTD y las relaciones E_4/E_6 , previamente determinadas en los distintos extractos de suelo luego de los tratamientos, que se presentan en la Tabla IV.19.

Tabla IV.19. Valores de Carbono Total Disuelto (CTD, [mg L⁻¹]) y relación E_4/E_6 obtenida del análisis de los extractos alcalinos de los diferentes microcosmos.

Propiedad	S ₀	SA	SC	SE	SF	Compost	SP
CTD [mgL ⁻¹]	96 ± 3	46.5 ± 0.8	97 ± 1	125.9 ± 0.8	71.4 ± 0.3	363 ± 3	151 ± 1
E_4/E_6	15.0	3.3	32.7	23.1	11.0	4.6	13.7

Del análisis de la Figura IV.39 se estima que la fluorescencia total detectada en S₀ corresponde un 64.1 % al aporte de la materia orgánica, mientras que un 35.9 % a la presencia de PAHs.

El acondicionamiento del suelo (microcosmos SA) fue el tratamiento que produjo el mayor descenso de la fluorescencia total, acorde con el descenso del CTD observado en este microcosmos. No obstante, las contribuciones relativas a la fluorescencia (PAHs y MOS) no fueron diferentes de las observadas para S₀. El descenso de la relación E_4/E_6 sugiere un aumento en el peso molecular y el contenido de anillos aromáticos condensados de las sustancias húmicas (Lguirati y col., 2005). Estos resultados serían consecuencia del metabolismo de sustancias orgánicas solubles fluorescentes de bajo peso molecular durante el tratamiento.

Nuestras observaciones son consistentes con otros estudios realizados sobre suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos, donde se estudió el impacto de la atenuación natural sobre la materia orgánica disuelta. Hanser y col., 2015 atribuyen la composición de la materia orgánica disuelta de suelos crónicos a por lo menos dos causas, i) a la disminución de los compuestos de bajo peso molecular aportados por la contaminación inicial y ii) a la formación de una fracción de compuestos de alto peso molecular, debido a la condensación oxidativa.

La menor fluorescencia encontrada en SF fue correspondida con un menor valor de CTD. Este tratamiento no produjo grandes variaciones en la contribución relativa de cada especie, con respecto a S₀. Sin embargo, la contribución de los PAHs a la fluorescencia total disminuyó (19.2 %) respecto de S₀. Estos resultados, y el

desplazamiento observado en la MEEF correspondiente podría ser indicativo de la asociación parcial de los PAHs a las SH (Scelza y col., 2010), ya que los extractos de estos microcosmos estarían enriquecidos en sustancias de alto peso grado de condensación aromática (baja relación E_4/E_6). Analizando los resultados de modo global, se puede inferir que durante el tratamiento se han metabolizado compuestos solubles de bajo peso molecular con propiedades fluorescentes.

Antízar-Ladislao y col., 2006b estudiaron el compostaje de suelos contaminados con PAHs, empleando distintas proporciones de suelo: enmienda, a distintas temperaturas y contenido de humedad. En sus resultados encuentran el descenso de la materia orgánica total, lo que atribuyen a la mineralización de la misma. A través del estudio de la MEEF durante el compostaje, observaron la presencia de dos regiones de emisión de fluorescencia. La región PP, λ_{ex} 338- λ_{em} 440 nm, atribuida a la emisión de sustancias tipo ácidos húmicos, y la región SP, λ_{ex} 239- λ_{em} 430 nm, correspondiente a la formación de ácidos fúlvicos. En condiciones óptimas de eliminación de PAHs, observaron la migración de la región PP hacia mayores λ_{ex} , lo que atribuyeron a la formación de compuestos de mayor peso molecular. Sin embargo, cuando las condiciones no fueron las óptimas, dicha región PP no migró. Además, correlacionaron la mayor intensidad de fluorescencia de la región PP al mayor grado de condensación de la materia orgánica, es decir a la humificación de la materia orgánica. Marhuenda-Egea y col., 2007 en su estudio de compostaje de residuos de la industria vinícola, describen que a medida que se degrada la materia orgánica, se incrementa la complejidad y el grado de condensación de las SH, conllevando al incremento de dobles enlaces conjugados, lo que produce el aumento de fluorescencia. Estos cambios son producto de la humificación (maduración) del compost. En línea con estos resultados, Morán Vieyra y col., 2009 en su estudio del progreso del compostaje de residuos domiciliarios, también observaron la reducción del carbono orgánico disuelto, y el incremento de la policondensación de la materia orgánica con el transcurso del proceso. Además, describen la disminución de la absorción, por el descenso de la materia orgánica disuelta en función del tiempo de tratamiento.

El compostaje y la estimulación con compost evidenciaron una fluorescencia total menor a la del suelo original.

Discriminando los aportes a la fluorescencia, se observa que los tratamientos SC y SE redujeron marcadamente la fluorescencia atribuida a PAH, predominando (> 90 %) la fluorescencia atribuida a la materia orgánica; mientras que la atribuida a los PAHs fue del 2.2 y 4.5 % respectivamente. Además, estos tratamientos provocaron cambios que se vieron reflejados en un incremento en la abundancia relativa de especies de fluoróforos presentes en SP y en el Compost.

La menor fluorescencia observada en estos microcosmos, con una relación E_4/E_6 mayor a la obtenida en el S_0 , puede ser atribuida a la abundancia relativamente alta de compuestos fácilmente asimilables, de naturaleza no fluorescente, ya que el CTD de estos extractos fue del orden o superior al encontrado en S_0 .

Scelza y col., 2010 al estudiar la asociación de PAHs con la MOS, a través del compostaje de suelos contaminados con fenantreno, observaron que el fenantreno se acumula en las SH, particularmente en las huminas (insolubles en agua), y que este efecto es más marcado al incrementar la proporción suelo: enmienda. En base a las observaciones descritas por Scelza y col., 2010, el alto contenido de materia orgánica aportado por las enmiendas orgánicas podría estar interfiriendo en la extracción de los PAHs, incluso estos podrían estar asociados a las SH (aumentadas en estos tratamientos), lo que permite explicar la ausencia de la Región 2 en las MEEFs de los respectivos extractos.

Adicionalmente, el desplazamiento observado de la Región 1 podría atribuirse al grado de humificación alcanzado por la materia orgánica al finalizar los tratamientos de estimulación con compost y compostaje (Antízar-Ladislao y col., 2006; Morán Vieyra y col., 2009).

Impacto de los tratamientos sobre las comunidades bacterianas del suelo

De manera complementaria a los estudios anteriores, se analizó mediante métodos cultivo independiente la estructura de las comunidades bacterianas generada por los diferentes tratamientos. Para ello se analizó la estructura de la comunidad microbiana del suelo original (S_0), y de los microcosmos SA, SF, SC y SE, mediante la amplificación por PCR del gen 16S rARN con posterior electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) de urea formamida 45-70%.

A partir de ADN provenientes de cada microcosmos se logró la amplificación de las regiones hipervariables V3-V5 de unos 600 pb cada uno. A modo de ejemplo en la Figura IV.40 se muestra la amplificación a partir de dos extracciones de ADN del suelo original. La banda remarcada en rojo corresponde a 500 pb.

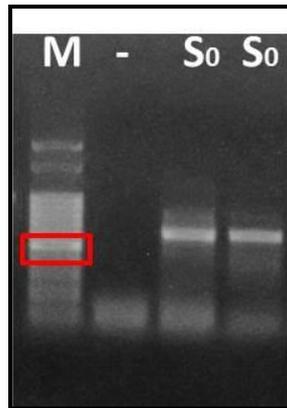


Figura IV.40. Gel de agarosa 1.2 % (p/v). La calle **M** corresponde al marcador de peso molecular. La posición remarcada en rojo corresponde a 500 pb. La calle **-** corresponde al control negativo de la reacción. Las calles **S₀** son réplicas de la amplificación obtenida a partir de dos extracciones independientes de ADN provenientes del suelo original.

Posteriormente, se realizó la DGGE incluyendo en el gel los productos de la amplificación de los diferentes tratamientos.

La Figura IV.41 muestra el dendrograma obtenido a partir del análisis de la imagen.

La primera observación del dendrograma sugiere que las réplicas biológicas se agrupan entre sí, con un alto porcentaje de similitud (> 82.4 %).

Puede apreciarse por el bajo porcentaje de similitud entre tratamientos, que las comunidades establecidas fueron características de cada microcosmos. De acuerdo al perfil de bandas se obtuvieron 2 clústeres, uno formado por las réplicas de los

microcosmos SA mientras que en el otro clúster encontramos el suelo original y todos los tratamientos que involucran nutrientes (32.5 %).

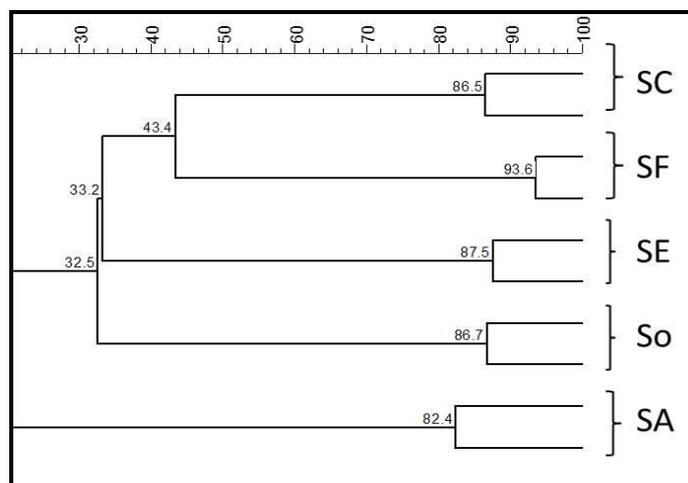


Figura IV.41. Dendrograma basado en el perfil de bandas obtenido mediante DGGE de la muestra S_0 , y los microcosmos SA, SF, SC y SE. El UPGMA se construyó a partir de la matriz de distancia calculada mediante el coeficiente de Jaccard.

Todos los tratamientos provocaron cambios estructurales a nivel de la comunidad microbiana no cultivable. El tratamiento de acondicionamiento conllevó a una pérdida de la diversidad, evidenciada por la disminución en el número de bandas, ligando el clúster de SA al clúster representativo de los suelos suplementados en un 29 % de similitud.

Con el fin de profundizar el análisis de las comunidades asociadas al suelo en respuesta a los diferentes tratamientos, en la sección siguiente se analizará la diversidad mediante la pirosecuenciación de las regiones hipervariables del gen 16S rARN.

El análisis fue aplicado a muestras representativas del suelo original (S_0) y de los microcosmos SA, SC y SE. El tratamiento SF no fue incluido en el análisis al no evidenciarse cambios significativos en las poblaciones bacterianas durante el tratamiento ni eliminación de HAs o PAHs.

Se analizaron las regiones hipervariables V3-V5 del gen 16S rARN de la comunidad del suelo original (S_0), y los microcosmos SA, SC y SE.

En total se obtuvieron 20.928 secuencias de calidad, de las cuales 5.984 corresponden a S_0 , 858 a los microcosmos SA, 1.911 a los microcosmos SC y 12.175 a

los microcosmos SE. Las secuencias obtenidas se cargaron en la base de datos del NCBI, Sequence Read Archive (www.ncbi.nlm.nih.gov/sra) bajo el número de acceso SRP068448.

La Tabla IV.20 presenta los resultados del proceso de pirosecuenciación luego de normalizar los resultados utilizando 858 secuencias, que corresponden al menor número de secuencias obtenidas en los microcosmos.

Tabla IV.20. Parámetros de diversidad correspondientes a las comunidades microbianas del suelo original (S_0) y de los microcosmos SA, SC y SE al finalizar los tratamientos. Resultados obtenidos por análisis de las regiones hipervariables V3-V5 del gen 16S rARN.

Microcosmos	OTUs observadas	0D	1D	2D	Cobertura [%]
S_0	230	473	62	43	85
SA	169	236	47	27	91
SC	262	418	66	33	84
SE	306	704	68	37	76

Como se observa en la Tabla IV.20, la mayor riqueza de especies (OTUs observadas y 0D) se encontró en los microcosmos SE, mientras que el compostaje no produjo grandes cambios en la riqueza. No obstante, ambos tratamientos evidenciaron arreglos de comunidades con algunas especies dominantes.

El acondicionamiento del suelo (SA) resultó en una significativa disminución de la riqueza de especies (0D), con respecto a la encontrada en el suelo original, y debido al bajo valor de 1D y 2D obtenido, resultó el tratamiento que condujo a un arreglo de comunidad más desigual, con algunas pocas especies muy dominantes.

El microcosmos SA fue el que mayor cobertura presentó, debido a la baja riqueza, mientras que para el microcosmos SE, donde se observó la mayor riqueza, la cobertura fue la más baja determinada. Estos resultados indican que se fue muestreado al menos un 76 % de la comunidad de cada microcosmos.

La Figura IV.42 muestra las curvas de rarefacción obtenidas para cada microcosmos. En ella se evidencia que las curvas no llegan a la saturación, lo que indica que parte de la comunidad no ha sido estudiada (remanencia de bacterias). El microcosmos SA presentó la menor pendiente, mientras que en SE la pendiente fue la mayor, acorde a los descripto en términos de cobertura %.

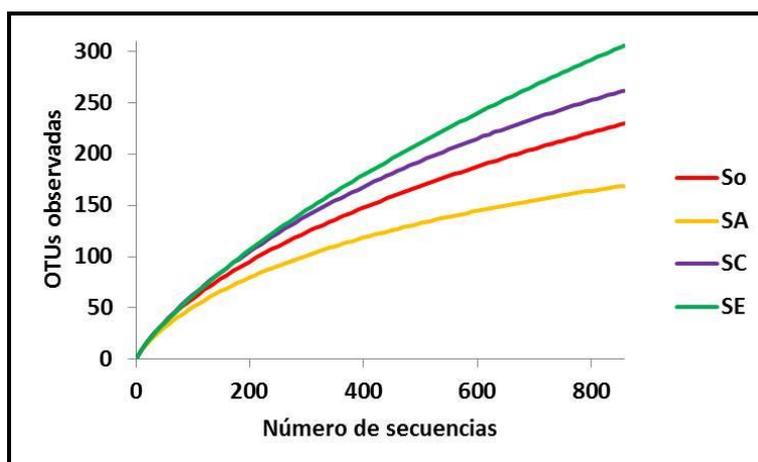


Figura IV.42. Curvas de rarefacción realizadas utilizando el criterio de normalización a la baja. En el eje X se representa el número total de secuencias obtenidas para cada microcosmos, mientras que en el eje Y el número de secuencias observadas (OTUs) en cada uno de ellos.

Con el objetivo de interpretar los cambios estudiados en los tratamientos se incluyeron en el análisis de estructura de las comunidades solo las clases clasificada. Esta consideración redujo el porcentaje de clases identificadas a los siguientes valores en cada tratamiento: 81.2 % en S_0 ; 79.5 % en SA; 63.6 % en SC y 85.2 % en SE.

La figura IV.43 muestra los resultados de frecuencia relativa de las Clases identificadas, cuya abundancia relativa fue mayor o igual al 2 %.

La comunidad establecida en S_0 estuvo representada por miembros de la clase *Actinobacteria* (45 %), *Alphaproteobacteria* (27 %) y *Gammaproteobacteria* (16 %) mayoritariamente.

El filo *Actinobacteria* constituye un gran grupo de bacterias Gram positivas morfológica y fisiológicamente muy diversas, con un alto contenido genómico de GC, las cuales han sido aisladas de muy diversos ambientes naturales (Ensign 1992; Goodfellow y col., 2012). Respecto a su capacidad degradadora de hidrocarburos, han sido descritos consorcios degradadores donde se sugiere que miembros de la clase *Actinobacteria* serían consumidores de metabolitos intermediarios generados por otros degradadores, o bien estarían ocupando nichos de otros degradadores desaparecidos, más que participando directamente de la degradación de hidrocarburos (Bastida y col., 2015).

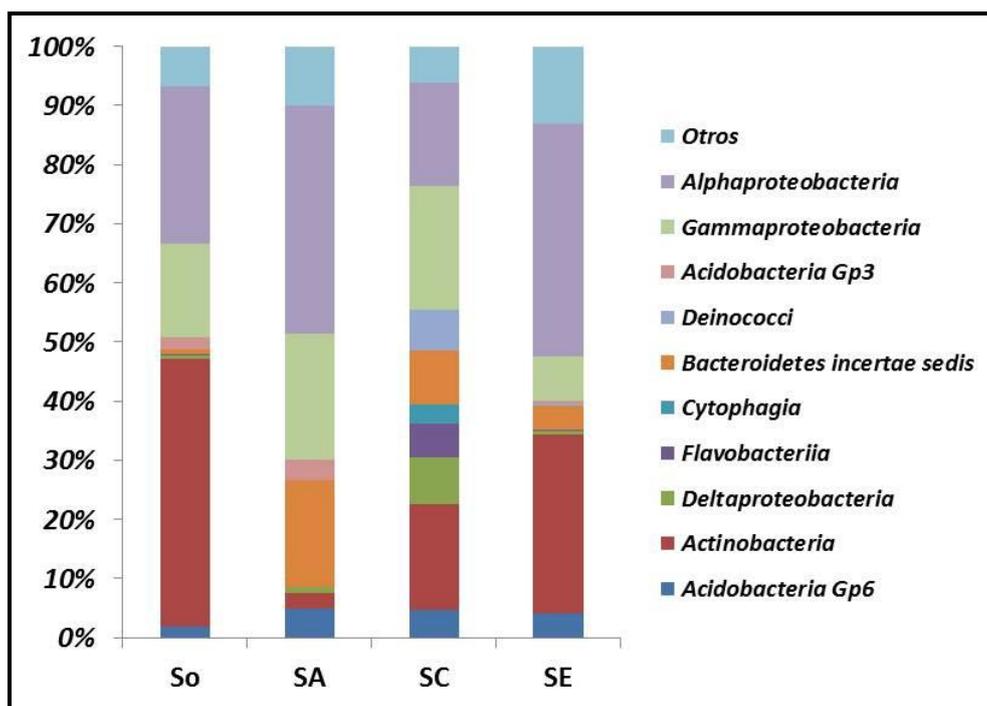


Figura IV.43 Perfiles taxonómicos de las comunidades bacterianas de cada microcosmos. El análisis se realizó a nivel de Clases. Las Clases representadas por < 2 % se agruparon en "Otros".

Miembros del género *Nocardioides*, *Mycobacterium*, *Actinophytocola* y *Pseudonocardia* fueron los representativos de la clase *Actinobacteria* en S_0 . Cabe destacar que el género *Mycobacterium* fue detectado como potencial degradador de PAHs en suelo original S_0 , mediante la clonación de los productos de amplificación de genes dioxigenasa (PAH-RHD α). Junto con *Nocardioides*, han sido descritos como degradadores de PAHs identificando los genes involucrados en la degradación de estos compuestos (Cébron y col., 2008). Así mismo, varios autores han descrito especies de los géneros *Actinophytocola* y *Pseudonocardia* como degradadores aislados de suelos contaminados con PAHs (Cébron y col., 2011; Liao y col., 2015).

En cuanto a la población de Gram negativos, miembros del género *Sphingomonas* (*Alphaproteobacteria*) fueron los predominantes, seguido de miembros del género *Steroidobacter*, como representantes de la clase *Gammaproteobacteria*. *Sphingomonas* ha sido ampliamente estudiada y reconocida como degradador de PAHs (Seo y col., 2009; Ibarrolaza y col., 2011; Madueño y col., 2011). Miembros del género *Steroidobacter* son degradadores de hormonas esteroides (Fahrbach y col., 2008). En una reciente publicación de Tardif y col., 2016, sobre el estudio del microbioma de la planta *Salix purpurea* en suelos contaminados con PAHs, los autores destacan la

abundancia relativa de estos microorganismos con el incremento de la contaminación. Los autores explican este hallazgo sugiriendo que la planta hospedadora favorece la sobrevivencia de estas bacterias endófitas en presencia del tóxico, como así también se vería favorecida por la mayor disponibilidad del PAH dentro del tejido de la planta como resultado de la translocación del contaminante.

Miembros del género *Pseudomonas* fueron detectados en baja proporción (< 2 %) coincidiendo con el hallazgo de genes PAH-RHD α – GN, de cuyo alineamiento fue inferida la presencia del género *Pseudomonas* como potencial degradador de PAHs en S₀.

La diversidad en el microcosmos SA estuvo principalmente representada por las clases *Alphaproteobacteria* (38 %), *Gammaproteobacteria* (21 %) y *Bacteroidetes incertae sedis* (18 %). Miembros del género *Sphingomonas* y *Acinetobacter* resultaron los más representativos de las clases *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, respectivamente.

Las especies del género *Acinetobacter* se caracterizan por su versatilidad metabólica, evidenciada a través de su capacidad de catabolizar un amplio rango de compuestos naturales, implicando su activa participación en el ciclo de la materia (Jung y Park 2015). Han sido descritas especies degradadoras de hidrocarburos, particularmente de compuestos aromáticos (Kostka y col., 2011; Mahjoubi y col., 2013), productoras de surfactantes (Chen y col., 2012; Bao y col., 2014), productoras de lipasa (Khoramnia y col., 2011; H. Wang y col., 2012), entre otras capacidades.

Las bacterias asignadas al filo *Bacteroidetes* constituyen un grupo heterogéneo de especies Gram negativas aeróbicas y anaeróbicas, pertenecientes a las clases *Flavobacteriia*, *Cytophagia*, *Sphingobacteriia* y *Bacteroidetes incertae sedis*. Miembros de estas clases fueron frecuentemente aislados de suelo y vinculados con la degradación aeróbica de moléculas orgánicas complejas, como almidón, proteínas, celulosa y quitina. Debido a que su abundancia relativa en suelo puede incrementar con la adición de fuentes de carbono, han sido caracterizados como copiotróficos (Fierer y col., Eilers y col., 2010).

Las características antes descritas de las clases dominantes observadas en SA sugieren la activa participación de sus miembros en los procesos de transformación de la materia orgánica del suelo S_0 , promovida por la estimulación a través del incremento en la humedad, aireación y temperatura durante la incubación. Dicha estimulación pudo ser evidenciada en el consumo del CTD de sustancias fluorescentes dejando un residual de mayor complejidad.

Respecto de los tratamientos donde se aplicaron enmiendas orgánicas, las comunidades resultaron más equitativas, estando caracterizada en SC por el predominio de las clases *Actinobacteria* (18 %); *Gammaproteobacteria* (21 %); *Alphaproteobacteria* (17 %), *Bacteroidetes incertae sedis* (9 %) y *Deltaproteobacteria* (8 %).

La clase *Actinobacteria*, a diferencia de lo observado en SA, resulto más abundante y estuvo representada por miembros de la familias *Acidimicrobiaceae* y *Streptomycetaceae*. *Ilumatobacter sp.* fue el género representativo de la familia *Acidimicrobiaceae*, único género de la familia que no es asociado a ambientes ácidos.

La familia *Streptomycetaceae* fue representada por el género *Streptomyces*, uno de los más estudiados y diverso en la familia, frecuentemente aislado de suelo y vegetales en descomposición, y productor de una gran variedad de exoenzimas hidrolíticas como celulasas y quitinasas (Glaeser, y Kämpfer 2007). Miembros del género han sido aislados de suelo contaminado con crudo y descritos como degradadores de alcanos mediado por un sistema de captura del hidrocarburo (GBPs) cumpliendo un rol clave en la captura de n-alcanos (Barabás y col., 2001)

Los géneros *Luteimonas*, *Sphingomonas* y *Phaselicystis* fueron los representativos de las clases *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Deltaproteobacterias*, respectivamente. Jones y col., 2014, analizando el efecto de un surfactante sobre la dinámica de comunidades durante biorremediación de un suelo contaminado con PAH, atribuyeron a miembros del género *Luteimonas* la capacidad de co-metabolizar benzo [a] pireno. Otros autores identificaron a estos microorganismos en consorcios bacterianos degradadores de pireno (Bacosa e Inoue 2015).

El género *Phaselicystis*, es el único de la familia *Phaselicystidaceae* (Orden *Myxococcales*) y considerado genero tipo con características fenotípicas particulares. Han sido aislados de diferentes suelos y plantas en descomposición. Presentan un metabolismo aeróbico y un tipo de nutrición bacteriolítica, no celulolítico (García y col., 2009).

El tipo de comunidad observada y descrita en SC sugiere la estimulación de una comunidad metabólicamente diversa, incluyendo especialistas degradadores de alifáticos y PAHs. Si bien la presencia de estos últimos no fue evidenciada en la neta reducción de PAHs, podría ser asociada a la eliminación de PAHs de menor peso molecular como así también al consumo de compuestos fluorescentes atribuido a la transformación de los PAHs de alto peso molecular y de la materia orgánica del suelo.

La comunidad del microcosmos SE se caracterizó por el predominio de las clases *Actinobacteria* (30 %), *Alphaproteobacteria* (39 %) y *Gammaproteobacteria* (7 %). Miembros del género *Arthrobacter* y *Sphingomonas* fueron los representantes de las clases *Actinobacteria* y *Alphaproteobacteria*, respectivamente. *Arthrobacter* ha sido aislado de muy diversos ambientes incluyendo suelos contaminados con hidrocarburos (Hennessee y Li 2010). Su ubicuidad en estos ambientes puede ser atribuida probablemente a la capacidad de producir biosurfactantes (Kosaric 2001), como así también a la capacidad de inducir una absorción activa de PAHs, provocando cambios significativos en la fluidez de su membrana (Kallimanis y col., 2007). La prevalencia de *Arthrobacter* junto a *Sphingomonas* también fue descrita por Festa y col., 2016b, en un consorcio bacteriano degradador de fenantreno.

Mediante el Análisis de Correspondencia, se muestra en la Figura IV.44 la relación entre los microcosmos de suelo en función de la abundancia de clases observadas en las comunidades bacterianas al final de cada tratamiento. El eje 1 permite explicar el 62.4 % de la varianza observada, mientras que el eje 2 el 32 % de la misma.

La abundancia de las clases *Actinobacteria* y *Alphaproteobacteria* permitió asociar a las comunidades de los microcosmos SE con la del suelo original S_0 , y separarlas de la comunidad de SC. Considerando el mayor contenido de CTD en SE, es posible inferir que prolongando el tiempo de incubación la estructura de la comunidad

SE tienda hacia la estructura de comunidad establecida en SC, a expensas de materia orgánica fácilmente asimilable, aun presente en SE. Eventualmente, una adicional eliminación de hidrocarburos podría ser esperada.

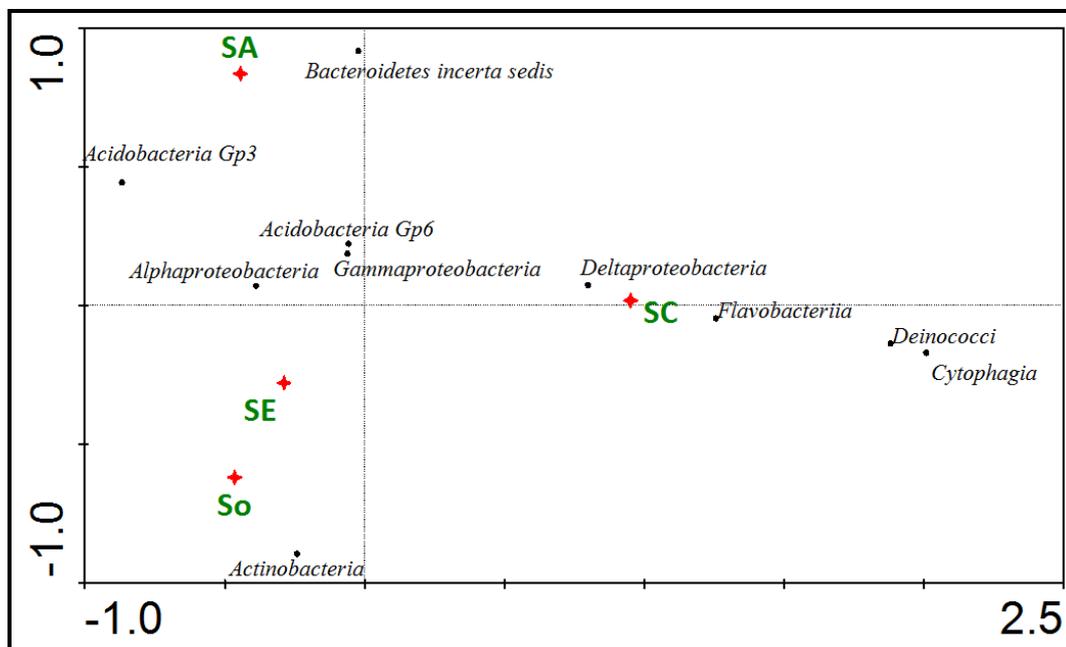


Figura IV.44. Análisis de Correspondencia. En el estudio se incluyeron las Clases bacterianas clasificadas, cuya abundancia relativa fue mayor o igual al 5 % en al menos uno de los microcosmos estudiados, S₀, SA, SC y SE.

Más notoria fue la separación de la comunidad de SA, donde predominaron poblaciones bacterianas Gram negativas y *Bacteroidetes incertae sedis* fue la clase predominante. La estimulación producida en este microcosmos activó poblaciones autóctonas generalistas promoviendo la humidificación de la materia orgánica del suelo.

Conclusiones

Se pueden enunciar las siguientes particularidades de cada intervención realizada sobre el suelo crónicamente contaminado:

- Todas las estrategias de remediación biológica realizadas sobre el suelo crónicamente contaminado resultaron efectivas en la activación de la comunidad microbiana, evidenciada a través de la modificación de la matriz del suelo y de sus poblaciones.
- El acondicionamiento del suelo provocó cambios en la comunidad microbiana del suelo, estimulando poblaciones especialistas (BD-PAHs, BD-C), conllevando a una comunidad menos diversa, con mayor dominancia de especies; alterando la funcionalidad de la comunidad microbiana autóctona. Estos cambios fueron direccionados por el consumo de compuestos solubles de bajo peso molecular, resultando en un suelo con mayor grado de humificación. Considerando la presencia de géneros microbianos potencialmente degradadores, la falta de eliminación de hidrocarburos y la disminución en la fitotoxicidad, es probable que la presencia de que estos microorganismos se relacione con el consumo de intermediarios tóxicos.

El agregado de NH_4NO_3 al suelo permitió la estimulación temprana de las poblaciones degradadoras de PAHs, HAs y celulosa, sugiriendo un déficit de nitrógeno disponible en el suelo original.

Los tratamientos que estimularon el consumo de MOS (endógena) no resultaron efectivos en la eliminación de los hidrocarburos ni en el aumento de la biodisponibilidad por las transformaciones de la matriz del suelo.

- Las estrategias de compostaje incrementaron el contenido de macro y micro nutrientes, provocando un cambio la naturaleza de la MOS soluble, estimulando las poblaciones especialistas y generalistas. La estimulación de las poblaciones se reflejó en el aumento de la funcionalidad, probablemente asociado con la mayor diversidad y equitatividad de especies encontrada en estos microcosmos. Independientemente de la metodología, se observó el incremento de la abundancia de HAs de alto peso molecular.

La densidad de la población fúngica resultó estable frente a las estrategias aplicadas, probablemente debido a la práctica de mezclado periódico de los microcosmos reduciendo su competitividad.

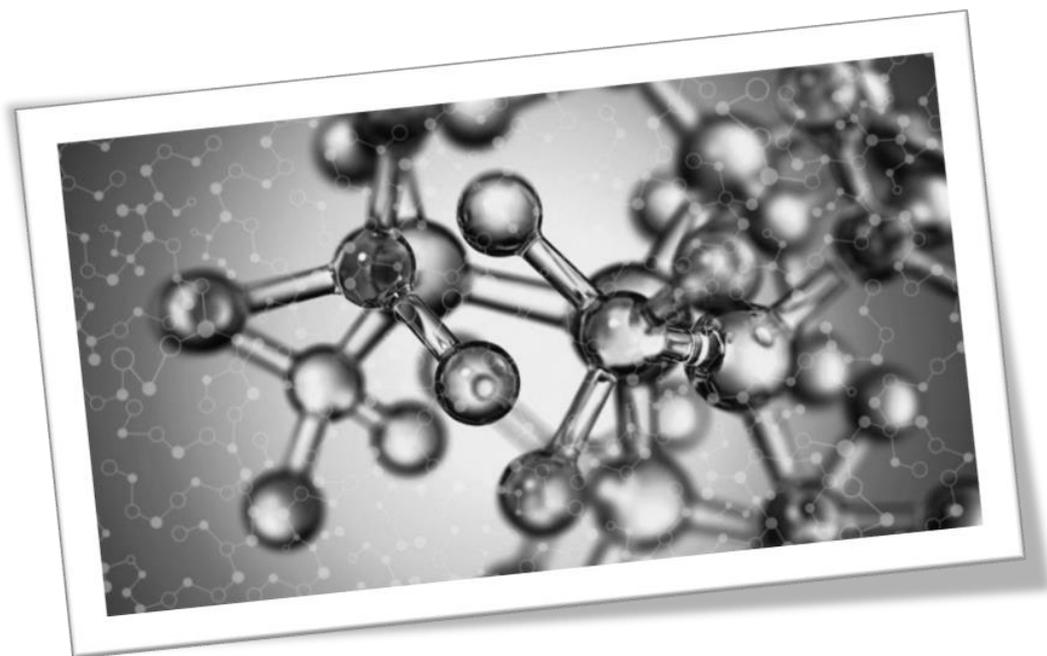
El aumento de biomasa correlacionó con la actividad deshidrogenasa, poniendo en evidencia la mayor actividad alcanzada durante el compostaje.

La transformación de la MOS por el agregado de enmiendas orgánicas incrementa la biodisponibilidad de PAHs, y promueve la eliminación diferencial de los PAHs de bajo peso molecular. Estos efectos serían dependientes de la madurez de la enmienda empleada. Particularmente, el alto grado de transformación de la matriz del suelo durante el compostaje promueve el “*desequestramiento*” de PAHs de alto peso molecular.

La transformación de la MOS (endógena y exógena) promovida por el agregado de enmiendas orgánicas, dio indicios de reducción de la fitotoxicidad.

La eliminación de hidrocarburos se vio afectada negativamente por el consumo preferencial de compuestos solubles de bajo peso molecular fácilmente metabolizables.

***Capítulo V: Tecnologías de remediación
química y combinadas aplicadas al suelo
crónicamente contaminado***



En el presente capítulo se desarrolla la hipótesis

La aplicación de las estrategias de compostaje acopladas al uso de oxidantes químicos sobre el suelo crónicamente contaminado promueve la eliminación del contaminante conduciendo a un aumento de la diversidad microbiana y recuperación de las capacidades funcionales de suelos crónicamente contaminados, sometidos a técnicas de oxidación directa

planteada a través del siguiente objetivo:

Estudiar la eficiencia de la aplicación de persulfato de amonio (PS) y su combinación con diferentes tratamientos biológicos en la eliminación de hidrocarburos de un suelo crónicamente contaminado y en la recuperación de su funcionalidad.

Para tal fin, se aplicaron los siguientes tratamientos:

- a) Oxidación con PS (SOx₀)
- b) Oxidación con PS seguida de un acondicionamiento mediante riego y control de temperatura (SOxA)
- c) Oxidación con PS seguida de Compostaje (SOxC)
- d) Oxidación con PS seguida de la estimulación con compost maduro (SOxE) y una segunda estimulación con compost maduro (SOxDE)

Los tratamientos se analizaron a través de los cambios producidos en:

- a) La concentración de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en el suelo.
- b) La fracción biodisponible de hidrocarburos aromáticos del suelo.
- c) La comunidad microbiana del suelo, mediante métodos dependientes de cultivo e independientes (PCR/DGGE y por pirosecuenciación de las regiones hipervariables V4-V5 del gen 16S rARN).

d) Clonado, secuenciación y cuantificación de genes involucrados en la degradación de PAHs mediante *real time* PCR, con el objetivo de conocer el potencial degradador de la comunidad.

e) La actividad biológica medida a través de la actividad deshidrogenasa.

Se evaluó la calidad final del suelo remediado, respecto de los cambios generados en la matriz del suelo, su funcionalidad y fitotoxicidad.

Remediación química mediante oxidación con Persulfato de amonio

Estudios químicos y físicos

El efecto de la aplicación de PS se evaluó luego de una semana de comenzado el tratamiento oxidativo. La Tabla V.1 muestra de manera comparativa el efecto de la aplicación de persulfato de amonio (PS) en el suelo contaminado (SOx₀). Se observa un descenso significativo de pH, aunque conservando la neutralidad, dada la alcalinidad del suelo original (S₀).

Tabla V.1. Análisis químico del suelo original (S₀) y del microcosmos de suelo luego de la aplicación de persulfato de amonio (SOx₀). Medida de pH, Conductividad Eléctrica (CE, [$\mu\text{S cm}^{-1}$]), Potencial redox (Eh, [mV]), Carbono Orgánico (CO %), Nitrógeno total (N %), Fósforo disponible (P, [mg Kg^{-1}]), azufre de sulfatos (SO₄²⁻, [mg Kg^{-1}]) y hierro extraíble con EDTA (Fe, [mg Kg^{-1}]).

Propiedades	S ₀	SOx ₀
pH	8.8 ± 0.1	7.1 ± 0.1
CE [$\mu\text{S cm}^{-1}$]	634 ± 12	5110 ± 99
Eh [mV]	236 ± 2	291 ± 2
CO [%]	2.2 ± 0.9	2.40 ± 0.06
N [%]	0.2 ± 0.1	0.519 ± 0.003
C:N	11	4.6
P [mg Kg^{-1}]	8.3 ± 0.6	14.5 ± 0.7
C:N:P	0.3:0.03:1	0.16:0.03:1
SO ₄ ²⁻ [mg Kg^{-1}]	97 ± 6	8407 ± 16
Fe [mg Kg^{-1}]	12.6 ± 0.3	54 ± 2

Luego de la oxidación, fue registrado un incremento en la concentración de N y SO₄²⁻, siendo este último de aproximadamente 86 veces el valor determinado en el suelo S₀. También se observó un aumento de la concentración de P, de la

conductividad eléctrica, del potencial redox y del hierro disponible (extraíble con EDTA).

Luego de una semana de aplicada la primera dosis de PS se determinó 2.65 % residual del agente oxidante y luego de un mes, no se detectó PS en el suelo.

La Tabla V.2 y la Figura V.1 describen el contenido de HAs en los microcosmos S_0 y SOx_0 . No se observó eliminación química de HAs ni cambios en la composición relativa de éstos, con respecto a S_0 .

Tabla V.2. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) de los sistemas suelo original (S_0) y suelo luego de la aplicación de persulfato de amonio (SOx_0). Los resultados se expresan como mg de hidrocarburos Kg_{SS}^{-1} y como porcentaje de cada fracción, respecto del total.

Microcosmos	HAs [mg Kg_{SS}^{-1}]	C9 – C20 [%]	C20 – C29 [%]	C29 – C35 [%]
S_0	2456 (a)	52.9	42.1	5.0
SOx_0	2441 (a)	48.6	43.5	7.9

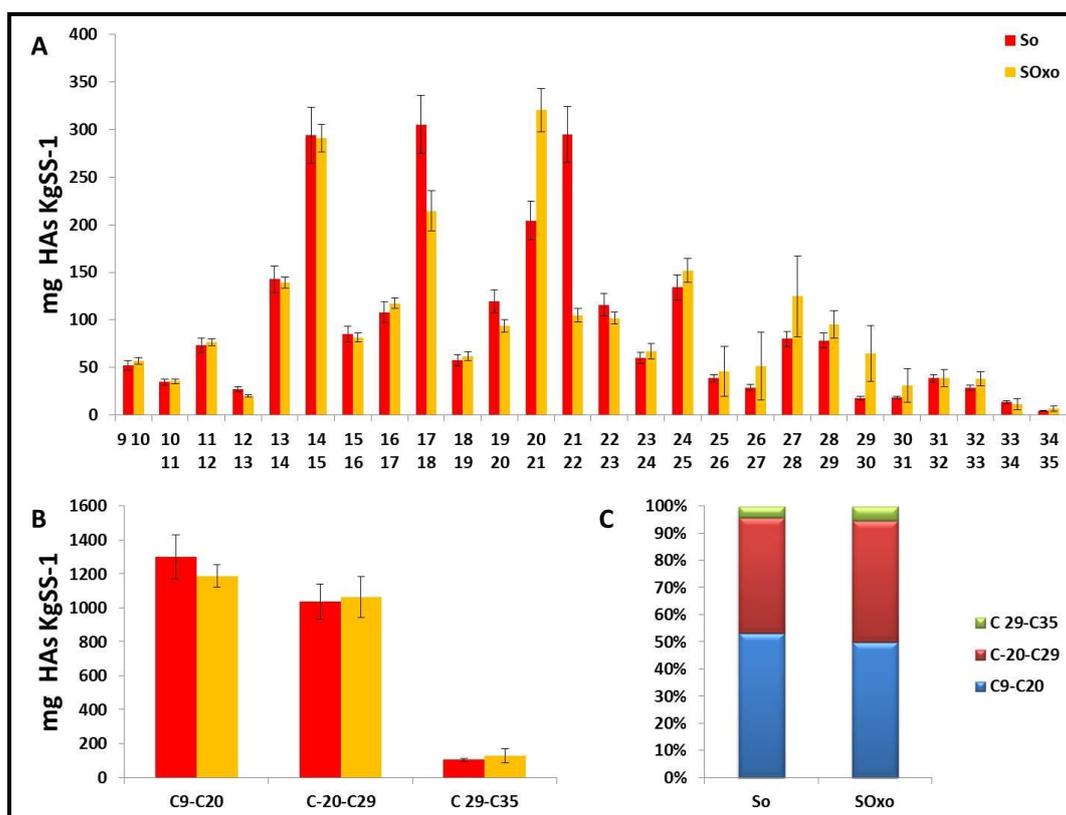


Figura V.1. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) de los sistemas suelo original (S_0) y suelo luego de la aplicación de PS (SOx_0). A. Detalle de cada fracción de HAs, expresado como mg de compuesto Kg_{SS}^{-1} . B. Contenido de HAs según el número de átomos de carbono. C. Composición relativa [%]. Los valores numéricos se presentan en la Tabla V.2.

La Tabla V.3 y la Figura V.2 describen lo observado en la concentración de PAHs. Se determinó una eliminación de PAHs del 30 %.

Tabla V.3. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (PAHs) de los sistemas suelo original (S_0) y suelo luego de la aplicación de persulfato de amonio (SO_{X_0}). Los resultados se expresan como mg hidrocarburos Kg_{SS}^{-1} y como porcentaje de cada fracción, respecto del total.

Microcosmos	PAHs [mg Kg_{SS}^{-1}]	3 anillos [%]	4 anillos [%]	5 anillos [%]	6 anillos [%]
S_0	214 (b)	35.6	47.8	6.2	10.4
SO_{X_0}	151 (a)	27.0	48.8	6.5	17.7

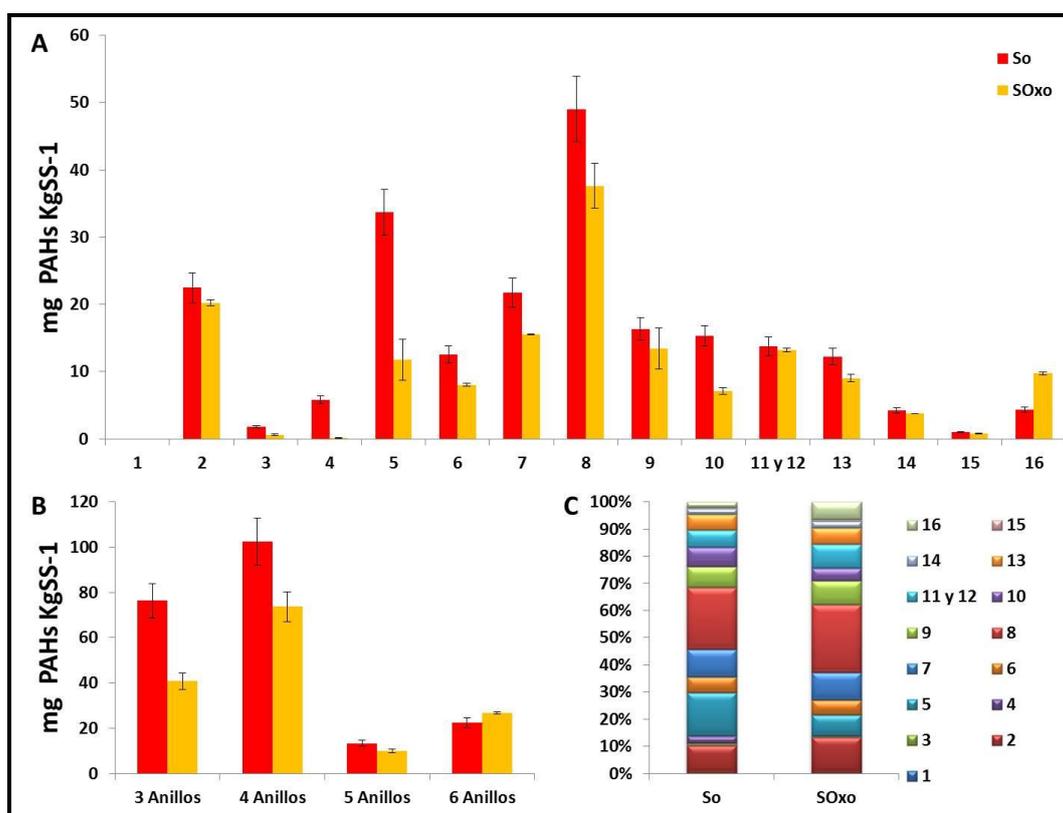


Figura V.2. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs) de los sistemas suelo original (S_0) y suelo luego de la aplicación de PS (SO_{X_0}). **A.** Detalle de cada fracción de PAHs, expresado como mg de compuesto Kg_{SS}^{-1} . **B.** Contenido de PAHs según el número de átomos de carbono. **C.** Composición relativa [%]. Los valores numéricos se presentan en la Tabla V.3.

La Tabla V.4 describe el porcentaje de eliminación respecto de los valores encontrados en S_0 , así como la biodisponibilidad de cada PAHs respecto del total, en los microcosmos SO_{X_0} . Cabe destacar que los mayores valores de eliminación se observaron para fluoreno, acenafteno, fenantreno y criseno. No se observó eliminación significativa de acenaftileno, benzo [a] pireno, benzo [b] fluoranteno /

benzo [k] fluoranteno ni de indeno [1, 2, 3-cd] pireno. Por otro lado, se encontró un incremento significativo en la concentración de benzo [g, h, i] perileno.

Tabla V.4. Porcentaje de eliminación y fracción biodisponible. Detalle de la eliminación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) respecto de los valores de S_0 y porcentaje biodisponible de cada compuesto luego de la aplicación de persulfato de amonio.

Compuesto	Eliminación [%]	Fracción Biodisponible [%]
Naftaleno	0	<i>No detectado</i>
Acenaftileno	10	2.3
Acenafteno	67	<i>No detectado</i>
Fluoreno	98	<i>No detectado</i>
Fenantreno	65	<i>No detectado</i>
Antraceno	36	<i>No detectado</i>
Fluoranteno	29	<i>No detectado</i>
Pireno	23	4
Benzo [a] antraceno	18	6.7
Criseno	53	<i>No detectado</i>
Benzo [b] fluoranteno / Benzo [k] fluoranteno	4	3.3
Benzo [a] pireno	26	<i>No detectado</i>
Indeno [1, 2, 3 - cd] pireno	11	<i>No detectado</i>
Dibenzo [a, h] antraceno	22	<i>No detectado</i>
Benzo [g, h, i] perileno	-124	<i>No detectado</i>

Respecto de la fracción de PAHs biodisponible, se observó un incremento del 21 % en la biodisponibilidad, particularmente marcado en algunos PAHs: benzo [a] antraceno (6.7 %), pireno (4 %), la mezcla benzo [b] fluoranteno / benzo [k] fluoranteno (3.3 %) y el acenaftileno (2.3 %).

Se observó un incremento significativo de los valores de Carbono Total Disuelto (CTD) con respecto del suelo original. El valor medido fue de $226 \pm 2 \text{ mg C L}^{-1}$.

La Figura V.3 presenta los resultados del análisis espectroscópico, de los extractos alcalinos provenientes de SOx_0 (diluidos 1:10). Puede apreciarse un incremento, respecto de S_0 , de la absorción para longitudes de onda por debajo de 400 nm y que conlleva a un valor de la relación E_4/E_6 de 17.7, significativamente mayor al de S_0 .

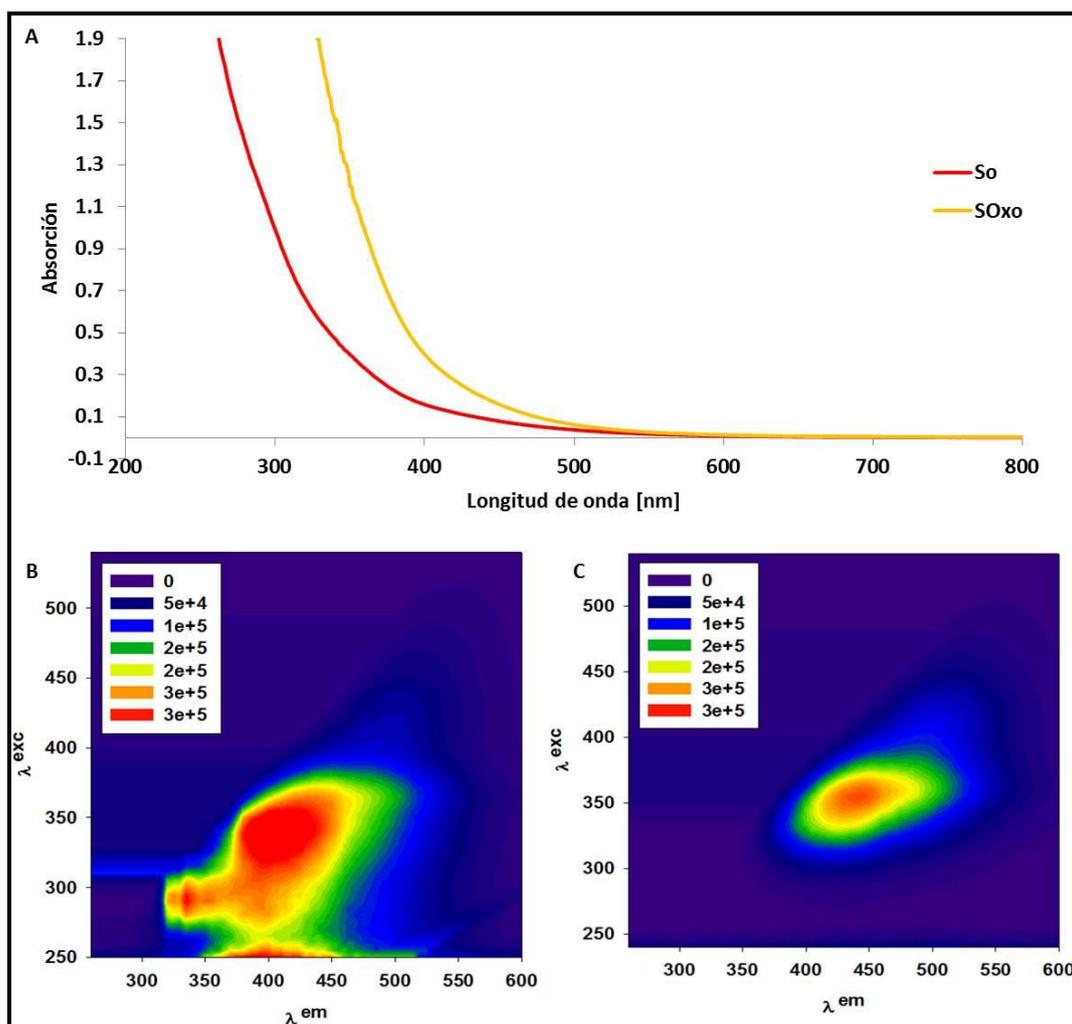


Figura V.3. Análisis de los extractos alcalinos. A. Espectros de absorción de S₀ y SO_{x0}. B. Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de S₀. C. Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de SO_{x0}.

La matriz del extracto de SO_{x0} evidenció solo una región de emisión de fluorescencia, cuyo máximo de emisión se ubicó en la Región 1, λ_{exc} 350 – λ_{em} 450 nm, característica de los ácidos húmicos.

Análisis de las poblaciones microbianas cultivables

Como puede observarse en la Tabla V.5, la aplicación de PS produjo cambios severos en la densidad de las poblaciones cultivables del suelo. La densidad de bacterias heterótrofas (BH), mostró un valor 3 órdenes menor con respecto al valor del suelo original, mientras que la densidad de hongos (RH) evidenció una caída de dos órdenes de magnitud, con respecto al valor de S₀. No se encontraron BSP (menor al límite de detección).

La densidad de BD-PAHs sufrió un descenso significativo, un poco mayor a un orden de magnitud respecto al valor de referencia. De modo opuesto, el agregado de PS produjo un incremento significativo de las densidades de BD-HAs y de BD-C, cuyos valores encontrados fueron dos y tres órdenes superiores a los del suelo original, respectivamente. Este resultado se validó mediante el agregado de un volumen de una solución de PS estéril en cada uno de estos medios. Luego de los 21 días de inoculación, no se observó turbidez en el medio conteniendo hexadecano, ni se observó desintegración del papel.

Tabla V.5. Poblaciones bacterianas determinadas en el suelo original (S_0) y luego de la aplicación de PS (SOx_0).

Población	S_0	SOx_0
Bacterias heterótrofas (BH) [log UFC g_{SS}^{-1}]	7.60 ± 0.08 (a)	4.3 ± 0.3 (b)
Hongos (RH) [log UFC g_{SS}^{-1}]	5.8 ± 0.2 (a)	3.96 ± 0.09 (b)
Bacterias solubilizadoras de P (BSP) [log UFC g_{SS}^{-1}]	3.7 ± 0.8	<i>No detectado</i>
Bacterias degradadoras de HAs (NMP-BD-HAs) [log NMP g_{SS}^{-1}]	1.8 ± 0.2 (b)	3.9 ± 0.1 (a)
Bacterias degradadoras de PAHs (NMP- BD-PAHs) [log NMP g_{SS}^{-1}]	3.4 ± 0.2 (a)	1.886 ± 0.001 (b)
Bacterias degradadoras de celulosa (NMP- BD-C) [log NMP g_{SS}^{-1}]	1.1 ± 0.2 (b)	4.0 ± 0.3 (a)

Caracterización de la funcionalidad del suelo

La Tabla V.6 describe los resultados enzimáticos obtenidos para el microcosmos SOx_0 . En estos microcosmos no se detectó actividad deshidrogenasa, ureasa ni proteasa. No se encontraron diferencias significativas con respecto a S_0 en las actividades arilsulfatasa, fosfatasa ácida, y proteasa. La actividad lipasa mostró un incremento significativo con respecto a los valores previos a la oxidación. La actividad fosfatasa alcalina fue significativamente inferior que la determinada en S_0 .

Tabla V.6. Actividades enzimáticas estudiadas en la caracterización del suelo luego de la aplicación de PS (SO_{x0}) en comparación con las determinadas en el suelo original (S₀). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Actividad	S ₀	SO _{x0}
Deshidrogenasa [$\mu\text{g TPF g}_{\text{SS}}^{-1}$]	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>
Lipasa [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	189 ± 4 (b)	267 ± 6 (a)
Arilsulfatasa [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	33 ± 1 (a)	35 ± 1 (a)
Fosfatasa alcalina [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	175 ± 24 (a)	84 ± 23 (b)
Fosfatasa ácida [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	103 ± 20 (a)	51 ± 6 (a)
Ureasa [$\mu\text{gN-NH}_4\text{g}_{\text{SS}}^{-1}$]	23 ± 6	<i>No detectado</i>
Proteasa [$\text{mg Tyr g}_{\text{SS}}^{-1}$]	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>

Ensayos de fitotoxicidad

La Figura V.4 muestra los resultados obtenidos utilizando los extractos acuosos de SO_{x0}. La aplicación de PS inhibió la germinación de semillas de *Lactuca sativa L.* en un 91 % cuando se utilizó el extracto sin diluir. Este valor es superior al encontrado en S₀. Se observó un incremento creciente de la inhibición de la elongación radicular directamente proporcional a la concentración del extracto acuoso, lo que marca una tendencia a generar raíces de menor longitud.

En la Figura V.5 se presenta el desarrollo del test de producción vegetal, aplicando una mezcla de semillas de césped en suelo del microcosmos luego de la aplicación de PS. La producción vegetal luego de un mes de iniciado el ensayo fue de 4.05 mg_{SECO} (cm²)⁻¹.

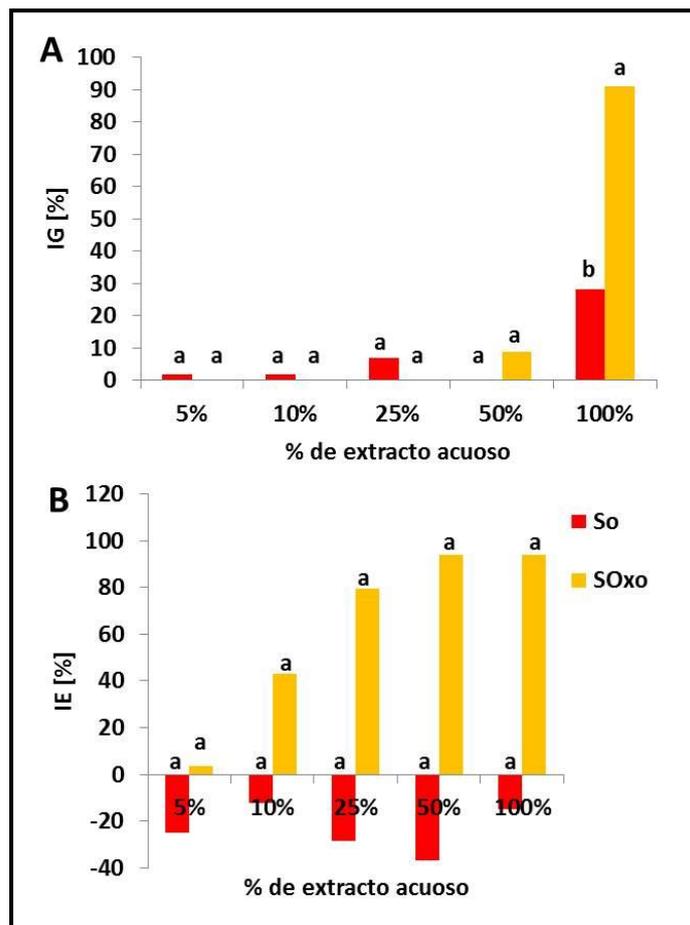


Figura V.4. Ensayos de fitotoxicidad de los extractos acuosos de S_0 y SO_{x0} . **A:** Índice de Inhibición de la germinación (IG %). **B:** Índice de Inhibición en la elongación radicular (IE %). Los ensayos se realizaron utilizando extractos acuosos del suelo original (S_0) y del suelo luego de la aplicación de PS (SO_{x0}).



Figura V.5. Desarrollo del test de germinación de césped de los microcosmos SO_{x0} , realizado durante un mes. **A.** Inicio del ensayo. **B.** y **C.** 21 días de ensayo. **D.** 28 días de ensayo.

Discusión

La aplicación de PS produjo un descenso del pH, consecuencia de las impurezas ácidas que posee la droga comercial (ácido titulable < 0.04 meq/g) y a la hidrólisis del catión NH_4^+ . Este tipo de comportamiento ha sido descrito para sistemas similares (Mora y col., 2014). También el descenso del pH puede atribuirse a la difusión del oxidante y la reacción con la MOS (Sutton y col., 2014a).

Se detectó un incremento significativo en la conductividad eléctrica del microcosmos, promovida por el agregado de electrolitos propios del PS como así también un aumento del potencial redox, atribuido a la oxidación de la MOS. Estos resultados son acordes a los descritos en por otros autores, en los que se utiliza persulfato de sodio como agente oxidante (Sutton y col., 2014a).

Luego de una semana de realizada la aplicación del oxidante, se detectó menos del 3 % del PS. Esto indicaría que la cantidad de hierro presente en S_0 fue suficiente para la activación del PS agregado (Mora y col., 2014).

El tratamiento con PS no produjo cambios en el contenido de CO. Sin embargo, se encontró un incremento en los valores de N, que se correspondería con el agregado de NH_4^+ al sistema. Así mismo se observó un incremento de los valores de P y Fe disponible. Resultados similares fueron asignados a la oxidación de la MOS, con la consecuente liberación de nutrientes inorgánicos (Sirguey y col., 2008; Sutton y col., 2014b). El incremento de P podría atribuirse también a su mayor solubilización, promovida por el cambio de pH.

El tratamiento del suelo con PS no produjo cambios en el contenido de HAs ni en su composición relativa, con respecto a S_0 . En cambio, se evidenció la eliminación significativa (30 %) de PAHs, acorde con la especificidad del agente oxidante de reaccionar preferentemente con dobles enlaces conjugados de los PAHs y/o de la MOS (Osgerby 2006). Cabe destacar que se observó la eliminación prioritaria de PAHs de bajo peso molecular. De modo análogo, Jonsson y col., 2007, luego de tratar suelos con distinto contenido de materia orgánica, por aplicación de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{FeSO}_4$ en sistemas *batch*, describen que los PAHs de bajo peso molecular, relativamente más solubles en agua, son más susceptibles a la oxidación química.

Según lo descrito por distintos autores (Sutton y col., 2014b; Sutton y col., 2014c), el uso de oxidantes químicos provoca la oxidación parcial de la MOS incrementando el valor de CTD, facilitando la solubilización de los PAHs y/o provocando un cambio en la interacción del contaminante con la materia orgánica. El incremento encontrado en la concentración de benzo [*g*, *h*, *i*] perileno, así como el aumento de la biodisponibilidad de PAHs podrían ser consecuencia de estos cambios en la interacción con la MOS parcialmente oxidada.

El valor de CTD fue 2.3 veces superior en el suelo tratado con PS, respecto de S_0 . Este incremento es consecuencia de la oxidación no selectiva de la MOS por el PS (Sirguy y col., 2008; J. Wang y col., 2012; Sutton y col., 2014b).

La relación E_4/E_6 de los extractos alcalinos sugiere que la calidad de la materia orgánica fue de composición similar a la encontrada en S_0 , ya que no se observaron grandes variaciones en la relación.

En términos globales, la aplicación de PS tuvo un efecto negativo sobre las comunidades del suelo, atribuible a la oxidación directa de componentes celulares (Richardson y col., 2011). La mayoría de las poblaciones microbianas estudiadas sufrieron un descenso significativo, de distinta intensidad según la población. Estos resultados evidencian una resistencia diferencial entre las poblaciones al estrés oxidativo, atribuible a la diferente capacidad de adaptarse a la nueva condición ambiental caracterizada por la mayor CE, el mayor contenido de S, N y P, la mayor concentración de PAHs biodisponibles y la presencia de compuestos intermediarios potencialmente tóxicos, producto de la oxidación de los contaminantes y/o MOS (Mora y col., 2014; Sutton y col., 2014c).

Sin embargo, las poblaciones de BD-HAs y BD-C se incrementaron significativamente respecto de S_0 , evidenciando una particular resistencia al estrés oxidativo. El incremento podría atribuirse a la estimulación de estas poblaciones por el aumento de moléculas orgánicas solubles metabolizables, producto de la oxidación de los PAHs y de la MOS, sugiriendo cierto grado de especialización metabólica en las poblaciones dominantes.

Se encontraron cambios asociados a la funcionalidad del suelo, principalmente en las medidas de las actividades ureasa y actividades fosfatasa, ácida y alcalina, que fueron significativamente menores a las correspondientes a S_0 .

Alvear y col., (2007) sugieren que una mayor actividad ureasa en el suelo está asociada a un mayor contenido de biomasa microbiana, coincidiendo con Nannipieri y col., (1979), quienes sugirieron que la actividad de esta enzima se incrementa con la biomasa microbiana, ya que esta es un constituyente intracelular. De acuerdo con los resultados observados en SOx_0 , es posible asociar el descenso de la actividad ureasa al marcado descenso de las poblaciones bacterianas.

Por otro lado, Sutton y col (2014b) observaron la inhibición de la nitrificación debida a la aplicación de un oxidante (H_2O_2). De forma similar se podría inferir que la oxidación por el PS pudo haber reducido a las poblaciones bacterianas oxidantes del NH_4^+ , impidiendo su asimilación y causando la inhibición por producto de la actividad ureasa. En cuanto a la disminución de la actividad fosfatasa (ácida y alcalina) este podría atribuirse al descenso observado en la población de BSP.

Particularmente, se encontró un incremento significativo con respecto a S_0 en la medida de la actividad lipasa. Esta enzima se asocia a la eliminación biológica de los hidrocarburos (Brzeszcz y col., 2016), por lo que este incremento podría estar asociado a la potencialidad de la comunidad resiliente de eliminar los hidrocarburos contaminantes.

La actividad arilsulfatasa no experimentó mayores cambios luego de la oxidación, aun habiéndose determinado una alta concentración de S de sulfato en suelo. Considerando que las determinaciones se realizaron a la semana de la oxidación, es posible inferir que la alta concentración de S determinada correspondería a la especie $S_2O_8^{2-}$ y no SO_4^{2-} .

Respecto a los ensayos de fitotoxicidad, el efecto de la aplicación de PS sobre la germinación fue negativo, ya que se encontró un incremento del IG % con respecto a S_0 cuando se evaluaron los extractos acuosos sin diluir. También se observó un efecto negativo sobre el IE %, directamente proporcional a la concentración del extracto acuoso. El aumento del CTD (probablemente conteniendo intermediarios de la

degradación de PAHs), la mayor biodisponibilidad de PAHs y el incremento de la CE podrían ser los responsables de la toxicidad encontrada en los extractos acuosos (Esechie 1994; Sirguy y col., 2008; Masakorala y col., 2013).

Estrategia de acondicionamiento del suelo luego de la aplicación de PS (SOxA)

Estudios químicos y físicos

La Tabla V.7 muestra las determinaciones realizadas en el suelo oxidado post acondicionamiento durante un año. Se observó un descenso en los valores de pH, N y sulfatos con respecto a los valores de SOx₀, y se observó el incremento significativo del contenido de P.

Tabla V.7. Análisis químico del suelo original (S₀), y de los microcosmos de suelo luego de la aplicación de persulfato de amonio (SOx₀) y suelo acondicionado post aplicación de PS (SOxA) luego de 12 meses de tratamiento. Medida de pH, Conductividad Eléctrica (CE, [$\mu\text{S cm}^{-1}$]), Potencial redox (Eh, [mV]), Carbono Orgánico (CO %), Nitrógeno total (N %), Fósforo disponible (P, [mg Kg^{-1}]) y azufre de sulfatos (SO₄²⁻, [mg Kg^{-1}]).

Propiedades	S ₀	SOx ₀	SOxA
pH	8.8 ± 0.1	7.1 ± 0.1	6.32 ± 0.02
CE [$\mu\text{S cm}^{-1}$]	634 ± 12	5110 ± 99	5880 ± 396
Eh [mV]	236 ± 2	291 ± 2	270.6 ± 0.3
CO [%]	2.2 ± 0.9	2.40 ± 0.06	2.6 ± 0.1
N [%]	0.2 ± 0.1	0.519 ± 0.003	0.31 ± 0.04
C:N	11	4.62	8.4
P [mg Kg^{-1}]	8.3 ± 0.6	14.5 ± 0.7	22.0 ± 0.1
C:N:P	0.3: 0.03:1	0.16:0.03:1	0.12:0.01:1
SO ₄ ²⁻ [mg Kg^{-1}]	97 ± 6	8407 ± 16	4894 ± 15

La Tabla V.8 y la Figura V.6 describen los cambios observados en el contenido de HAs luego de 12 meses de tratamiento. Al final del tratamiento se encontró una eliminación cercana al 66 % en el contenido de HAs totales (p<0.05). Este valor se corresponde con la eliminación del 85 % de la fracción C9 – C20, 45 % de la fracción C20 – C29 y un 41 % de la fracción C29 – C35.

Tabla V.8. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) del suelo original (S₀) y del suelo luego de la aplicación de PS (SOx₀) y al final del tratamiento de acondicionamiento del suelo oxidado (SOxA). Los resultados se expresan como mg de hidrocarburos Kg_{ss}⁻¹ y como porcentaje de cada fracción, respecto del total.

Microcosmos	HAs [$\text{mg Kg}_{\text{ss}}^{-1}$]	C9 – C20 [%]	C20 – C29 [%]	C29 – C35 [%]
S ₀	2456 (a)	52.9	42.1	5.0
SOx ₀	2441 (a)	48.6	43.5	7.9
SOxA	826 (b)	22.6	68.8	8.6

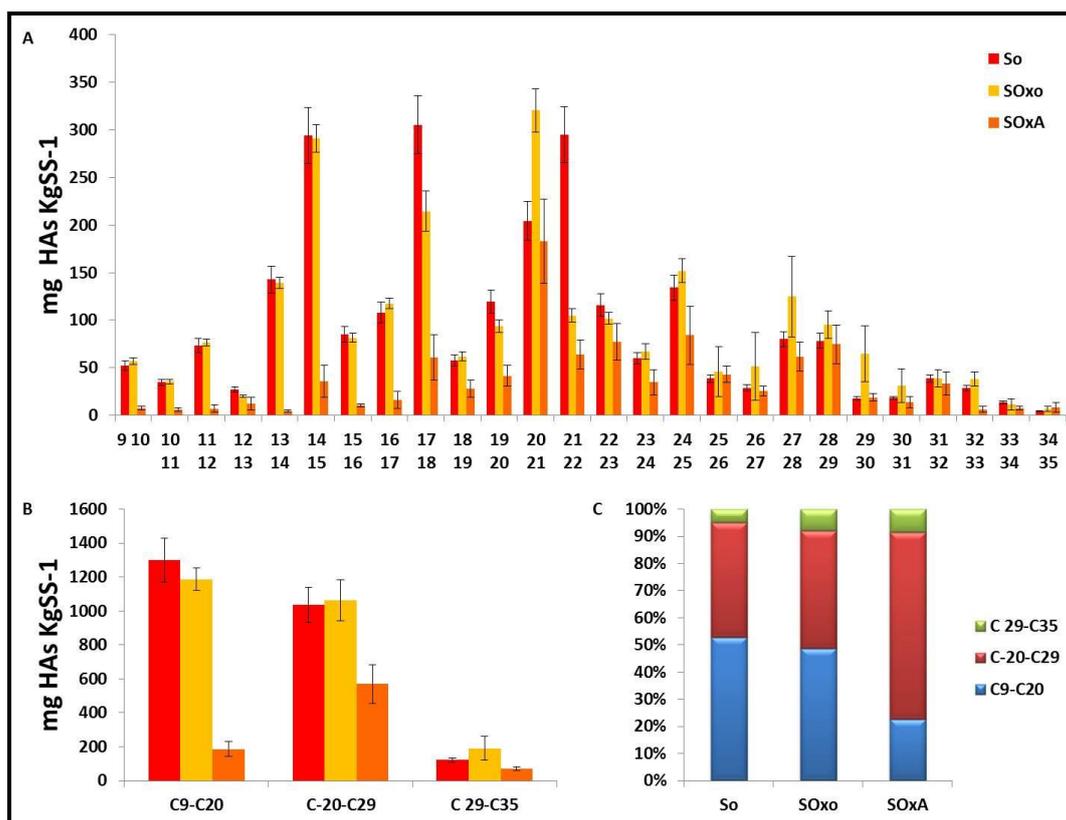


Figura V.6. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) de los sistemas suelo original (S_0), suelo oxidado (SOx_0) y suelo oxidado acondicionado ($SOxA$) al finalizar el tratamiento. **A. Detalle de cada fracción de HAs, expresado como mg de compuesto Kg_{SS}^{-1} . **B.** Contenido de HAs según el número de átomos de carbono. **C.** Composición relativa [%]. Los valores numéricos se presentan en la **Tabla V.8.****

La **Tabla V.9** y la **Figura V.7** presentan el contenido de PAHs al finalizar el tratamiento. Se observó un 47 % de eliminación significativa de PAHs con respecto al suelo inicial, lo que se corresponde con una eliminación del 25 % luego de la aplicación de PS. Como puede verse, la composición relativa según el número de anillos aromáticos luego del tratamiento se modificó sustancialmente. Se observó un descenso en la abundancia de compuestos de 3 anillos aromáticos con la consecuente acumulación de los más pesados.

La **Tabla V.10** detalla la eliminación de cada PAH con respecto al valor determinado en S_0 , y el porcentaje de cada uno determinado en los extractos acuosos provenientes de la resina XAD-2.

Tabla V.9. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (PAHs) del suelo original (S₀), del suelo luego de la aplicación de PS (SOx₀) y final del tratamiento de acondicionamiento del suelo oxidado (SOxA). Los resultados se expresan como mg de hidrocarburos Kg_{SS}⁻¹ y como porcentaje de cada fracción, respecto del total.

Microcosmos	PAHs [mg Kg _{SS} ⁻¹]	3 anillos [%]	4 anillos [%]	5 anillos [%]	6 anillos [%]
S ₀	214 (b)	35.6	47.8	6.2	10.4
SOx ₀	151 (a)	27.0	48.8	6.5	17.7
SOxA	113 (c)	17.7	54.6	9.8	17.9

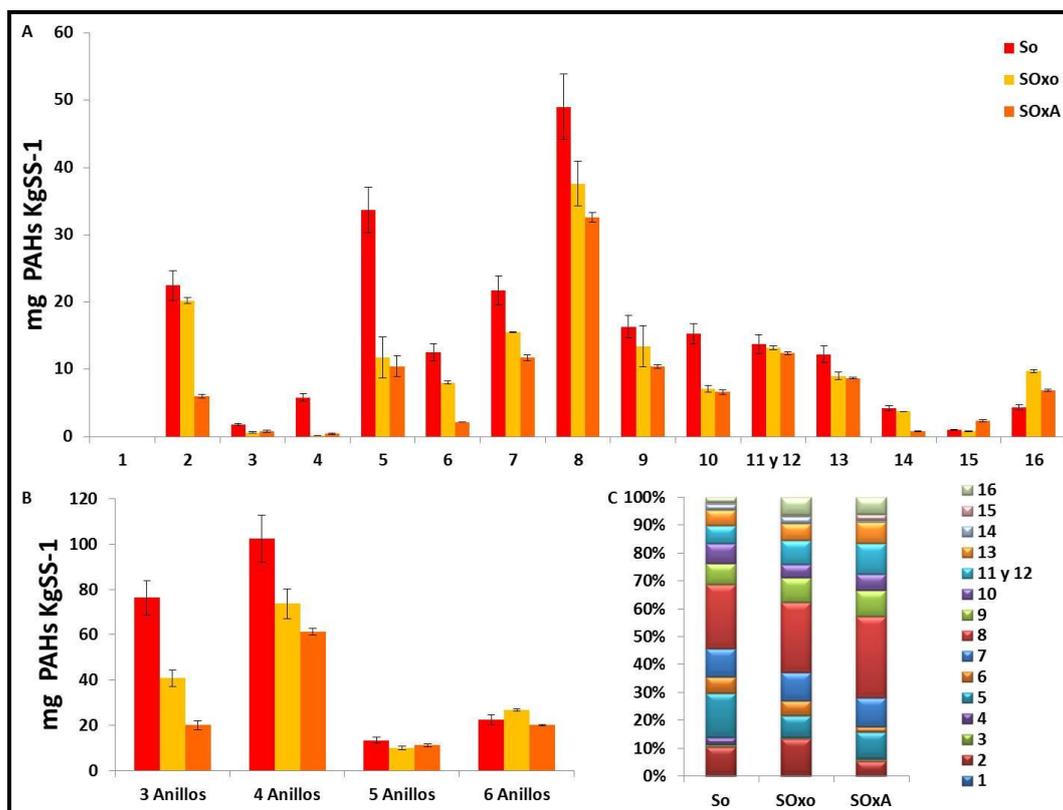


Figura V7. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs) de los sistemas suelo original (S₀), suelo oxidado (SOx₀) y suelo oxidado acondicionado (SOxA). **A.** Detalle de cada fracción de PAHs, expresado como mg de compuesto Kg_{SS}⁻¹. **B.** Contenido de PAHs según el número de átomos de carbono. **C.** Composición relativa [%]. **Los valores numéricos se presentan en la Tabla V.9.**

La mayor eliminación se observó en fluoreno, antraceno, acenaftileno, fenantreno, criseno y acenafteno. No se observaron cambios significativos en el contenido de benzo[*b*] fluoranteno / benzo [*k*] fluoranteno con respecto a S₀. Se encontró un incremento significativo en el contenido de dibenzo [*a, h*] antraceno y benzo [*g, h, i*] perileno.

Tabla V.10. Porcentaje de eliminación y fracción biodisponible. Detalle de la eliminación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) respecto de los valores de S_0 y porcentaje biodisponible de cada compuesto luego de 12 meses de tratamiento de acondicionamiento acoplado a la aplicación de PS.

Compuesto	Eliminación [%]	Fracción biodisponible[%]
Naftaleno	0	0
Acenaftileno	73	0.66
Acenafteno	55	4.59
Fluoreno	92	<i>No detectado</i>
Fenantreno	69	11.34
Antraceno	83	0.55
Fluoranteno	46	2.02
Pireno	33	4.06
Benzo [a] antraceno	36	3.13
Criseno	57	2.95
Benzo [b] fluoranteno / Benzo [k] fluoranteno	10	<i>No detectado</i>
Benzo [a] pireno	29	0.77
Indeno [1, 2, 3 - cd] pireno	81	<i>No detectado</i>
Dibenzo [a, h] antraceno	-131	<i>No detectado</i>
Benzo [g, h, i] perileno	-58	<i>No detectado</i>

Paralelamente, se detectó un significativo aumento de la biodisponibilidad de los PAHs, correspondiente a un 30 %. El fenantreno y el acenafteno (3 anillos) fueron los más abundantes en el extracto, seguidos de fluoranteno, pireno, benzo [a] antraceno y criseno (compuestos de 4 anillos aromáticos).

En el microcosmos SOxA luego de 12 meses se encontró un descenso significativo en la medida del CTD, cuya medida fue de $57 \pm 2 \text{ mg C L}^{-1}$. En la Figura V.8 se muestra análisis espectroscópico del extracto alcalino de SOxA, con la absorción ajustada en 0.01 a 550 nm, previa dilución del extracto 1:3. Se determinó una relación E_4/E_6 de 7.1, siendo significativamente inferior tanto respecto a S_0 , como a SOx_0 .

La MEEF obtenida a partir de los extractos de SOxA presentó solo una región de emisión, centrada en $\lambda_{ex} 325 - \lambda_{em} 425 \text{ nm}$, ubicada en la zona de emisión característica de las sustancias húmicas, la Región 1.

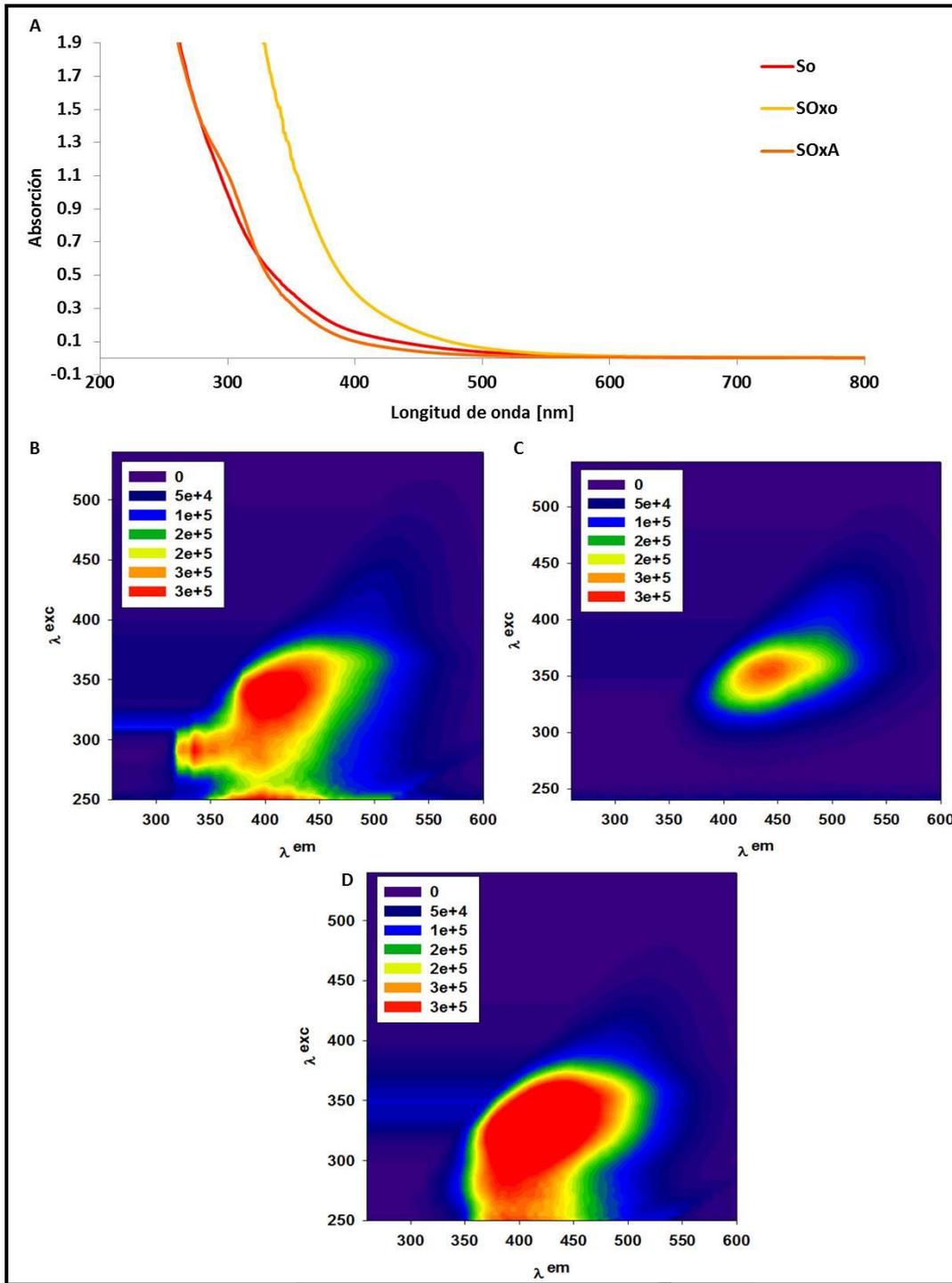


Figura V.8. Análisis de los extractos alcalinos. A. Espectro de absorción de S_0 , SO_{x0} y SO_{xA} . **B.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de S_0 . **C.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de SO_{x0} . **D.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de SO_{xA} .

Análisis de las poblaciones microbianas cultivables

Las Figuras V.9 y V.10 describen la dinámica de las poblaciones cultivables durante el tiempo de ensayo.

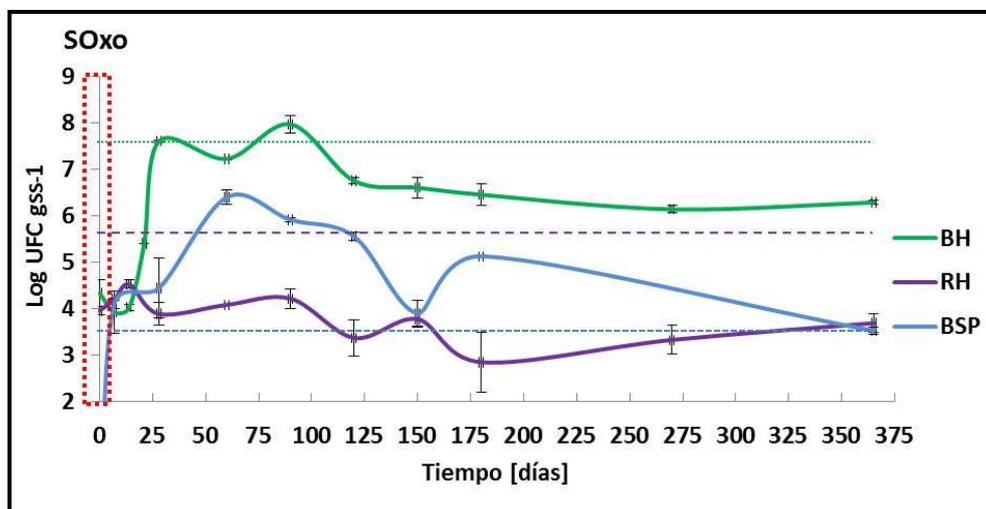


Figura V.9. Dinámica de las poblaciones de bacterias heterótrofas (BH), hongos (RH) y bacterias que solubilizan fósforo (BSP) durante el tratamiento en el microcosmos SOxA. En líneas punteadas se indica el valor de las poblaciones correspondientes a S_0 , mientras que en el recuadro rojo el correspondiente a SO_{x0} .

Luego de 28 días de iniciado el tratamiento se observó la recuperación de la población de BH a valores similares a los de S_0 , la cual había sufrido un descenso de tres órdenes debido a la aplicación de PS. Luego de tres meses de tratamiento, se observó un máximo en la densidad de BH, que se estabilizó a partir del cuarto mes. La densidad de BSP se recuperó en tiempos más cortos. Luego de 7 días los valores fueron superiores a los del suelo original. Esta población mostró una densidad máxima transcurridos 2 meses de tratamiento, momento a partir del cual los valores comenzaron a decrecer, hasta llegar a al final del tratamiento. La densidad de hongos (RH) no mostró variaciones significativas durante el tratamiento, sin lograr recuperar los valores de S_0 luego de la aplicación de PS.

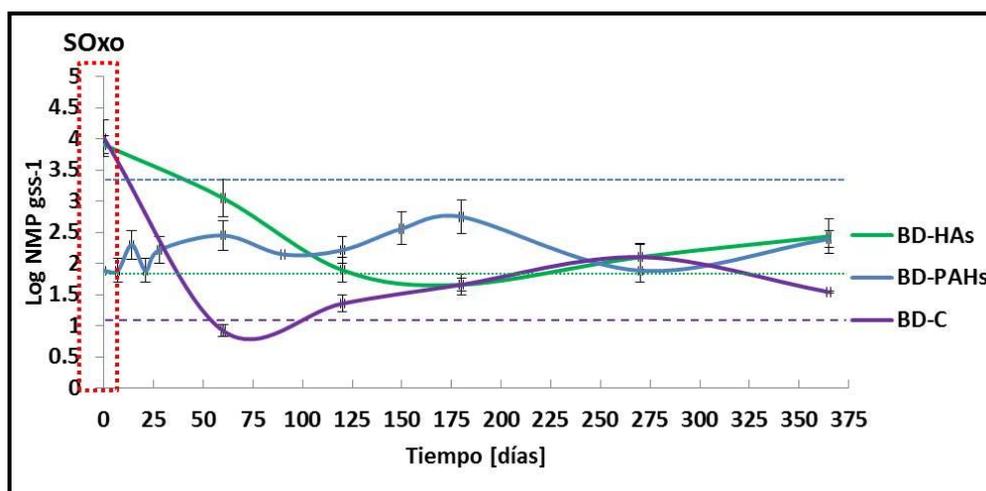


Figura V.10. Dinámica de las poblaciones de bacterias degradadoras de HAs (BD-HAs), degradadoras de PAHs (BD-PAHs) y degradadoras de celulosa (BD-C) durante el tratamiento en el microcosmos SOxA. En líneas punteadas se indica el valor de las poblaciones correspondientes a S_0 , mientras que en el recuadro rojo el correspondiente a SO_{x0} .

Se encontró que la densidad de BD-HAs tuvo un descenso sostenido durante los primeros 4 meses de ensayo, estabilizándose en un valor próximo al de S_0 . Como se observa en la figura, la densidad de BD-PAHs mostró fluctuaciones a lo largo del tratamiento, sin una tendencia definida. Una vez finalizado el tratamiento, esta población no logró recuperar los valores previos a la aplicación de PS. La densidad de BD-C mostró un descenso significativo durante los 2 primeros meses de tratamiento, llegando a un valor mínimo a los 60 días. Este valor fue del orden del determinado en el suelo original. Luego se observó que la población comenzó a recuperarse, alcanzando el valor máximo luego de 9 meses de ensayo.

Caracterización de la funcionalidad del suelo

La Tabla V.11 presenta los resultados de las actividades enzimáticas determinadas al finalizar el tratamiento.

En el microcosmos SOxA no se detectó actividad deshidrogenasa en ningún momento del tratamiento. Las actividades de lipasa y de arilsulfatasa fueron significativamente menores a la medida en S_0 y SO_{x0} . La medida de la actividad fosfatasa alcalina fue significativamente superior a la medida en el suelo luego de la aplicación de PS, recuperando el valor del suelo original. No se detectó actividad

fosfatasa ácida ni proteasa al final del tratamiento. La actividad ureasa luego del tratamiento fue significativamente superior a la medida en el microcosmos S_0 y SOx_0 .

Tabla V.11. Actividades enzimáticas estudiadas en la caracterización del suelo acondicionado luego de la aplicación de PS (SOx_A), al finalizar el tratamiento. Las medidas se realizaron por triplicado.

Actividad	S_0	SOx_0	SOx_A
Deshidrogenasa [$\mu\text{g TPF g}_{\text{SS}}^{-1}$]	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>
Lipasa [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	189 ± 4 (b)	267 ± 6 (a)	114 ± 14 (c)
Arilsulfatasa [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	33 ± 1 (a)	35 ± 1 (a)	<i>No detectado</i>
Fosfatasa alcalina [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	175 ± 24 (a)	84 ± 23 (b)	157 ± 10 (a)
Fosfatasa ácida [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	103 ± 20 (a)	51 ± 6 (b)	<i>No detectado</i>
Ureasa [$\mu\text{gN-NH}_4\text{g}_{\text{SS}}^{-1}$]	23 ± 6 (b)	<i>No detectado</i>	204 ± 37 (a)
Proteasa [$\text{mg Tyr g}_{\text{SS}}^{-1}$]	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>

Ensayos de fitotoxicidad

La Figura V.11 presenta los resultados obtenidos en el test de toxicidad aguda utilizando semillas de *Lactuca sativa L.*

Los extractos acuosos obtenidos de los microcosmos SOx_A evidenciaron un significativo incremento en el IG % con respecto a S_0 . Por otro lado, el IE % mostró un efecto similar al observado en SOx_0 . Estos resultados sugieren que la toxicidad del sistema no logró ser revertida luego del tratamiento de biorremediación del suelo tratado con PS.

En la Figura V.12 se presenta el desarrollo del test de producción vegetal realizado utilizando la mezcla de semillas de césped y suelo del microcosmos SOx_A al finalizar el tiempo de ensayo. La producción vegetal luego de un mes de iniciado el ensayo fue de $4.78 \text{ mg}_{\text{SECO}} (\text{cm}^2)^{-1}$.

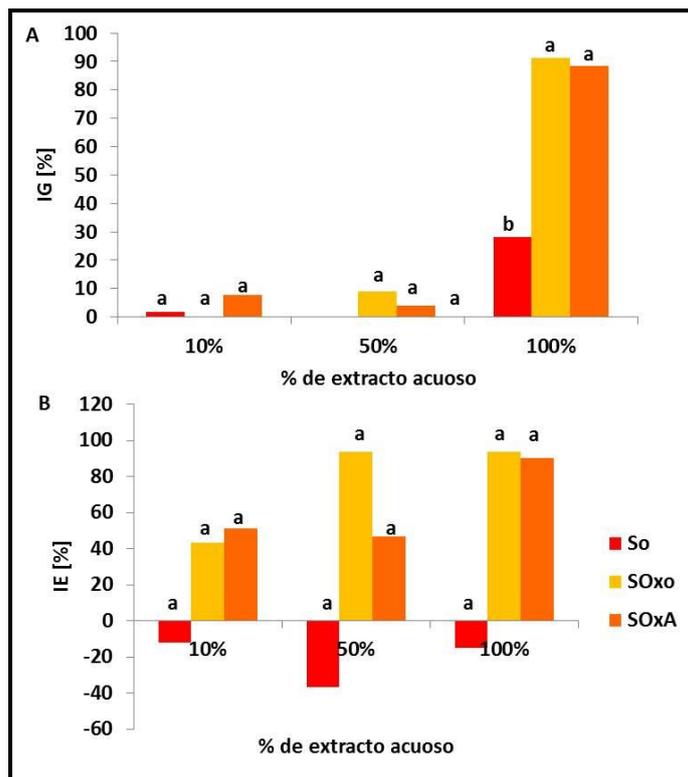


Figura V.11. Ensayos de fitotoxicidad de los extractos acuosos de S_0 , SO_{x0} y SA. A: Índice de Inhibición de la germinación (IG %). B: Índice de Inhibición en la elongación radicular (IE %). Los ensayos se realizaron utilizando extractos acuosos del suelo original (S_0) y de los microcosmos SO_{x0} y SO_{xA} al finalizar el tratamiento.



Figura V.12. Desarrollo del test de germinación de césped de los microcosmos SO_{xA} , luego de 12 meses de tratamiento, realizado durante un mes. A. Inicio del ensayo. B. 14 días de ensayo. C. y D. 21 días de ensayo. E. 28 días de ensayo.

Discusión

Como se mencionó anteriormente, la aplicación de PS redujo el pH, aumentó el potencial redox y la CE. Así mismo, logró disminuir el contenido de PAHs, lo que pudo haber generado compuestos de degradación de estos hidrocarburos, y provocó la oxidación inespecífica de la MOS promoviendo la movilización de CTD, N, Fe y P solubles y aumentando la biodisponibilidad de los PAHs.

El posterior tratamiento de acondicionamiento acentuó el descenso de pH del SOxA, atribuible a la liberación de metabolitos de carácter ácido, debido a la actividad microbiana (Morán Vieyra y col., 2009).

El aumento del contenido de P encontrado en SOxA podría deberse a su mayor solubilización a causa del descenso de pH como así también a la recuperación de la comunidad de BSP. Así mismo se observó el incremento de la actividad fosfatasa alcalina, con un descenso de la actividad fosfatasa ácida, contrariamente a lo observado por Pessacq y col., 2015. Los autores, analizando la capacidad de respuesta a estrés ácido y estrés salino en el mismo suelo (S_0) describen que la medida de la actividad fosfatasa alcalina disminuye con el pH, y es independiente de la CE; mientras que la fosfatasa ácida no se ve afectada por el descenso del pH pero sí es estimulada por la CE alta. Siendo el mismo suelo, la discrepancia en los resultados podría atribuirse a la oxidación inespecífica de la MOS y contaminantes, que moviliza diferentes compuestos dificultando la posibilidad de encontrar un patrón de respuesta común.

Varios autores señalan que, dependiendo del oxidante empleado, la dosis, el modo de administración y las características del suelo; los cambios en la matriz del suelo pueden promover el desarrollo de las poblaciones resistentes al estrés oxidativo (Sutton y col., 2014a y Sutton y col., 2014b; Mora y col., 2014). Los productos de la oxidación aportarían los macro y micro nutrientes evidenciando la resiliencia de estas poblaciones, impactando directamente en la eficiencia global del tratamiento (Sutton y col., 2014c).

Debido a la ausencia de PS luego de 1 mes de realizada la aplicación, la eliminación adicional de hidrocarburos observada en SOxA podría ser atribuida a la actividad biológica de la comunidad microbiana resiliente.

Los descensos encontrados en el contenido de CTD y de N luego del año de tratamiento estarían asociados a la recuperación de la comunidad autóctona resiliente, particularmente de las poblaciones generalistas (BH y BSP) y de las poblaciones especialistas, BD-HAs y BD-C. De acuerdo a la cinética encontrada, se podría sugerir que la población de BH se recuperó conforme adquirió la capacidad de solubilizar P. El descenso observado en la densidad de poblaciones de BD-HAs y de BD-C, durante los primeros 6 y 2 meses respectivamente, podría estar asociado a la competencia con las poblaciones de BH y BSP, que recuperaron su valor original evidenciando su mayor competitividad. No obstante, la densidad poblacional de BD-C y de BD-HAs fue también lentamente recuperada y superó los valores encontrados en S_0 al finalizar el tratamiento. La dinámica de poblaciones observada sería consecuencia de los cambios degradativos producidos sobre la matriz de S_0 , producto del tratamiento combinado, evidenciado en la eliminación de HAs, principalmente de cadenas livianas. De modo análogo, Sutton y col., 2014a describen el enriquecimiento de la población de bacterias degradadoras de HAs durante su tratamiento de biorremediación luego de la aplicación de persulfato de sodio.

Por otro lado, las poblaciones de BD-PAHs y RH no lograron revertir el impacto ocasionado por el estrés oxidativo, sugiriendo que la oxidación química afecta de distinta manera a los miembros de la comunidad microbiana. No obstante, se observó una eliminación adicional de PAHs de bajo peso molecular al finalizar el tratamiento, no relacionada con la fracción biodisponible.

En su trabajo, Mora y col., 2014 describen la recuperación y la estimulación de las poblaciones de BH en suelos contaminados con fenantreno, al aplicar dosis bajas de persulfato de sodio ($< 8.6 \text{ g}_{\text{PS}} / \text{kg}_{\text{SS}}$). En el mismo sentido, Richardson y col., 2011 observaron la recuperación temprana de las poblaciones generalistas, y en tiempos más largos (> 3 meses) de las poblaciones degradadoras, al aplicar una dosis de persulfato de sodio equivalente a la usada en este trabajo, en suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos.

La movilización del carbono se evidenció también en el cambio de la relación E_4/E_6 , que fue menor a la encontrada en S_0 y SOx_0 . Esto sugiere la disminución de la concentración de compuestos solubles de bajo peso molecular, que son más fáciles de degradar, resultando en un extracto enriquecido en compuestos de alto grado de condensación (Morán Vieyra y col., 2009).

La oxidación de la MOS y el consecuente desarrollo microbiano, probablemente hayan inducido el “*desecuestramiento*” y la solubilización de los contaminantes, evidenciados en el incremento del contenido de dibenzo [*a, h*] antraceno y benzo [*g, h, i*] perileno observado al final del tratamiento (Sutton y col., 2014a), con respecto a S_0 . El hecho de que a los 12 meses de tratamiento haya aun PAHs biodisponibles en presencia de compuestos con alto grado de condensación (baja E_4/E_6) sugiere un impedimento en la capacidad degradadora debido a la ausencia de sustratos co-metabólicos, de bajo peso molecular.

En el mismo sentido, la actividad lipasa, asociada a la eliminación de hidrocarburos (Brzeszcz y col., 2016) mostró un descenso significativo respecto de los valores S_0 y SOx_0 sugiriendo el impedimento de la degradación de hidrocarburos.

La recuperación de la actividad ureasa puede atribuirse a la estimulación de las poblaciones bacterianas durante el tratamiento, asociadas al descenso de N observado. La disminución en el contenido de sulfatos sugiere el activo metabolismo reductivo asimilatorio del anión por parte de las poblaciones resilientes, y su posible incorporación o asociación con las SH. No obstante, la concentración residual de sulfatos fue elevada, provocando la inhibición de la actividad arilsulfatasa.

El efecto fitotóxico observado mediante el test de germinación de semillas de *Lactuca sativa L* indica que el tratamiento no logró revertir el efecto toxico residual provocado por la aplicación de PS. Sin embargo, la productividad fue un 18 % superior con respecto a SOx_0 . Teniendo en cuenta los tiempos de incubación de ambos ensayos, 5 días vs. 30 días, los resultados sugieren que, la elevada CE, el incremento de la biodisponibilidad de PAHs, y la solubilización de productos de degradación resultarían inhibitorios para el desarrollo vegetal, provocando por ejemplo, el retardo en la velocidad de germinación.

Compostaje del suelo acoplado a la aplicación de PS (SOxC)

Compostaje en reactores verticales (SCv)

Con el propósito de trabajar con replicas independientes de los microcosmos SC, se decidió emplear reactores verticales de 5 L de capacidad. Este cambio de diseño permitió utilizar menor cantidad de suelo y enmiendas, mejorando el manejo y disposición de los reactores en el laboratorio.

El registro de temperatura de los microcosmos SCv se comportó de manera similar a la determinada en microcosmos SC.

Estudios químicos y físicos

La Tabla V.12 muestra las determinaciones realizadas en el suelo oxidado luego de un año de tratamiento de compostaje. En el suelo oxidado compostado (SOxC) se encontró que los valores de pH fueron una unidad menor respecto al valor de SOx₀. El contenido de CO, N y P se incrementó con respecto a S₀ y a SOx₀ debido a la aporte de la enmienda y agente de volumen. La conductividad eléctrica se incrementó significativamente mientras que el contenido de sulfatos disminuyó con respecto a SOx₀.

Tabla V.12. Análisis químico del suelo original (S₀), y de los microcosmos de suelo luego de la aplicación de persulfato de amonio (SOx₀) y suelo compostado post aplicación de PS (SOxC) al finalizar el tratamiento. Medida de pH, Conductividad Eléctrica (CE, [$\mu\text{S cm}^{-1}$]), Potencial redox (Eh, [mV]), Carbono Orgánico (CO %), Nitrógeno total (N %), Fósforo disponible (P, [mg Kg^{-1}]) y azufre de sulfatos (SO₄²⁻, [mg Kg^{-1}]).

Propiedades	S ₀	SOx ₀	SOxC
pH final	8.8 ± 0.1	7.1 ± 0.1	6.2 ± 0.1
CE [$\mu\text{S cm}^{-1}$]	634 ± 12	5110 ± 99	8515 ± 78
Eh [mV]	236 ± 2	291 ± 2	259 ± 2
CO [%]	2.2 ± 0.9	2.40 ± 0.06	10.9 ± 0.3
N [%]	0.2 ± 0.1	0.519 ± 0.003	1.12 ± 0.06
C:N	11	4.6	9.7
P [mg Kg^{-1}]	8.3 ± 0.6	14.5 ± 0.7	316.0 ± 0.3
C:N:P	0.3:0.03:1	0.16:0.03:1	0.03:0.003:1
SO ₄ ²⁻ [mg Kg^{-1}]	97 ± 6	8407 ± 16	3957 ± 30
Capacidad de retención de agua [%]	27.45	<i>No determinado</i>	50.87

La capacidad de retención de agua al finalizar el tratamiento de compostaje del suelo oxidado se incrementó al 50.87 %.

La Tabla V.13 y la Figura V.13 describen los cambios observados en el contenido de HAs luego de 12 meses de tratamiento. Se observó un descenso de al menos 68 % en el contenido de HAs luego de 12 meses de tratamiento de compostaje.

Tabla V.13. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) de los sistemas suelo original (S₀), y los microcosmos de suelo tratado con PS (SOx₀), suelo tratado con persulfato acoplado a compostaje (SOxC) al finalizar el tratamiento. Se incluyeron los valores correspondientes al compost, tomado como referencia, con fines comparativos.

Microcosmos	HAs [mg Kg _{ss} ⁻¹]	C9 – C20 [%]	C20 – C29 [%]	C29 – C35 [%]
S ₀	2456 (a)	52.9	42.1	5.0
SOx ₀	2441 (a)	48.6	43.5	7.9
SOxC	790 (b)	17.0	55.7	27.3
Compost	2401 (a)	40.9	35.1	24.0

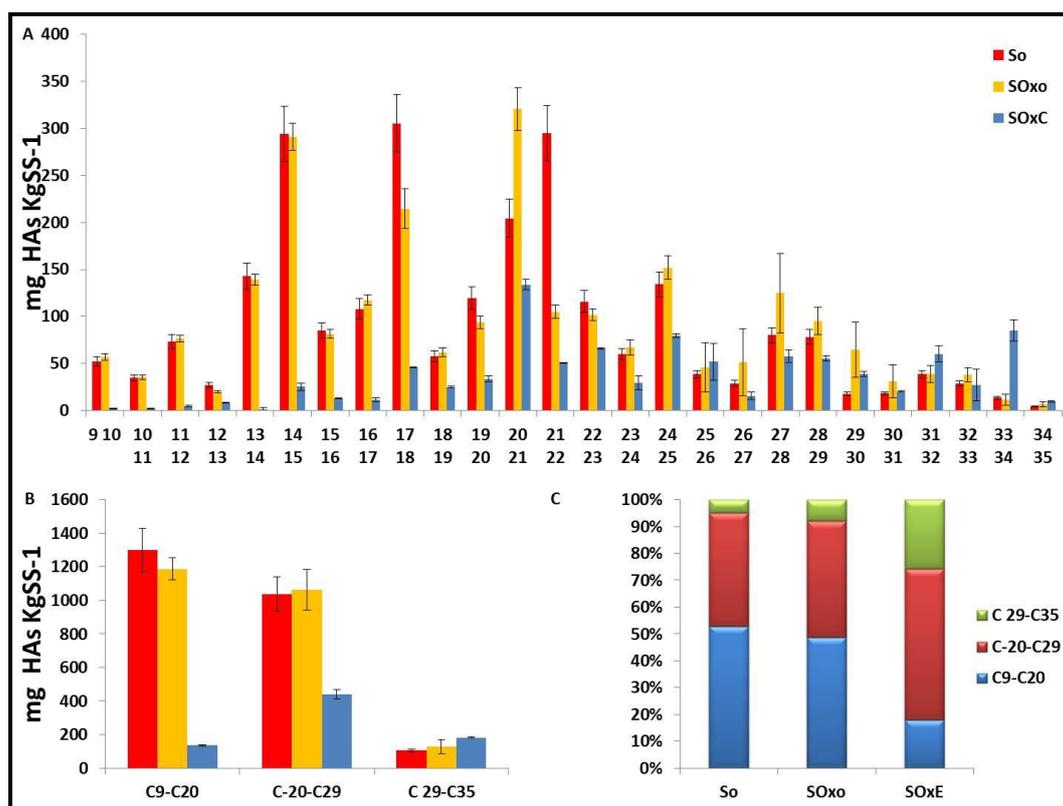


Figura V.13. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) de los sistemas suelo original (S₀), suelo oxidado (SOx₀) y suelo oxidado compostado al finalizar el tratamiento (SOxC). A. Detalle de cada fracción de HAs, expresado como mg de compuesto Kg_{SS}⁻¹. B. Contenido de HAs según el número de átomos de carbono. C. Composición relativa [%]. Los valores numéricos se presentan en la Tabla V.13.

La eliminación se evidenció en el enriquecimiento en la fracción de HAs pesada, que resultó tener una abundancia relativa con respecto al total, similar a la encontrada en el compost. Se encontró un 90 % de eliminación de la fracción liviana y un 57 % en la intermedia, producto del metabolismo microbiano.

La Tabla V.14 y la Figura V.14 presentan el contenido de PAHs al finalizar el tratamiento. Se produjo una disminución en el contenido del PAHs del 53 % respecto de S_0 , equivalente al 34 % respecto de SOx_0 .

Tabla V.14. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (PAHs) del suelo original (S_0), del suelo luego de la aplicación de PS (SOx_0) y final del tratamiento de compostaje ($SOxC$).

Microcosmos	PAHs [mg Kg _{SS} ⁻¹]	3 anillos [%]	4 anillos [%]	5 anillos [%]	6 anillos [%]
S_0	214 (a)	35.6	47.8	6.2	10.4
SOx_0	151 (b)	27.0	48.8	6.5	17.7
$SOxC$	100 (c)	18.1	52.0	11.1	18.8

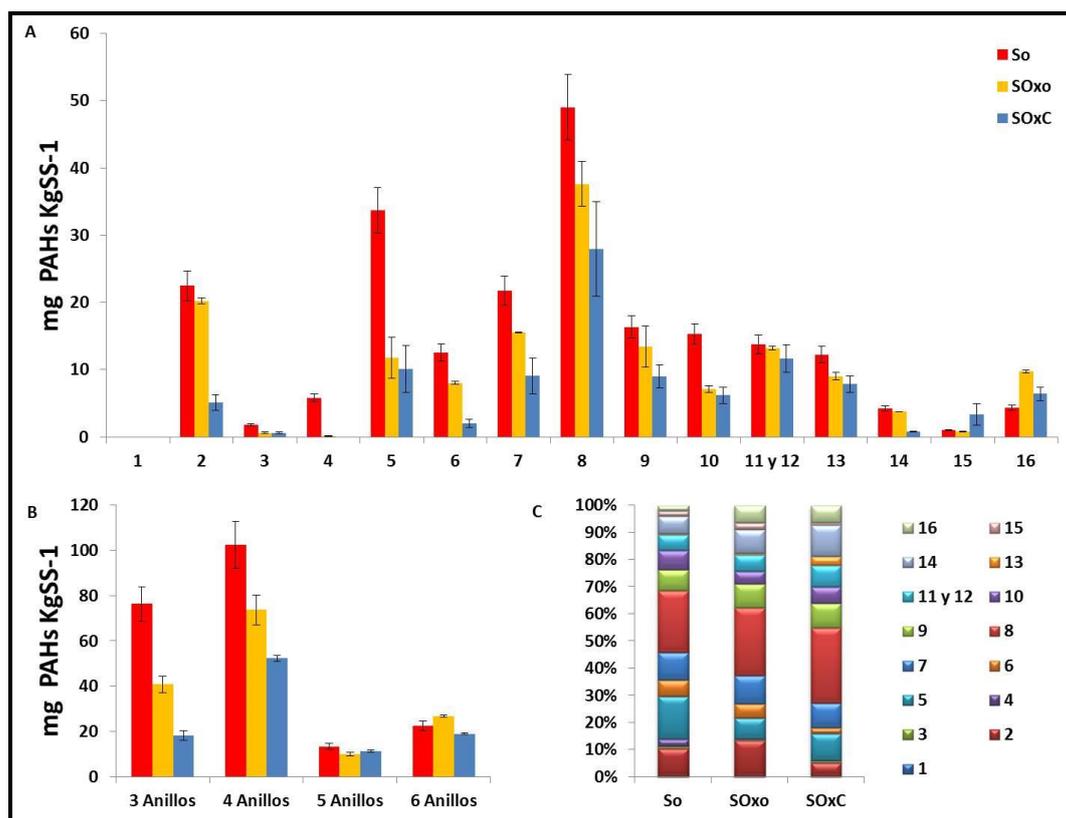


Figura V.14. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs) de los sistemas suelo original (S_0) y suelo oxidado (SOx_0) y suelo oxidado compostado al finalizar el tratamiento ($SOxC$). A. Detalle de cada fracción de PAHs, expresado como mg de compuesto Kg_{SS}⁻¹. B. Contenido de PAHs según el número de átomos de carbono. C. Composición relativa [%]. Los valores numéricos se presentan en la Tabla V.14.

La Tabla V.15 detalla el porcentaje de eliminación de cada PAH con respecto al valor determinado en S_0 y la fracción biodisponible porcentual de cada hidrocarburo con respecto al total.

Tabla V.15. Porcentaje de eliminación y fracción biodisponible. Detalle de la eliminación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) respecto de los valores de S_0 y porcentaje biodisponible de cada compuesto luego de 12 meses compostaje acoplado a la aplicación de PS.

Compuesto	Eliminación [%]	Fracción biodisponible [%]
Naftaleno	0	0
Acenaftileno	77	0.24
Acenafteno	65	3.16
Fluoreno	100	<i>No detectado</i>
Fenantreno	70	22.8
Antraceno	84	0.5
Fluoranteno	58	2.94
Pireno	43	4.97
Benzo [<i>a</i>] antraceno	45	3.48
Criseno	60	10.64
Benzo [<i>b</i>] fluoranteno / Benzo [<i>k</i>] fluoranteno	15	3.20
Benzo [<i>a</i>] pireno	36	0.46
Indeno [1, 2, 3 - <i>cd</i>] pireno	80	<i>No detectado</i>
Dibenzo [<i>a</i> , <i>h</i>] antraceno	-200	<i>No detectado</i>
Benzo [<i>g</i> , <i>h</i> , <i>i</i>] perileno	-48	<i>No detectado</i>

Como puede observarse, se encontró la mayor eliminación en fluoreno, antraceno, indeno [1, 2, 3 -*cd*] pireno, acenaftileno, acenafteno, fenantreno, criseno y fluoranteno. También se encontró incremento en el contenido de dibenzo [*a*, *h*] antraceno y benzo [*g*, *h*, *i*] perileno, con respecto a S_0 , resultando en un enriquecimiento de la fracción de PAHs de alto peso molecular.

El compostaje del suelo oxidado incrementó significativamente ($p < 0.05$) la biodisponibilidad del contaminante, ya que luego de 12 meses de tratamiento la medida fue de 56.57 %, y como puede apreciarse, fenantreno y el criseno son los compuestos que mayor biodisponibilidad presentaron.

La medida del CTD del microcosmos SO_xC al final del tratamiento fue de 62.22 ± 0.05 mg C L⁻¹. Este valor es significativamente menor a los encontrados en S_0 y SO_{x0} .

En la Figura V.15 se muestra análisis espectroscópico del extracto alcalino de SOxC, con la absorción ajustada en 0.01 a 550 nm.

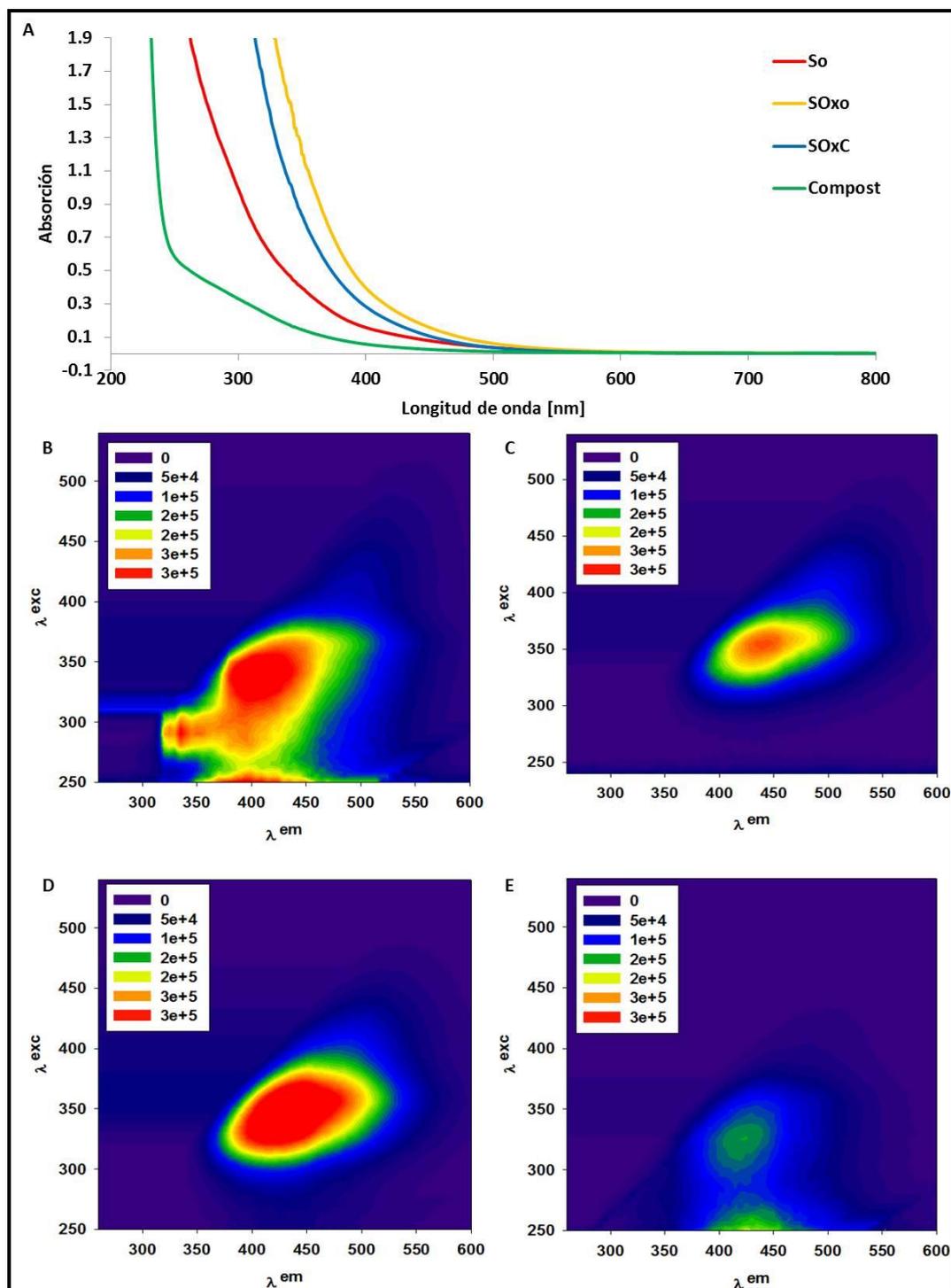


Figura V.15. Análisis de los extractos alcalinos. A. Espectro de absorción de S_0 , SOx_0 , $SOxC$ y Compost. **B.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de S_0 . **C.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de SOx_0 . **D.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de $SOxC$. **E.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia del compost.

Al analizar los espectros se encontró un incremento en la relación E_4/E_6 , que en este caso fue de 23.0, significativamente superior a los valores encontrados en S_0 y SOx_0 . La MEEF de estos extractos mostró una única región de emisión, centrada aproximadamente en λ_{ex} 350- λ_{em} 450 nm. Dicha zona se corresponde a compuestos orgánicos solubles propios del suelo, la Región 1.

Análisis de las poblaciones microbianas cultivables

Las Figuras V.16 y V.17 describen la dinámica de las poblaciones cultivables durante el tiempo de ensayo.

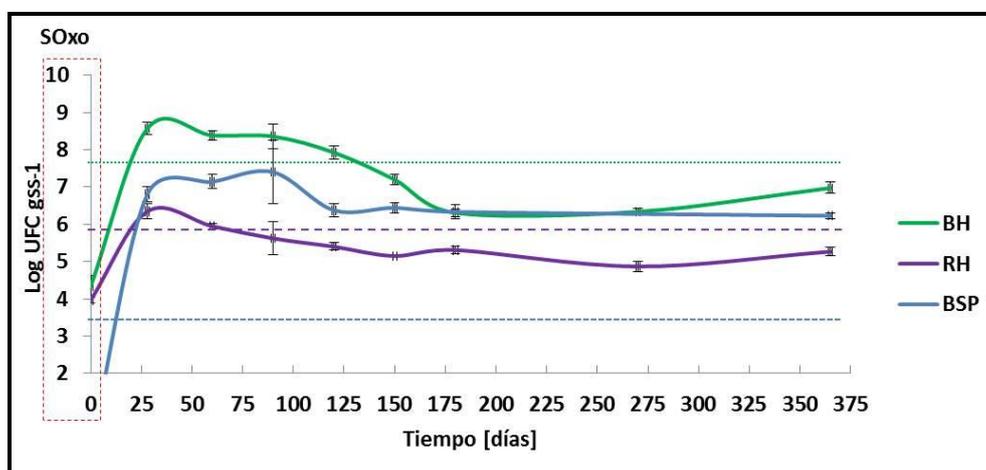


Figura V.16. Dinámica de las poblaciones de bacterias heterótrofas (BH), hongos (RH) y bacterias que solubilizan fósforo (BSP) durante el tratamiento en el microcosmos $SOxC$. En líneas punteadas se indica el valor de las poblaciones correspondientes a S_{0r} , mientras que en el recuadro rojo el correspondiente a SOx_0 .

Todas las poblaciones estudiadas en $SOxC$ lograron recuperarse luego de un mes de tratamiento, con respecto al valor del suelo post oxidación. La densidad de BH alcanzó el valor máximo al mes. Luego, los valores fueron disminuyendo hasta los seis meses de tratamiento, momento en que se estabilizó.

Un comportamiento similar se encontró para la población de BSP, la cuales no solo se recuperó luego de 28 días, sino que posteriormente se estabilizó en un valor similar al de la población BH, y superior al determinado en S_0 .

La población RH también se recuperó rápidamente. Transcurridos 28 días de tratamiento, esta población alcanzó su valor máximo, luego disminuyó hasta estabilizarse en un valor similar al encontrado en S_0 ($p > 0.05$).

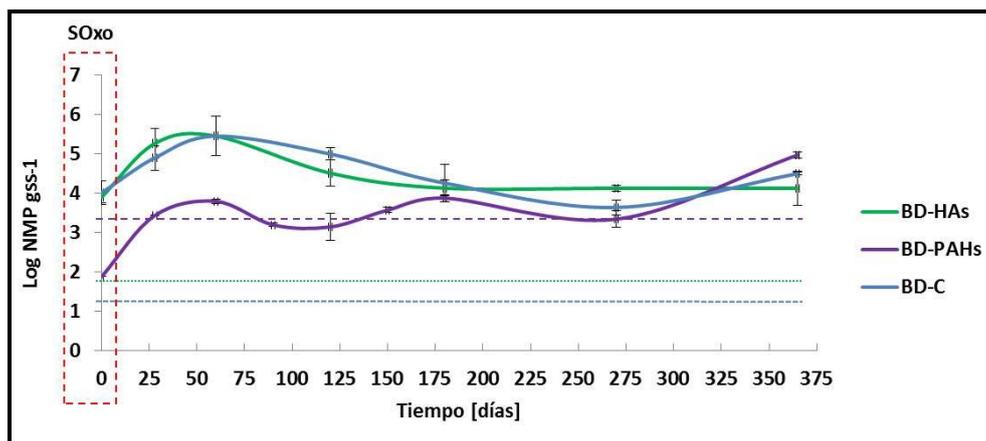


Figura V.17. Dinámica de las poblaciones de bacterias degradadoras de HAs (BD-HAs), degradadoras de PAHs (BD-PAHs) y degradadoras de celulosa (BD-C) durante el tratamiento en el microcosmos SOx0. En líneas punteadas se indica el valor de las poblaciones correspondientes a S_0 , mientras que en el recuadro rojo el correspondiente a SOx_0 .

La densidad de las poblaciones de BD-HAs y de BD-C fueron similares y significativamente superiores a los medidos en S_0 durante todo el ensayo, alcanzando el valor máximo dentro de los 60 días. Ambas poblaciones se estabilizaron en un valor significativamente superior al del suelo original.

La población de BD-PAHs se recuperó luego de 2 meses de tratamiento ($p > 0.05$). Esta recuperación fue sostenida durante el ensayo, alcanzando un valor máximo al final del tratamiento ($p < 0.05$).

A partir del sexto mes las tres poblaciones degradadoras se estabilizaron en valores significativamente superiores al determinado en el suelo original.

Caracterización de la funcionalidad del suelo

La Figura V.18 describe la dinámica de la actividad deshidrogenasa durante el tratamiento. Se observó un incremento significativo de la actividad deshidrogenasa, con un máximo de $95 \pm 40 \mu\text{g TPF g}_{\text{SS}}^{-1}$ el día 28. La gran dispersión asociada a la medida se debe a la heterogeneidad de los microcosmos en el momento del muestreo. Luego del primer mes de tratamiento, la medida de la actividad deshidrogenasa disminuyó, hasta alcanzar un valor estable, siempre significativamente superior al valor de S_0 y SOx_0 , donde los valores fueron menores al límite de detección de la técnica.

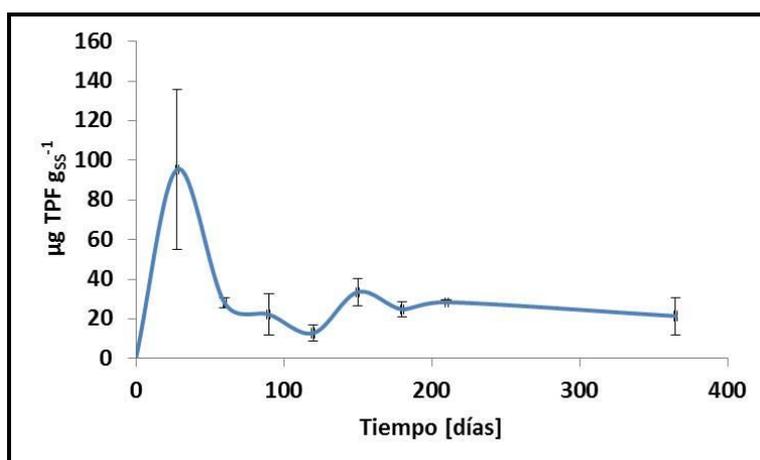


Figura V.18. Dinámica de la actividad deshidrogenasa de los microcosmos SOxC durante el tratamiento.

El estudio de la funcionalidad al finalizar el tratamiento se detalla en la Tabla V.16. Las actividades lipasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y ureasa fueron estimuladas mediante el tratamiento de compostaje acoplado al agregado de PS con respecto a S₀ y SOx₀. Sin embargo, la actividad arilsulfatasa disminuyó (no detectada) luego del tratamiento de compostaje.

Tabla V.16. Actividades enzimáticas estudiadas en la caracterización del suelo compostado luego de la aplicación de PS al finalizar el tratamiento (SOxC). Las medidas se realizaron por triplicado.

Actividad	S ₀	SOx ₀	SOxC
Deshidrogenasa [µg TPF g _{SS} ⁻¹]	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>	25 ± 3
Lipasa [ng pNPg _{SS} ⁻¹]	189 ± 4 (c)	267 ± 6 (b)	424 ± 58 (a)
Arilsulfatasa [ng pNPg _{SS} ⁻¹]	33 ± 1 (a)	35 ± 1 (a)	<i>No detectado</i>
Fosfatasa alcalina [ng pNPg _{SS} ⁻¹]	175 ± 24 (b)	84 ± 23 (c)	681 ± 31 (a)
Fosfatasa ácida [ng pNPg _{SS} ⁻¹]	103 ± 20 (a)	51 ± 6 (a)	2609 ± 318 (a)
Ureasa [µgN-NH ₄ g _{SS} ⁻¹]	23 ± 6 (b)	<i>No detectado</i>	255 ± 8 (a)
Proteasa [mg Tyr g _{SS} ⁻¹]	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>

Ensayos de fitotoxicidad

La Figura V.19 presenta los resultados de toxicidad utilizando extractos acuosos de SOxC al final del tratamiento. La figura muestra de forma comparativa los resultados obtenidos con los extractos de S₀ y SOx₀.

El extracto acuoso sin diluir (100 %) de microcosmos SOxC mostró un incremento significativo en el IG %, con respecto a S₀, obteniéndose un valor de 88 ± 12 %.

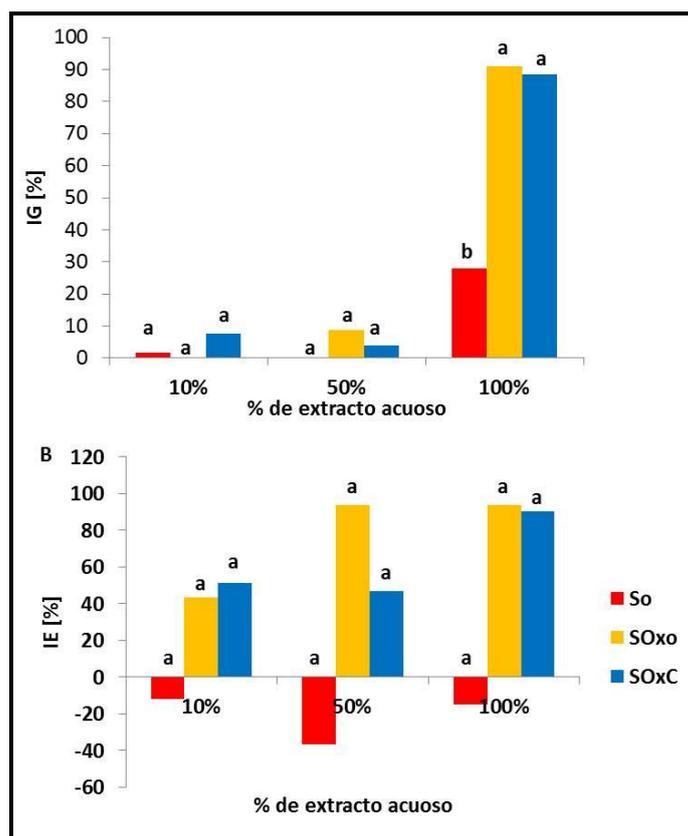


Figura V.19. Ensayos de fitotoxicidad de los extractos acuosos de S₀, SO_{x0} y SC. A: Índice de Inhibición de la germinación (IG %). B: Índice de Inhibición en la elongación radicular (IE %). Los ensayos se realizaron utilizando extractos acuosos del suelo original (S₀) y de los microcosmos SO_{x0} y SO_{xC} al finalizar el tratamiento.

Si bien no fue observada una diferencia significativa en el IE % de SO_{xC} respecto de los valores pre y post oxidación, se apreció un efecto opuesto al observado con extractos de S₀, y similar al observado con SO_{x0}. La apariencia de las radículas germinadas con el extracto de SO_{xC}, si bien fueron de menor longitud, exhibieron un calibre similar a las del control del ensayo (agua).

En la Figura V.20 se presenta el desarrollo del test de producción vegetal realizado utilizando mezcla de semillas de césped y material del microcosmos SO_{xC} al finalizar el tratamiento. La producción vegetal luego de un mes de iniciado el ensayo fue de 5.72 mg_{SECO} (cm²)⁻¹.



Figura V.20. Desarrollo del test de germinación de césped de los microcosmos SOxC, luego de 12 meses de tratamiento, realizado durante un mes. A. Inicio del ensayo. B. 14 días de ensayo. C. y D. 21 días de ensayo. E. 28 días de ensayo.

Discusión

Los microcosmos SOxC mostraron un descenso del pH, atribuible a la actividad de las comunidades microbianas, tanto autóctona como alóctona. El contenido de CO, N y P se incrementó, producto de los materiales utilizados en el tratamiento (Fernández y col., 2009; M. Chen y col., 2015).

De modo análogo a lo observado en los microcosmos SOxA, luego del primer mes de tratamiento, se recuperaron las poblaciones de BH. Sin embargo, a diferencia de SOxA, el compostaje del suelo promovió la recuperación de RH y BD-PAHs, como así también aceleró la recuperación de la población de BSP. Estos resultados sugieren que el compostaje del suelo provoca la pronta recuperación de las poblaciones, tanto generalistas como especialistas, ya sea por la estimulación a través del agregado de nutrientes y/o por la incorporación de una comunidad alóctona competente, propia de los materiales empleados para el tratamiento (Ver Anexo I). Más aún, la densidad de poblaciones especialistas (BD-PAHs, BD-HAs y BD-C) al finalizar el tratamiento, se vieron incrementadas con respecto a los valores encontrados en S₀, sugiriendo no solo la recuperación, sino su estimulación a través del tratamiento.

Como se discutió en el **Capítulo IV**, durante el tratamiento de compostaje se generan HAs, principalmente de alto peso molecular. No obstante, en los microcosmos SOxC hubo eliminación significativa del contenido de HAs, de al menos 68 %. La degradación se evidenció principalmente en la eliminación de HAs de bajo peso molecular, lo que generó un cambio en la abundancia relativa de HAs. La población de

BD-HAs, que resultó estimulada luego del agregado de PS, se mantuvo superior al valor determinado en S_0 a lo largo de todo el tratamiento, pudiendo ser la responsable de la eliminación de HAs observada. Esta observación concuerda con el enriquecimiento de microorganismos degradadores de HAs observado en procesos biológicos acoplados a oxidaciones químicas (Sutton y col., 2014a).

En cuanto al contenido de PAHs, se observó una disminución del 34 % respecto de SOx_0 , atribuible al efecto de dilución por la aplicación de la enmienda. No obstante, se observó eliminación de PAHs, principalmente bajo peso molecular.

Los estudios realizados por Plaza y col (2009), describen la interacción del fenantreno y pireno con las SH durante el compostaje, así también, cómo sus propiedades estructurales y composición influyen en dicha interacción. En sus resultados concluyen que durante el compostaje se producen modificaciones estructurales y químicas de las SH, que se traducen en la liberación de compuestos alifáticos y carbohidratos con el aumento del grado de condensación. Las transformaciones descritas resultan en la disminución significativa de la afinidad de unión de las SH a los PAHs. Se podría atribuir a estos cambios en la matriz del suelo, el incremento de la biodisponibilidad de los PAHs encontrado, así como también el “*desequestramiento*” observado dibenzo [*a, h*] antraceno y benzo [*g, h, i*] perileno, con respecto a S_0 .

El contenido de CTD de los microcosmos $SOxC$ fue menor al determinado SOx_0 . Más aún, tomando como referencia el alto valor de CTD que se genera durante un compostaje tradicional, ($363 \pm 3 \text{ mg C L}^{-1}$) es posible asociar la recuperación de todas las poblaciones al consumo de esta fracción, que luego de un año dejan un valor aún menor al determinado en S_0 . El alto valor de la relación E_4/E_6 determinada en los extractos alcalinos de $SOxC$, comparado al obtenido en S_0 y SOx_0 , sugiere el enriquecimiento de estos extractos en compuestos solubles de bajo peso molecular, indicando que los microcosmos $SOxC$ podrían continuar activos, a expensas de los nutrientes generados durante el compostaje, contribuyendo a la eliminación adicional de los PAHs biodisponibles.

El descenso observado en la concentración de sulfatos, con respecto a SOx_0 , fue atribuido a la asimilación reductiva de las poblaciones como así también a la incorporación de azufre a las SH.

Las actividades deshidrogenasa, lipasa, fosfatasas y ureasas de los microcosmos SOx_C fueron significativamente superiores a las correspondientes a S_0 , lo que estaría indicando una activación de las funciones relacionadas con los ciclos biogeoquímicos de la materia (Scelza y col., 2010). Comparado con los resultados encontrados en SOx_A , este tratamiento en términos globales, produjo mayor incremento en la funcionalidad de la comunidad microbiana. La ausencia de actividad arilsulfatasa puede atribuirse a la inhibición de la enzima por el alto contenido residual de sulfatos.

Respecto de la fitotoxicidad, los extractos acuosos provenientes de estos microcosmos, mostraron un alto IG % e IE %, similares a los determinados para los extractos de SOx_0 . Se puede inferir un retraso en el tiempo de germinación, ya que una vez germinadas, las radículas fueron de aspecto similar a las producidas en presencia de agua, revirtiendo el efecto observado en las radículas obtenidas utilizando extractos de S_0 .

Tanto la elevada CE (Esechie 1994), el alto contenido de sulfatos, la aumentada biodisponibilidad de los PAHs (Scelza y col., 2010) y la posible acumulación de productos de degradación de los hidrocarburos (Morelli y col., 2001), afectan negativamente en la germinación de las semillas, y principalmente en el meristema apical que es donde se origina el proceso germinativo (Masakorala y col., 2013). Estos factores podrían haber retardado la germinación.

El tratamiento de compostaje acoplado a la aplicación de PS produjo el incremento de la capacidad de retención de agua, con respecto a S_0 , y de la producción de biomasa vegetal, con respecto a SOx_0 , lo que indica la mejora global de la calidad del material resultante (Kästner y Miltner 2016).

Estimulación con compost acoplada a la aplicación de PS (SOxE)

Estudios químicos y físicos

La Tabla V.17 muestra las determinaciones realizadas en el suelo oxidado luego de un año de aplicada la enmienda orgánica. El agregado de compost provocó un descenso del pH. Luego de 12 meses de tratamiento, el contenido de CO fue 5 veces superior al determinado en S₀, mientras que el contenido de N fue 7 veces superior respecto del mismo valor de referencia. También se encontró un incremento significativo en el contenido de P y de la CE, y un descenso en el contenido de sulfatos con respecto a SO_{x0}.

Tabla V.17. Análisis químico del suelo original (S₀), y de los microcosmos de suelo luego de la aplicación de persulfato de amonio (SO_{x0}) y suelo estimulado con compost post aplicación de PS al finalizar el tratamiento (SOxE). Medida de pH, Conductividad Eléctrica (CE, [$\mu\text{S cm}^{-1}$]), Potencial redox (Eh, [mV]), Carbono Orgánico (CO %), Nitrógeno total (N %), Fósforo disponible (P, [mg Kg^{-1}]) y azufre de sulfatos (SO₄²⁻, [mg Kg^{-1}]).

Propiedades	S ₀	SO _{x0}	SOxE
pH final	8.8 ± 0.1	7.1 ± 0.1	6.3 ± 0.1
CE [$\mu\text{S cm}^{-1}$]	634 ± 12	5110 ± 99	11835 ± 460
Eh [mV]	236 ± 2	291 ± 2	260 ± 4
CO [%]	2.2 ± 0.9	2.40 ± 0.06	11.3 ± 0.3
N [%]	0.2 ± 0.1	0.519 ± 0.003	1.41 ± 0.06
C:N	11	4.62	8.01
P [mg kg^{-1}]	8.3 ± 0.6	14.5 ± 0.7	328.0 ± 0.1
C:N:P	0.3: 0.03:1	0.16:0.03:1	0.03:0.004:1
SO ₄ ²⁻ [mg Kg^{-1}]	97 ± 6	8407 ± 16	3887 ± 12

La Tabla V.18 y la Figura V.21 describen los cambios observados en el contenido de HAs luego de 12 meses de tratamiento.

Tabla V.18. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) del suelo original (S₀), y de los microcosmos de suelo luego de la aplicación de PS (SO_{x0}), al final del tratamiento de estimulación con compost (SOxE). Se incluyeron los valores correspondientes al compost utilizado para la estimulación con fines comparativos.

Microcosmos	HAs [$\text{mg Kg}_{\text{ss}}^{-1}$]	C9 – C20 [%]	C20 – C29 [%]	C29 – C35 [%]
S ₀	2456 (a)	52.9	42.1	5.0
SO _{x0}	2441 (a)	48.6	43.5	7.9
SOxE	846 (b)	28.6	45.9	25.5
Compost	2401 (a)	40.9	35.1	24.0

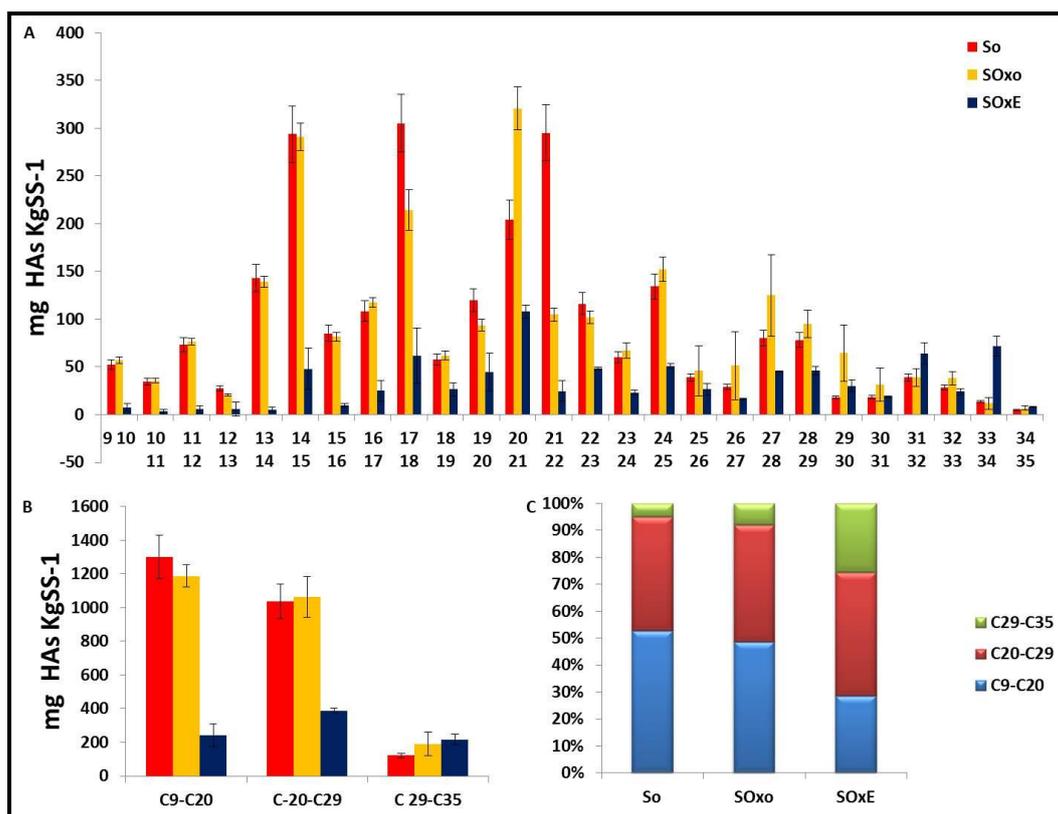


Figura V.21. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) de los sistemas suelo original (S_0), suelo oxidado (SOx_0) y suelo oxidado estimulado al finalizar el tratamiento ($SOxE$). A. Detalle de cada fracción de HAs, expresado como mg de compuesto Kg_{SS}^{-1} . B. Contenido de HAs según el número de átomos de carbono. C. Composición relativa [%]. Los valores numéricos se presentan en la Tabla V.18.

Se encontró eliminación significativa en el contenido de HAs de al menos 66 % con respecto a S_0 . Esta eliminación fue acompañada del reordenamiento de las fracciones de los HAs presentes en la muestra, donde se puede observar una disminución en la abundancia relativa en el contenido de HAs de cadena corta, mientras que la correspondiente a la fracción pesada fue similar a la encontrada en el compost. Estos cambios se deben a la eliminación del 81 % de HAs de cadena corta y del 63 % en los de cadena intermedia.

La Tabla V.19 y Figura V.22 detallan los resultados del contenido de PAHs al finalizar el tratamiento de estimulación con compost acoplado a la aplicación de PS. Se encontró una disminución significativa del contenido de PAHs del 50 % respecto de S_0 , correspondiente a la eliminación adicional del 29 % con respecto a SOx_0 .

Tabla V.19. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (PAHs) del suelo original (S_0), del suelo luego de la aplicación de PS (SOx_0) y final del tratamiento de estimulación con compost ($SOxE$).

Microcosmos	PAHs [mg Kg _{ss} ⁻¹]	3 anillos [%]	4 anillos [%]	5 anillos [%]	6 anillos [%]
S_0	214 (a)	35.6	47.8	6.2	10.4
SOx_0	151 (b)	27.0	48.8	6.5	17.7
$SOxE$	106 (c)	17.4	51.5	11.1	20.0

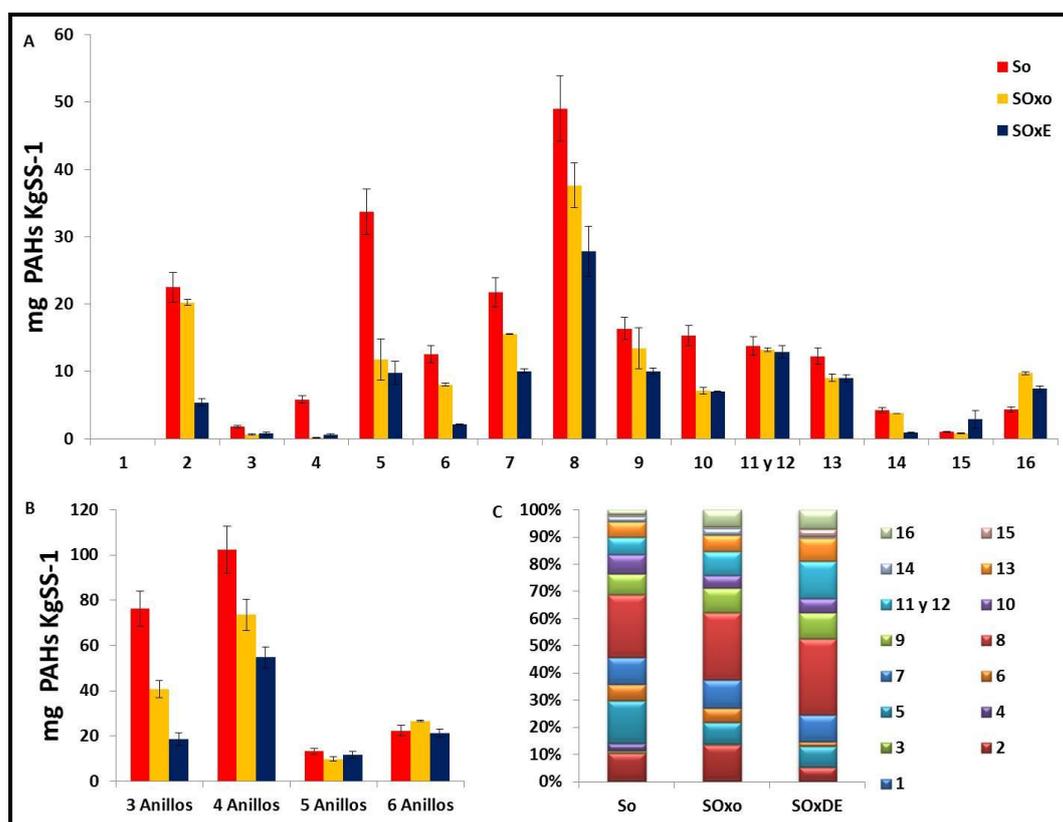


Figura V.22. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs) de los sistemas suelo original (S_0) y suelo oxidado (SOx_0) y suelo oxidado estimulado al finalizar el tratamiento ($SOxE$). A. Detalle de cada fracción de PAHs, expresado como mg de compuesto Kg_{SS}⁻¹. B. Contenido de PAHs según el número de átomos de carbono. C. Composición relativa [%]. Los valores numéricos se presentan en la Tabla V.19.

La **Tabla V.20** detalla el porcentaje de eliminación de cada PAH con respecto al valor determinado en S_0 y la fracción biodisponible porcentual de cada hidrocarburo con respecto al total.

Tabla V.20. Porcentaje de eliminación y fracción biodisponible. Detalle de la eliminación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) respecto de los valores de S_0 y porcentaje biodisponible de cada compuesto luego de 12 meses de la estimulación con compost acoplada a la aplicación de PS.

Compuesto	Eliminación [%]	Fracción biodisponible [%]
Naftaleno	0	<i>No detectado</i>
Acenaftileno	76	<i>No detectado</i>
Acenafteno	57	8.45
Fluoreno	90	<i>No detectado</i>
Fenantreno	71	28.85
Antraceno	83	<i>No detectado</i>
Fluoranteno	54	1.49
Pireno	43	2.45
Benzo [a] antraceno	38	4.26
Criseno	54	<i>No detectado</i>
Benzo [b] fluoranteno/ Benzo [k] fluoranteno	7	1.57
Benzo [a] pireno	27	<i>No detectado</i>
Indeno [1, 2, 3 - cd] pireno	77	<i>No detectado</i>
Dibenzo [a, h] antraceno	-180	<i>No detectado</i>
Benzo [g, h, i] perileno	-70	<i>No detectado</i>

Se encontró que la mayor eliminación fue de fluoreno, antraceno, indeno [1, 2, 3 - cd] pireno, acenaftileno, fenantreno, acenafteno y fluoranteno. En estos microcosmos se encontró el incremento de dibenzo [a, h] antraceno y benzo [g, h, i] perileno respecto de S_0 .

La estimulación con compost al suelo oxidado provocó un incremento en los valores de PAHs biodisponibles, cuya valor fue de 47.07 %. Como se detalla en la Tabla V.20, el fenantreno y el acenafteno fueron los PAHs que mayor biodisponibilidad presentaron al finalizar el tratamiento.

La medida del Carbono Total Disuelto (CTD) del microcosmos SOx_E fue significativamente mayor a la encontrada en el suelo original, con un valor de 138 ± 2 mg C L⁻¹. Sin embargo este valor resultó significativamente inferior al encontrado en SOx_0 .

La Figura V.23 presenta los resultados de los análisis espectroscópicos de los extractos (Dilución 1:4); en los que se encontró que la relación E_4/E_6 para estos microcosmos fue de 3.8, menor a la encontrada en S_0 y SOx_0 .

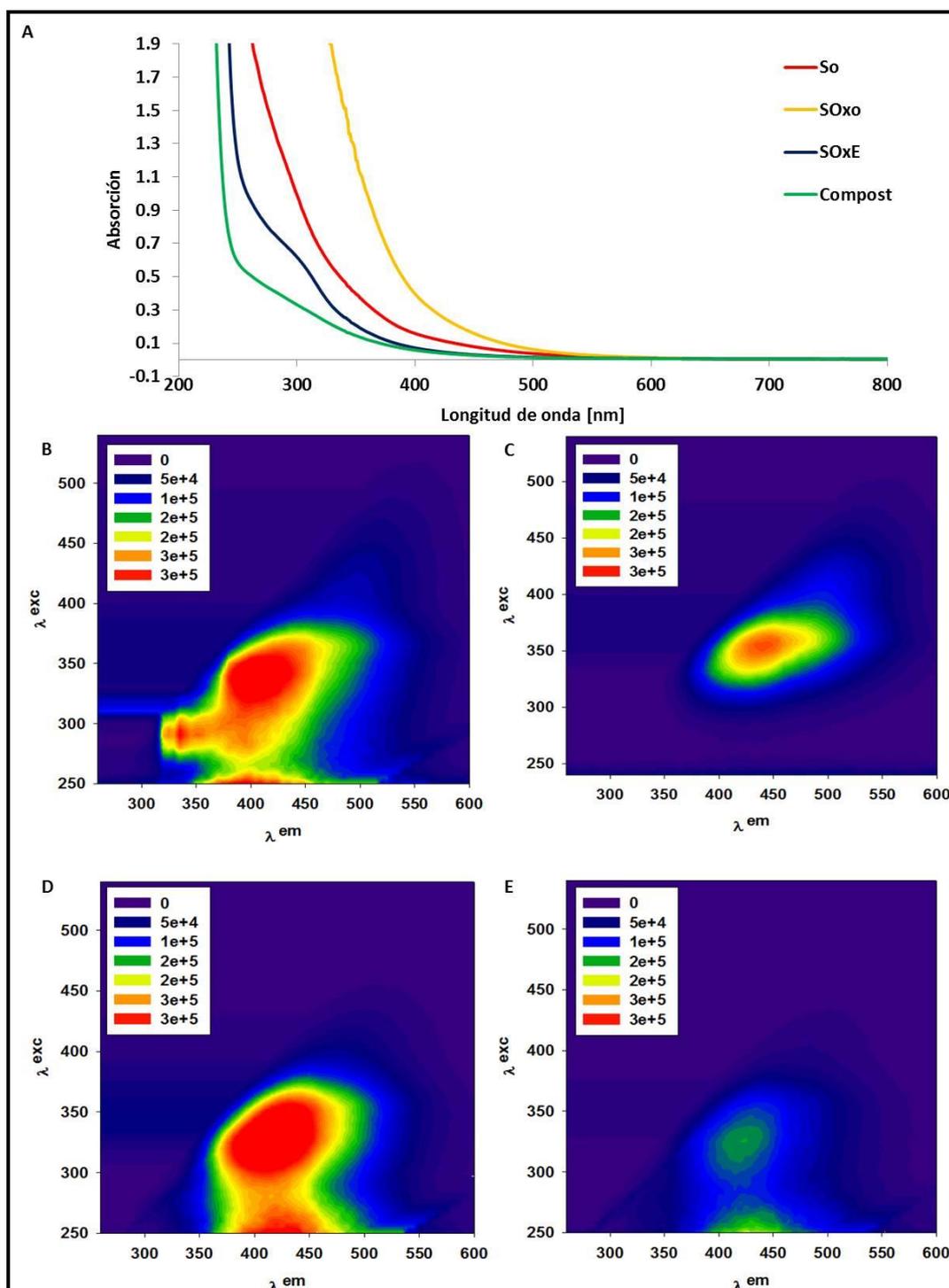


Figura V.23. Análisis de los extractos alcalinos. A. Espectro de absorción de S_0 , SOx_0 , $SOxE$ y Compost. **B.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de S_0 . **C.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de SOx_0 . **D.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de $SOxE$. **E.** Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia del compost.

La matriz de excitación emisión de fluorescencia de estos extractos mostró un máximo de emisión en la Región 1, correspondiente a sustancias húmicas del suelo se ubicó en λ_{ex} 325- λ_{em} 425 nm.

Análisis de las poblaciones microbianas cultivables

Las Figuras V.24 y V.25 describen la dinámica de las poblaciones cultivables durante el tiempo de ensayo. En términos generales, todas las poblaciones cultivables se recuperaron durante el primer mes de tratamiento.

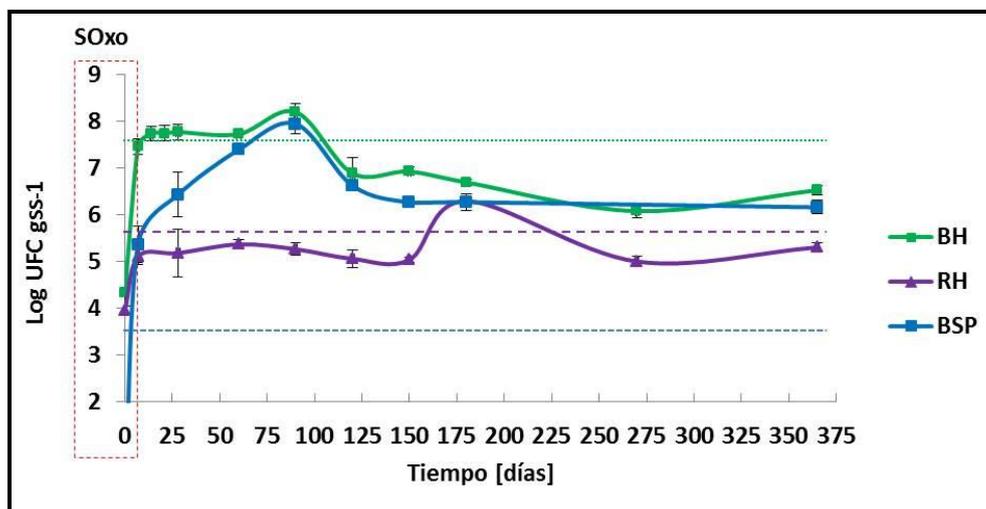


Figura V.24. Dinámica de las poblaciones de bacterias heterótrofas (BH), hongos (RH) y bacterias que solubilizan fósforo (BSP) durante el tratamiento en el microcosmos SOxE. En líneas punteadas se indica el valor de las poblaciones correspondientes a S_0 , mientras que en el recuadro rojo el correspondiente a SO_{x0} .

La densidad de BH, luego de 7 días de iniciado el tratamiento, alcanzó y mantuvo el valor determinado en el suelo original, S_0 , por aproximadamente tres meses, para luego descender hacia el final del tratamiento. La densidad de BSP mostró valores significativamente superiores a los de S_0 durante todo el tiempo de ensayo, alcanzando un valor máximo el día 90, y descendiendo luego hacia el final del tratamiento a partir del mes 5 hasta el final del ensayo. La población RH al igual que la BH, recuperó el valor determinado en S_0 luego de 7 días de iniciado el tratamiento de estimulación.

El comportamiento de las poblaciones BD-HAs y BD-C fue similar. Ambos recuentos fueron superiores, con respecto a los de S_0 ($p < 0.05$), durante el tratamiento. La densidad de BD-PAHs mostró grandes fluctuaciones a través de todo el tratamiento, alcanzando en diferentes momentos el valor determinado S_0 .

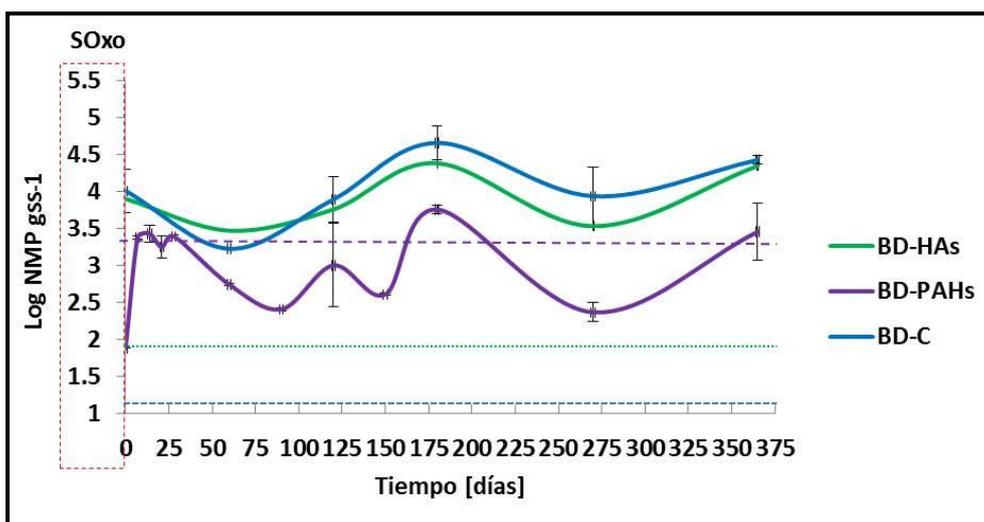


Figura V.25. Dinámica de las poblaciones de bacterias degradadoras de HAs (BD-HAs), degradadoras de PAHs (BD-PAHs) y degradadoras de celulosa (BD-C) durante el tratamiento en el microcosmos SOxE. En líneas punteadas se indica el valor de las poblaciones correspondientes a S_0 , mientras que en el recuadro rojo el correspondiente a SO_{x0} .

Caracterización de la funcionalidad del suelo

La Figura V.26 muestra la dinámica de la actividad deshidrogenasa durante todo el tratamiento, donde puede verse que fue significativamente superior a la del suelo inicial. El efecto estimulador disminuyó significativamente a partir de los 6 meses de tratamiento.

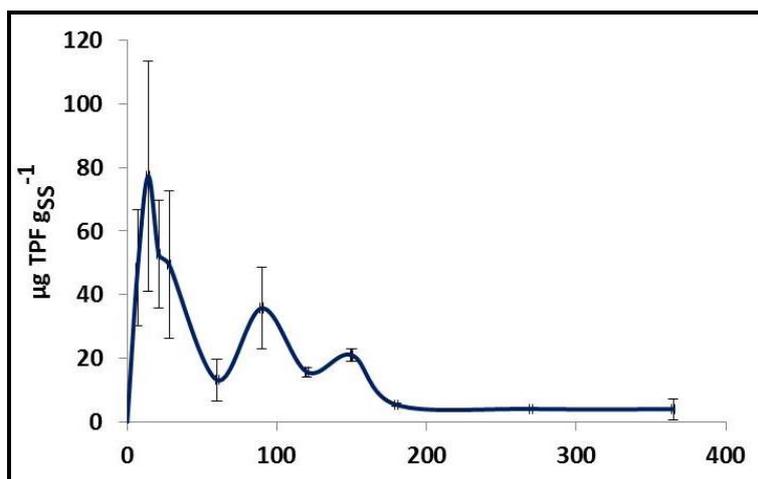


Figura V.26. Dinámica de la actividad deshidrogenasa de los microcosmos SOxE durante todo el tiempo de ensayo.

La Tabla V.21 presenta las determinaciones enzimáticas realizadas al final del tratamiento.

Tabla V.21. Actividades enzimáticas estudiadas en la caracterización del suelo bioestimulado con compost luego de la aplicación de PS (SOxE), al finalizar el tratamiento. Las medidas se realizaron por triplicado.

Actividad	S ₀	SOx ₀	SOxE
Deshidrogenasa [$\mu\text{g TPF g}_{\text{SS}}^{-1}$]	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>	4 ± 3
Lipasa [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	189 ± 4 (b)	267 ± 6 (a)	137 ± 12 (c)
Arilsulfatasa [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	33 ± 1 (a)	35 ± 1 (a)	<i>No detectado</i>
Fosfatasa alcalina [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	175 ± 24 (b)	84 ± 23 (c)	359 ± 39 (a)
Fosfatasa ácida [$\text{ng pNPg}_{\text{SS}}^{-1}$]	103 ± 20 (b)	51 ± 6 (b)	963 ± 145 (a)
Ureasa [$\mu\text{gN-NH}_4\text{g}_{\text{SS}}^{-1}$]	23 ± 6 (b)	<i>No detectado</i>	263 ± 52 (a)
Proteasa [$\text{mg Tyr g}_{\text{SS}}^{-1}$]	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>

Las actividades lipasa y arilsulfatasa, fueron significativamente menores con respecto a S₀ y SOx₀. La actividades fosfatasas y ureasas mostraron un incremento con respecto a los valores de referencia ($p < 0.05$). La actividad proteasa no mostró cambios.

Ensayos de fitotoxicidad

La Figura V.27 muestra los resultados del test de toxicidad en semillas de *Lactuca sativa L* utilizando los extractos acuosos de estos microcosmos al finalizar el tratamiento.

Como puede apreciarse, los extractos acuosos sin diluir provenientes de microcosmos SOxE, al finalizar el tratamiento, mostraron un marcado efecto fitotóxico, tanto en el IG % como en el IE %, con respecto al control y a S₀.

Como se observa en la Figura V.27.C y D, los extractos acuosos diluidos (al 50 %) permitieron el desarrollo de plántulas con radículas de calibre similar a las del control, aunque de menor longitud. Los hipocótilos de las plántulas también fueron de menor longitud que las del control.

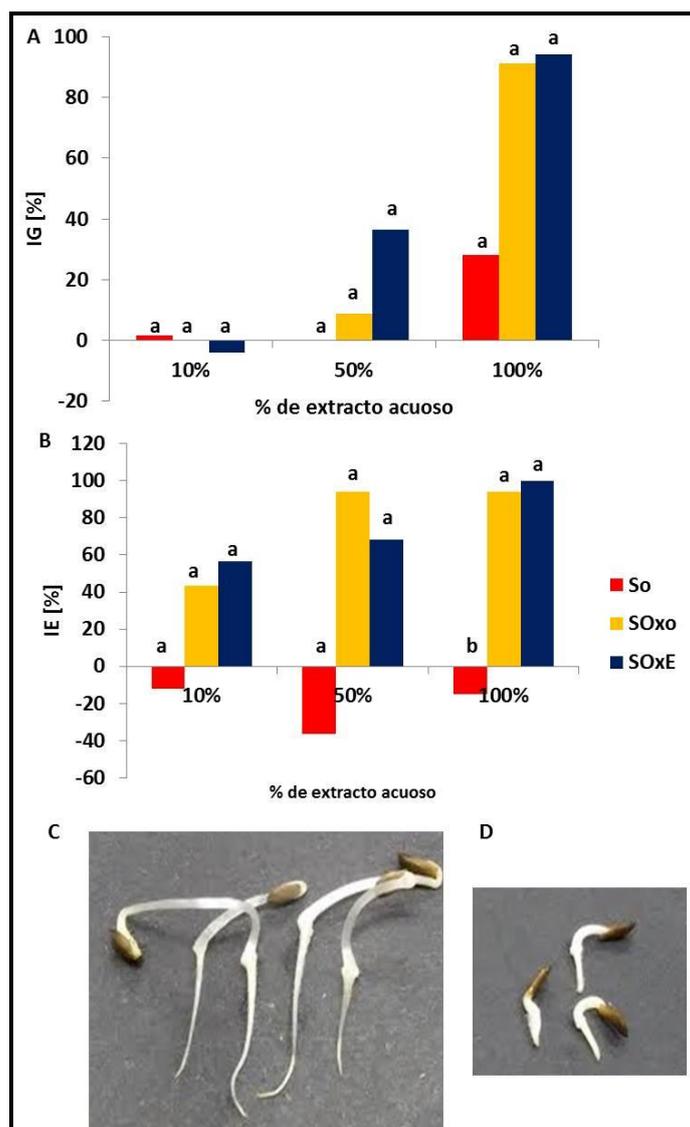


Figura V.27. Ensayos de fitotoxicidad de los extractos acuosos de S_0 , SOx_0 y $SOxE$ y morfología de las plántulas de *Lactuca sativa*. A. Índice de Inhibición en la Germinación (IG %). B. Índice de Inhibición de la Elongación radicular (IE %). C. Plántulas germinadas en presencia de agua (Control) D. Plántulas germinadas en presencia del extracto acuoso diluido (50 %) de $SOxE$ al finalizar el tratamiento. Los ensayos se realizaron utilizando extractos acuosos del suelo original (S_0) y de los microcosmos SOx_0 y $SOxE$ al finalizar el tratamiento.

Discusión

Los microcosmos $SOxE$ mostraron un descenso del pH, con respecto tanto de S_0 como de SOx_0 , asociado a la actividad microbiana. Este tratamiento provocó un aumento en el contenido de CO, N y P, característico del uso de este tipo de enmiendas (Lau y Wong 2001).

Este tratamiento se asoció con la eliminación significativa de al menos el 66 % de HAs, correspondientes a los que denominamos livianos e intermedios. La población de

BD-HAs, estimulada en valores superiores a los de S_0 podría ser la responsable de este descenso. El incremento encontrado en la fracción de HAs de alto peso molecular puede ser asociado a los procesos de transformación de la materia orgánica suplementada por el material utilizado como enmienda, como se describió en el **Capítulo IV** y en la discusión anterior.

No obstante la dilución del suelo por el agregado de enmienda, se encontró una disminución del contenido de PAHs del 29 % respecto de SOx_0 atribuida principalmente a la fracción de PAHs de bajo peso molecular, sin observar relación entre la fracción biodisponible post aplicación de PS y la eliminación luego del tratamiento de estimulación con compost.

Si bien el agregado de enmienda contribuye al incremento del CTD, al final del tratamiento de estimulación en $SOxE$, el valor de CTD fue menor al determinado en SOx_0 indicando el consumo de compuestos solubles durante el desarrollo de la poblaciones microbianas (Antízar- Ladislao y col., 2006b; Morán Vieyra y col., 2009). La relación baja E_4/E_6 (3.8) determinada en estos extractos sugiere el enriquecimiento en moléculas de alto grado de condensación, característico del proceso de humificación (Senesi y col., 2007).

El proceso de humificación, podría influenciar en la afinidad de la interacción de los PAHs con las distintas fracciones de las SH (Plaza y col., 2009), pudiendo incrementar su biodisponibilidad, así como provocar el “*desequestramiento*” observado de dibenzo [a, h] antraceno y benzo [g, h, i] perileno.

La presencia de PAHs biodisponibles luego de 1 año de tratamiento podría atribuirse a la falta de sustratos co-metabólicos, sugerida por el alto grado de condensación de la materia orgánica soluble y el bajo contenido de CTD.

La estimulación con compost permitió la recuperación de todas las poblaciones que fueron afectadas por la aplicación de PS, incluso su estimulación en valores superiores al suelo original en tiempos más cortos que los observados en $SOxA$ y $SOxC$. Esta observación estaría asociada a la calidad nutricional del material, debido tanto al aporte de nutrientes fácilmente asimilables como a la comunidad autóctona proveniente del compost (BH, RH y BSP, sin detectarse BD-PAHs) proporcionada a

través de la enmienda (ver *Anexo I*). Del mismo modo, el aumento de la densidad de población de BSP podría asociarse en parte, al incremento de P determinado para estos microcosmos, y correlacionarse con el aumento de las actividades fosfatasa.

El mayor valor alcanzado por las poblaciones de BD-HAs y BD-C en SOx_0 , fue reducido inicialmente por la estimulación con compost, probablemente debido a la competencia asociada a la recuperación de las otras poblaciones. La población de BD-PAHs resiliente se vio estimulada por el agregado de compost al suelo, alcanzando rápidamente un valor similar al de S_0 , resultando más apta que las BD-HAs y BD-C en las fases tempranas del compostaje. Las poblaciones de BD-HAs y BD-C mostraron un recuento máximo luego de seis meses, el cual podría asociarse a la transformación del material utilizado como enmienda, aportando sustratos compatibles con estas poblaciones.

En términos de funcionalidad, los microcosmos $SOxE$ mostraron una mejora global, aunque de menor magnitud que la encontrada en los microcosmos $SOxC$. La actividad deshidrogenasa y ureasa podrían asociarse a la estimulación promovida por el aporte de nutrientes a través de la enmienda empleada, activando así los ciclos del C y N. El descenso observado en la actividad lipasa, con respecto a S_0 y SOx_0 , podría ser indicador de una menor actividad degradadora de los hidrocarburos. La falta de actividad arilsulfatasa puede atribuirse a la inhibición de la enzima por el alto contenido de sulfatos en los microcosmos.

De modo análogo a lo descrito en los microcosmos $SOxC$, los extractos acuosos de $SOxE$ mostraron un elevado IG % e IE %, atribuido probablemente a un retardo en la germinación.

Doble estimulación con compost acoplada a la aplicación de PS (SOxDE)

Luego de seis meses de realizada la estimulación con compost, se practicó una segunda aplicación cuyo efecto se monitoreo por seis meses.

Estudios químicos y físicos

La Tabla V.22 presenta la caracterización de muestras de los microcosmos de suelo oxidado y estimulado con dos agregados de compost secuenciales (SOxDE), al final del tratamiento, donde se observa el descenso del pH (respecto de S₀ y de SOx₀). El contenido de CO fue 5.9 veces superior al determinado en S₀, mientras que el contenido de N fue 5.5 veces superior respecto del mismo valor de referencia. También se encontró un incremento significativo en el contenido de P, de 39.5 veces el valor encontrado en S₀, de la CE y un descenso del contenido de sulfatos, con respecto a SOx₀.

Tabla V.22. Análisis químico del suelo original (S₀), y de los microcosmos de suelo luego de la aplicación de persulfato de amonio (SOx₀) y suelo doblemente estimulado con compost post aplicación de PS al finalizar el tratamiento (SOxDE). Medida de pH, Conductividad Eléctrica (CE, [$\mu\text{S cm}^{-1}$]), Potencial redox (Eh, [mV]), Carbono Orgánico (CO %), Nitrógeno total (N %), Fósforo disponible (P, [mg Kg^{-1}]) y azufre de sulfatos (SO₄²⁻, [mg Kg^{-1}]).

Propiedades	S ₀	SOx ₀	SOxDE
pH final	8.8 ± 0.1	7.1 ± 0.1	6.58 ± 0.1
CE [$\mu\text{S cm}^{-1}$]	634 ± 12	5110 ± 99	11365 ± 134
Eh [mV]	236 ± 2	291 ± 2	261 ± 6
CO [%]	2.2 ± 0.9	2.40 ± 0.06	12.9 ± 0.3
N [%]	0.2 ± 0.1	0.519 ± 0.003	1.11 ± 0.01
C:N	11.0	4.6	11.6
P [mg kg^{-1}]	8.3 ± 0.6	14.5 ± 0.7	328 ± 0
C:N:P	0.3: 0.03:1	0.16:0.03:1	0.04:0.003:1
SO ₄ ²⁻ [mg Kg^{-1}].	97 ± 6	8407 ± 16	3120 ± 16

La Tabla V.23 y la Figura V.28 describen los cambios observados en el contenido de HAs al finalizar el tratamiento.

Se encontró eliminación significativa en el contenido de HAs de al menos 45 % con respecto a S₀. La mayor eliminación se vio en el contenido de HAs de cadena liviana (79 %), seguido de la eliminación de los correspondientes a la fracción de peso intermedio (46 %). Esta eliminación produjo la reestructuración de los HAs presentes

en la muestra, donde se puede observar una disminución en la abundancia relativa en el contenido de HAs de cadena corta, mientras que la correspondiente a la fracción intermedia fue similar a la encontrada en el compost. Se observó un incremento en el contenido de HAs de mayor peso molecular.

Tabla V.23. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) del suelo original (S_0), y de los microcosmos de suelo luego de la aplicación de PS (SOx_0), al final del tratamiento de doble estimulación con compost ($SOxDE$). Se incluyeron los valores correspondientes al compost utilizado para la estimulación con fines comparativos.

Microcosmos	HAs [mg kg _{SS} ⁻¹]	C9 – C20 [%]	C20 – C29 [%]	C29 – C35 [%]
S_0	2456 (a)	52.9	42.1	5.0
SOx_0	2441 (a)	48.6	43.5	7.9
$SOxDE$	1349(b)	20.6	41.4	38.0
Compost	2401 (a)	40.9	35.1	24.0

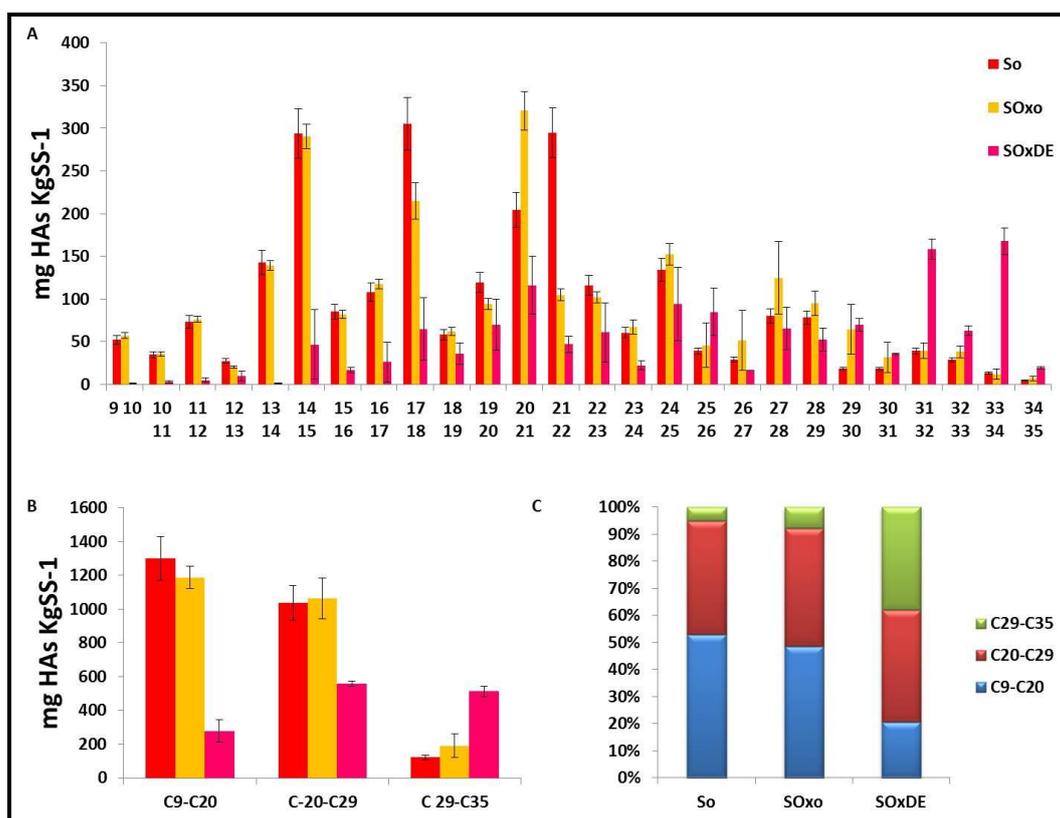


Figura V.28. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) de los sistemas suelo original (S_0), suelo oxidado (SOx_0) y suelo oxidado doblemente estimulado al finalizar el tratamiento ($SOxDE$). A. Detalle de cada fracción de HAs, expresado como mg de compuesto Kg_{SS}⁻¹. B. Contenido de HAs según el número de átomos de carbono. C. Composición relativa [%]. Los valores numéricos se presentan en la Tabla V.23.

La Tabla V.24 y Figura V.29 detallan los resultados del contenido de PAHs al finalizar el tratamiento de doble estimulación con compost acoplado a la aplicación de

PS. Se encontró una disminución significativa del contenido de PAHs del 73 % respecto de S_0 , equivalente al 62 % con respecto a SOx_0 .

Tabla V.24. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (PAHs) del suelo original (S_0), del suelo luego de la aplicación de PS (SOx_0) y final del tratamiento de doble estimulación con compost ($SOxDE$).

Microcosmos	PAHs [mg kg _{ss} ⁻¹]	3 anillos [%]	4 anillos [%]	5 anillos [%]	6 anillos [%]
S_0	214 (a)	35.6	47.8	6.2	10.4
SOx_0	151 (b)	27.0	48.8	6.5	17.7
$SOxDE$	58 (c)	14.7	52.8	22.2	10.3

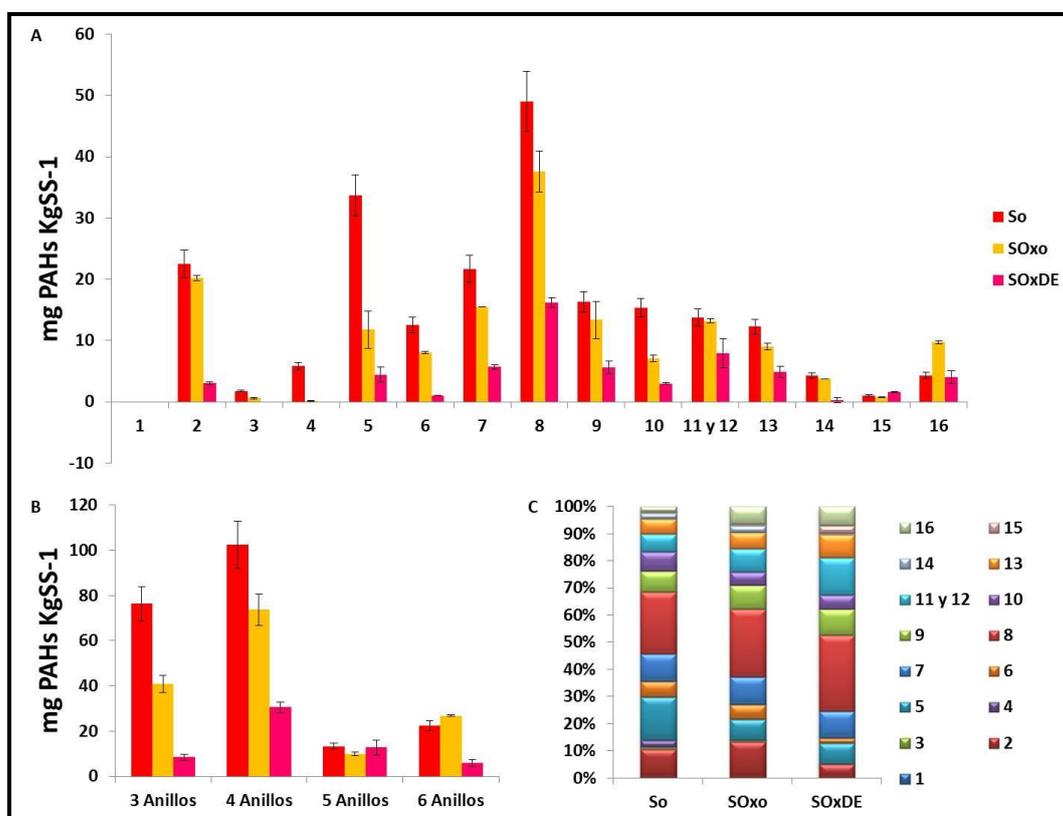


Figura V.29. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs) de los sistemas suelo original (S_0), suelo oxidado (SOx_0) y suelo oxidado doblemente estimulado al finalizar el tratamiento ($SOxDE$). A. Detalle de cada fracción de PAHs, expresado como mg de compuesto kg_{ss}⁻¹. **B.** Contenido de PAHs según el número de átomos de carbono. **C.** Composición relativa [%]. **Los valores numéricos son descriptos en la Tabla V.24.**

La Tabla V.25 detalla el porcentaje de eliminación de cada PAH con respecto al valor determinado en S_0 y la fracción biodisponible porcentual de cada hidrocarburo con respecto al total.

Tabla V.25. Porcentaje de eliminación y fracción biodisponible. Detalle de la eliminación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) respecto de los valores de S_0 y porcentaje biodisponible de cada compuesto luego de 6 meses de la segunda estimulación con compost acoplada a la aplicación de PS.

Compuesto	Eliminación [%]	Fracción biodisponible [%]
Naftaleno	0	<i>No detectado</i>
Acenaftileno	87	0.89
Acenafteno	100	<i>No detectado</i>
Fluoreno	100	<i>No detectado</i>
Fenantreno	87	18.27
Antraceno	92	0.73
Fluoranteno	74	2.10
Pireno	67	3.76
Benzo [a] antraceno	66	8.39
Criseno	80	10.38
Benzo [b] fluoranteno/ Benzo [k] fluoranteno	42	6.42
Benzo [a] pireno	60	0.58
Indeno [1, 2, 3 - cd] pireno	93	<i>No detectado</i>
Dibenzo [a, h] antraceno	-59	<i>No detectado</i>
Benzo [g, h, i] perileno	6	<i>No detectado</i>

Como se detalla en la Tabla V.25, se produjo la eliminación total de acenafteno, fluoreno, y un alto porcentaje de la eliminación de indeno [1, 2, 3 - cd] pireno, antraceno, fenantreno, acenaftileno, criseno y fluoranteno, con respecto a S_0 . Se encontró que el dibenzo [a, h] antraceno mostró un incremento significativo de su concentración con respecto del suelo antes de la aplicación de PS.

Esta estrategia incrementó los valores de biodisponibilidad de PAHs al 51.54 %, principalmente de fenantreno (3 anillos), criseno y benzo [a] antraceno, que son compuestos de 4 anillos aromáticos.

La medida del Carbono Total Disuelto (CTD) del microcosmos SOxDE fue significativamente mayor a la encontrada en el suelo original, y menor a la correspondiente a SOx₀, con un valor de $189 \pm 3 \text{ mg C L}^{-1}$.

La Figura V.30 presenta los resultados de los análisis espectroscópicos de los extractos (dilución 1:10).

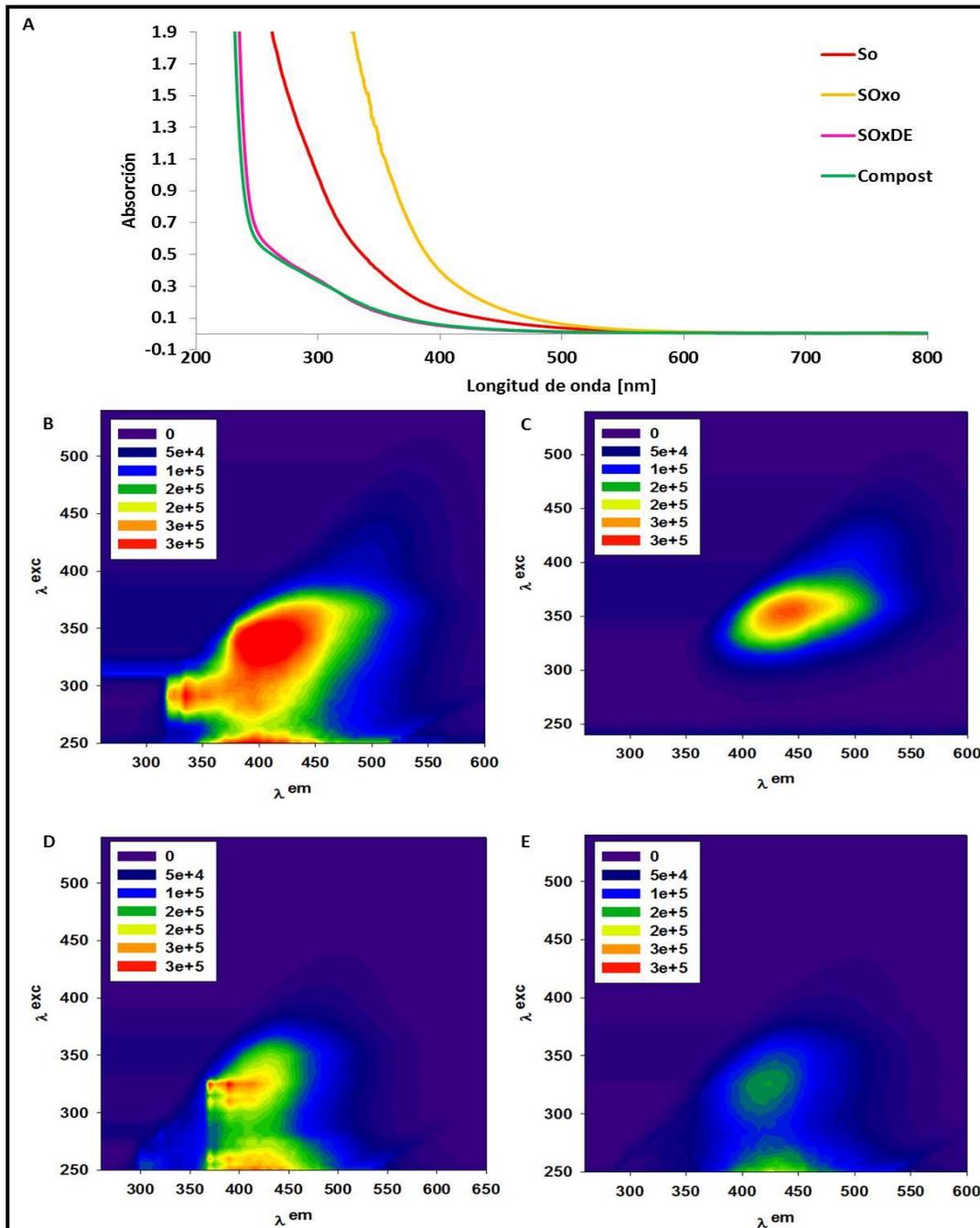


Figura V. 30. A. Espectro de absorción de S_0 . B. Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de S_0 . C. Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de SOx_0 . D. Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia de $SOxDE$. E. Matriz de Excitación Emisión de Fluorescencia del compost.

Del análisis de los espectros se encontró que la relación E_4/E_6 para estos microcosmos fue de 3.8, significativamente menor a la encontrada en S_0 y SOx_0 . El espectro de absorción de los extractos $SOxDE$ fue muy similar al encontrado en los correspondientes al compost.

La matriz de excitación emisión de fluorescencia de los extractos alcalinos de microcosmos $SOxDE$ mostró una región de emisión, correspondiente a sustancias húmicas del suelo se ubicó algo desplazada respecto de la Región 1, en λ_{ex} 325- λ_{em} 425 nm, y dos máximos de emisión posicionados, en λ_{ex} 325- λ_{em} 370, y λ_{ex} 325- λ_{em} 380 nm, región característica de emisión de los PAHs, Región 2.

Análisis de las poblaciones microbianas cultivables

Las Figuras V.31 y V.32 describen la dinámica de las poblaciones cultivables durante el tiempo de ensayo.

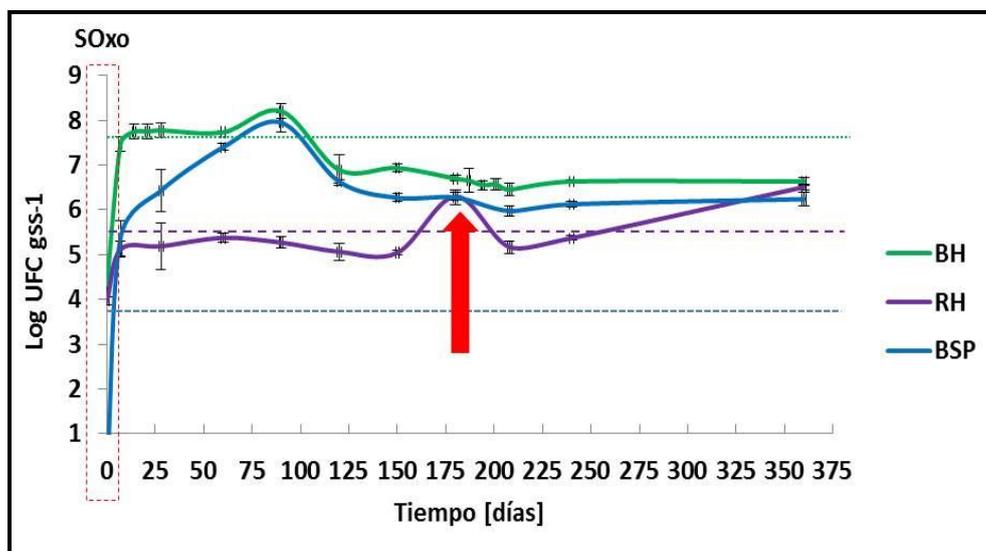


Figura V.31. Dinámica de las poblaciones de bacterias heterótrofas (BH), hongos (RH) y bacterias que solubilizan fósforo (BSP) durante el tratamiento en el microcosmos $SOxDE$. La flecha indica el momento del segundo agregado de compost. En líneas punteadas se indica el valor de las poblaciones correspondientes a S_0 , mientras que en el recuadro rojo el correspondiente a SOx_0

La aplicación del segundo estímulo mediante el agregado de compost luego de 6 meses de aplicada la primera enmienda, no evidenció cambios significativos sobre la densidad de las poblaciones BH ni de BSP, las cuales se mostraron estables hasta el final del tratamiento. La segunda estimulación con compost, produjo un rápido

incremento de la población de hongos, aunque de corta duración. El periodo comprendido entre el mes 8 y 12 de ensayo esta población mostró un incremento sostenido en el valor del recuento igualando en densidad a los valores de las poblaciones BH y BSP.

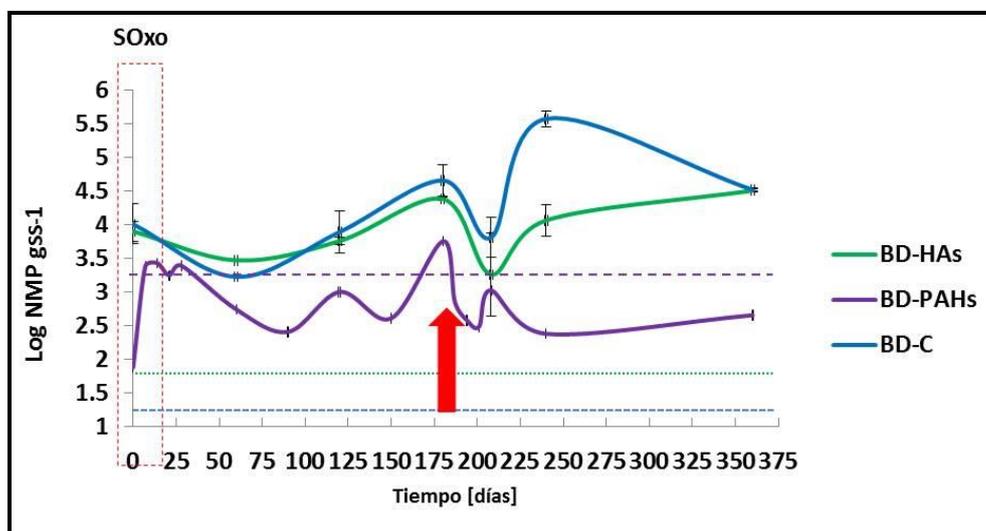


Figura V.32. Dinámica de las poblaciones de bacterias degradadoras de HAs (BD-HAs), degradadoras de PAHs (BD-PAHs) y degradadoras de celulosa (BD-C) durante el tratamiento en el microcosmos SOxDE. La flecha indica el momento del segundo agregado de compost. En líneas punteadas se indica el valor de las poblaciones correspondientes a S_0 , mientras que en el recuadro rojo el correspondiente a SO_{x0}

La segunda aplicación de compost produjo una reducción en la densidad de las poblaciones específicas de BD-HAs, BD-PAHs y BD-C. Con excepción de las BD-PAH, las poblaciones degradadoras comenzaron a incrementar su densidad hasta el final del tratamiento, estabilizándose en los valores superiores alcanzados luego de la primera estimulación. A diferencia de la población BD-HAs, las BD-C tuvieron un valor máximo luego de 2 meses de realizada esta segunda intervención.

Caracterización de la funcionalidad del suelo

La Figura V.33 describe la dinámica de la actividad deshidrogenasa durante el tiempo de ensayo. La segunda aplicación de compost estimuló la actividad dejando una actividad deshidrogenasa incrementada, al finalizar el tratamiento.

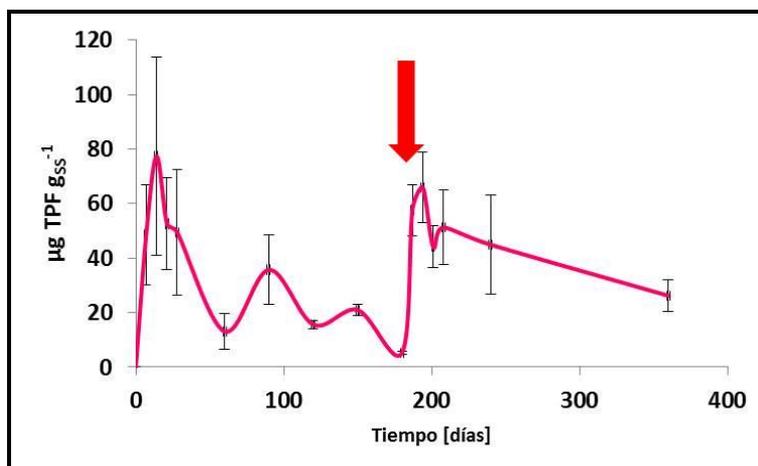


Figura V.33. Dinámica de la actividad deshidrogenasa de los microcosmos SOxDE durante todo el tiempo de ensayo. La flecha indica el momento de la segunda aplicación de compost.

La Tabla V.26 presenta los resultados enzimáticos al finalizar el tratamiento. Globalmente, se logró recuperar la funcionalidad del suelo. Las actividades lipasa, fosfatasa, ureasa y proteasa mostraron un incremento significativo con respecto a S₀, sin embargo, la actividad arilsulfatasa fue significativamente menor (no detectada).

Tabla V.26. Actividades enzimáticas estudiadas en la caracterización del suelo bioestimulado con dos agregados de compost luego de la aplicación de PS (SOxDE) al finalizar el tratamiento. Las medidas se realizaron por triplicado.

Actividad	S ₀	SOx ₀	SOxDE
Deshidrogenasa [µg TPF g _{SS} ⁻¹]	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>	26 ± 6
Lipasa [ng pNPg _{SS} ⁻¹]	189 ± 4 (c)	267 ± 6 (b)	1547 ± 358 (a)
Arilsulfatasa [ng pNPg _{SS} ⁻¹]	33 ± 1	35 ± 1	<i>No detectado</i>
Fosfatasa alcalina [ng pNPg _{SS} ⁻¹]	175 ± 24 (b)	84 ± 23 (c)	1191 ± 38 (a)
Fosfatasa ácida [ng pNPg _{SS} ⁻¹]	103 ± 20 (b)	51 ± 6 (b)	1210 ± 351 (a)
Ureasa [µgN-NH ₄ g _{SS} ⁻¹]	23 ± 6 (b)	<i>No detectado</i>	379 ± 17 (a)
Proteasa [mg Tyr g _{SS} ⁻¹]	<i>No detectado</i>	<i>No detectado</i>	0.07 ± 0.01

Ensayos de fitotoxicidad

La Figura V.34 muestra los resultados obtenidos en el test de toxicidad aguda utilizando los extractos provenientes de microcosmos SOxDE al finalizar el tratamiento.

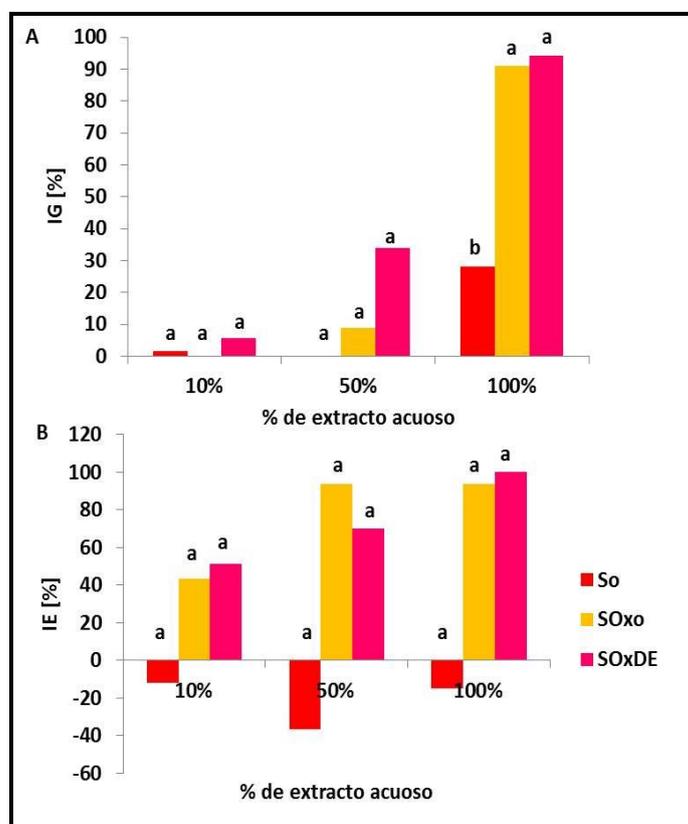


Figura V.34. Ensayos de fitotoxicidad de los extractos acuosos de S₀, SO_{x0} y SO_{xDE}. **A:** Índice de Inhibición de la germinación (IG %). **B:** Índice de Inhibición en la elongación radicular (IE %). Los ensayos se realizaron utilizando extractos acuosos del suelo original (S₀) y de los microcosmos de SO_{x0} y SO_{xDE}.

Los microcosmos SO_{xDE} sin diluir (100 %) mostraron un IG % significativamente superior al control y al valor medido en S₀ sin mostrar cambios con el correspondiente a SO_{x0}.

Estos extractos también mostraron efecto significativo en el IE %, revirtiendo el efecto observado en S₀, promoviendo el desarrollo de plántulas con radículas de menor longitud y mayor diámetro, e hipocótilos de menor longitud que las correspondientes a extractos del suelo original.

Discusión

El pH de los microcosmos SOxDE, al final del tratamiento fue menor a los determinados tanto en S₀ como de SOx₀, y atribuido a la actividad biológica en estos microcosmos. El contenido de C y N fue superior, así como el contenido de P, con respecto a S₀ y SOx₀, debido al aporte proporcionado por la enmienda utilizada, sin mostrar mayores diferencias con los valores correspondientes a los microcosmos SOxE. Debido al tratamiento oxidativo con PS la concentración de sulfatos, si bien fue menor a la determinada en SOx₀, resultó significativamente aumentada en SOxDE, al igual que en los tratamientos SOxC y SOxE, con respecto a S₀.

La segunda aplicación de enmienda estimuló la eliminación de HAs de al menos el 45 % con respecto a S₀, aun resultando el compost una fuente potencial de hidrocarburos alifáticos (Plaza y col., 2009). Al igual que en tratamientos anteriores, la mayor eliminación se observó en la fracción de HAs livianos. A causa de la eliminación, se evidenció una reestructuración en la abundancia relativa de estos hidrocarburos, en donde se observó el predominio de las fracciones de HAs de cadena intermedia y pesada. Esta eliminación podría estar asociada a la densidad de poblaciones degradadoras de HAs y celulosa, que mostraron un valor máximo luego de 2 meses de realizada la segunda aplicación de compost.

El valor de CTD en los microcosmos SOxDE fue significativamente menor al encontrado en SOx₀, lo que evidencia la activa degradación biológica de los compuestos solubles (Antizar-Ladislao y col., 2006b) asociado al sostenido nivel de las poblaciones bacterianas generalistas y degradadoras de HAs, que superó al encontrado en S₀. No obstante, el contenido residual de HAs fue mayor que el determinado en los microcosmos SOxE.

Finalizado el tratamiento, el valor de CTD fue aun superior al encontrado en SOxE, y al igual que en este microcosmos la relación E₄/E₆ fue baja sugiriendo un mayor contenido de SH de alto grado de condensación (Morán Vieyra y col., 2009).

Aun considerando la dilución del suelo producida por el doble agregado de compost en SOxDE, los compuestos de 3 y 4 anillos aromáticos fueron los que mostraron mayor descenso relativo. Esta estrategia fue el único tratamiento acoplado

a la aplicación de PS donde no se observó “desecuestramiento” de benzo [*g, h, i*] perileno. La eliminación de PAHs no se vio reflejada en la densidad de su población degradadora, que solo alcanzó el valor determinado en el suelo antes de los tratamientos, luego de 6 meses de aplicada la primer enmienda.

Finalizado el tratamiento, la funcionalidad global del suelo se vio expresada con mayor intensidad que en los microcosmos SOxE, lo que permite inferir que la comunidad microbiana aún podría estar metabolizando activamente distintos compuestos. Particularmente, la mayor actividad lipasa permite inferir que prolongando la incubación podría reducirse aún el residual de hidrocarburos (Brzeszcz y col., 2016). La ausencia de actividad arilsulfatasa fue atribuida a la inhibición por el alto contenido de sulfatos en el suelo, como consecuencia del tratamiento oxidativo.

Si bien se observó eliminación de los contaminantes, los extractos acuosos provenientes de los microcosmos SOxDE no lograron revertir el efecto fitotóxico ocasionado luego de la aplicación de PS, evidenciados tanto en el IG % como en el IE %. Sin embargo, las plántulas desarrolladas con extractos diluidos fueron similares a las del control, sugiriendo un retardo en la germinación de las semillas y el desarrollo posterior de las plántulas provocado por la elevada CE, el alto contenido de sulfatos, la posible acumulación de productos de degradación de hidrocarburos y la mayor biodisponibilidad de PAHs observada. Estos son factores que influyen negativamente en el proceso germinativo, pudiendo provocar alteraciones morfológicas, retardo germinativo o incluso la inhibición del proceso de germinación (Masakorala y col., 2013).

Comparación de los tratamientos

Las estrategias aplicadas para promover la eliminación de hidrocarburos del suelo crónicamente contaminado y oxidado pudieron ser divididas según el modo de incrementar la actividad biológica del suelo post tratamiento oxidativo.

c) A través de la corrección y mantenimiento de la humedad, temperatura y aireación del suelo en los microcosmos SOx_A con la intención de aumentar la actividad de la comunidad microbiana autóctona.

d) Mediante el agregado de materia orgánica y comunidad asociada (alóctona) con la intención de aumentar la concentración de materia orgánica disponible y densidad de poblaciones microbianas, en los microcosmos SOx_C, SOx_E y SOx_{DE}.

Las Figura V.35 y V.36 muestran la concentración de HAs y PAHs remanente en los microcosmos al finalizar los tratamientos, en comparación con el valor de concentración determinado en el suelo original, S₀.

Como puede apreciarse en la Figura V.35, todas las intervenciones realizadas sobre el suelo luego de la remediación química mostraron en distinta medida, la significativa eliminación de HAs, independientemente de la modalidad empleada, principalmente de HAs de cadena liviana. Esta eliminación osciló entre el 45 % y el 68 % de eliminación.

A causa del empleo de enmiendas orgánicas, los microcosmos SOx_C, SOx_E y SOx_{DE} resultaron con una mayor abundancia relativa de HAs de cadena pesada, reflejando la dinámica del tratamiento, descrita en el **Capítulo IV** y en las discusiones previas.

La aplicación de PS produjo la eliminación del 30 % de PAHs en los microcosmos SOx₀, principalmente de la fracción de bajo peso molecular (Figura V.36).

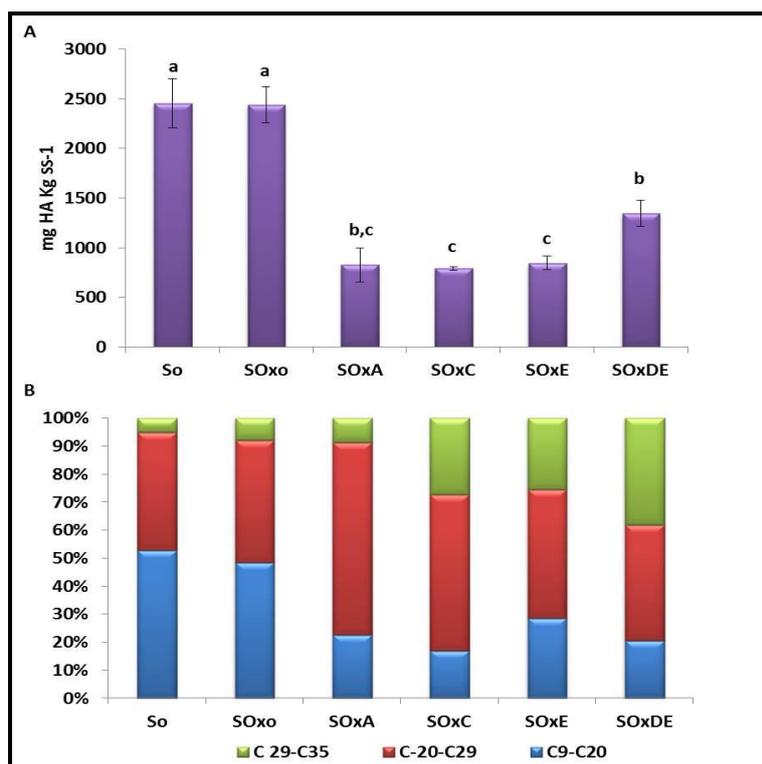


Figura V.35. Contenido de Hidrocarburos Alifáticos (HAs) de los sistemas suelo original (S₀) y microcosmos de suelo post aplicación de PS (SOx₀), suelo oxidado acondicionado (SOxA), suelo oxidado compostado (SOxC), suelo oxidado estimulado con compost (SOxE y SOxDE) al finalizar los tratamientos. A. Contenido total de HAs, expresado como mg de compuesto kg_{SS}⁻¹. B. Composición relativa [%].

La estimulación de la comunidad microbiana autóctona mediante el acondicionamiento promovió una eliminación adicional del 25 % de PAHs, con respecto a SOx₀, con mayor eliminación de compuestos de 3 anillos aromáticos y con la acumulación de PAHs de alto peso molecular.

El tratamiento de compostaje y estimulación con compost, microcosmos SOxC y SOxE, promovieron una eliminación adicional del 34 % y 29 % de PAHs, respectivamente, probablemente a causa de la dilución por el agregado de enmiendas. No obstante, se observó mayor eliminación de compuestos de 3 y 4 anillos aromáticos, con la acumulación de la fracción de PAHs de 5 anillos. La doble estimulación con compost, microcosmos SOxDE, presentó una eliminación del 62 % adicional en el contenido de PAHs, con respecto a SOx₀.

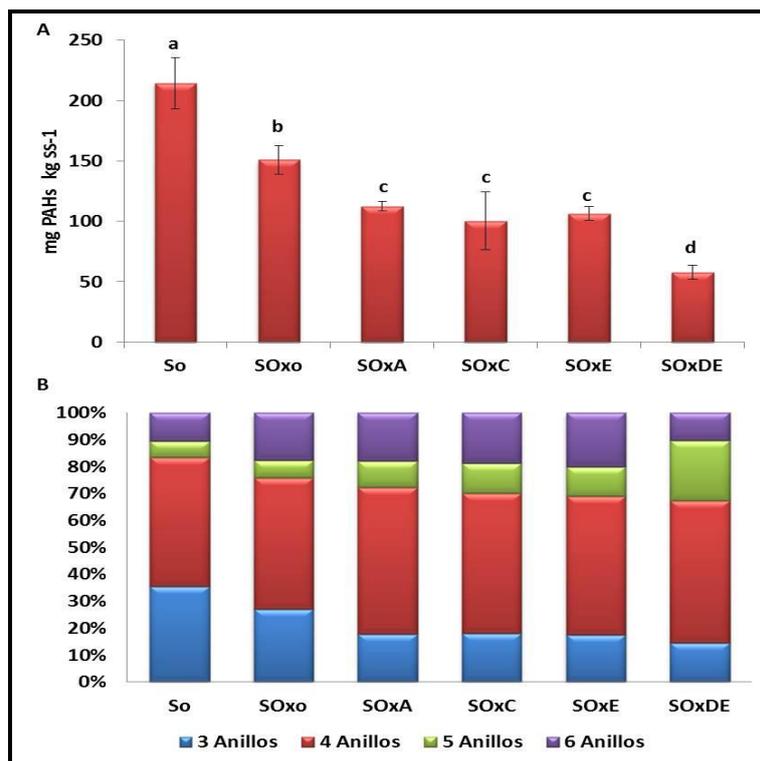


Figura V.36. Contenido de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs) de los sistemas suelo original (S_0), y microcosmos de suelo post aplicación de PS (SOx_0), suelo oxidado acondicionado ($SOxA$), suelo oxidado compostado ($SOxC$), y suelo oxidado estimulado con compost ($SOxE$ y $SOxDE$) al finalizar los tratamientos. **A.** Contenido total de PAHs, expresado como mg de compuesto kg_{SS}^{-1} . **B.** Composición relativa [%].

Con la intención de hacer un análisis comparativo de los tratamientos, evaluando su influencia en las propiedades biológicas de los microcosmos, se realizó un análisis de componentes principales. La Figura V.37 muestra el gráfico obtenido según los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2), que explican el 73.4 % de la varianza total. La Tabla V.27 presenta la contribución de cada variable en PC1 y PC2. La línea punteada representa la distancia euclídea que separa los tratamientos.

Como muestra la figura, S_0 , SOx_0 y $SOxA$ son los microcosmos con mayor asociación a la concentración de PAHs residual y al mayor contenido de HAs de cadena liviana e intermedia. La separación de estos microcosmos de aquellos estimulados con enmiendas orgánicas pudo atribuirse al mayor contenido de C, N y P, resultando una mayor funcionalidad y densidad de poblaciones especialistas de BSP, degradadoras de HAs y de celulosa. El desplazamiento observado del microcosmos $SOxDE$, respecto de $SOxC$ y $SOxE$ refleja la mayor intensidad a las variables antes descriptas.

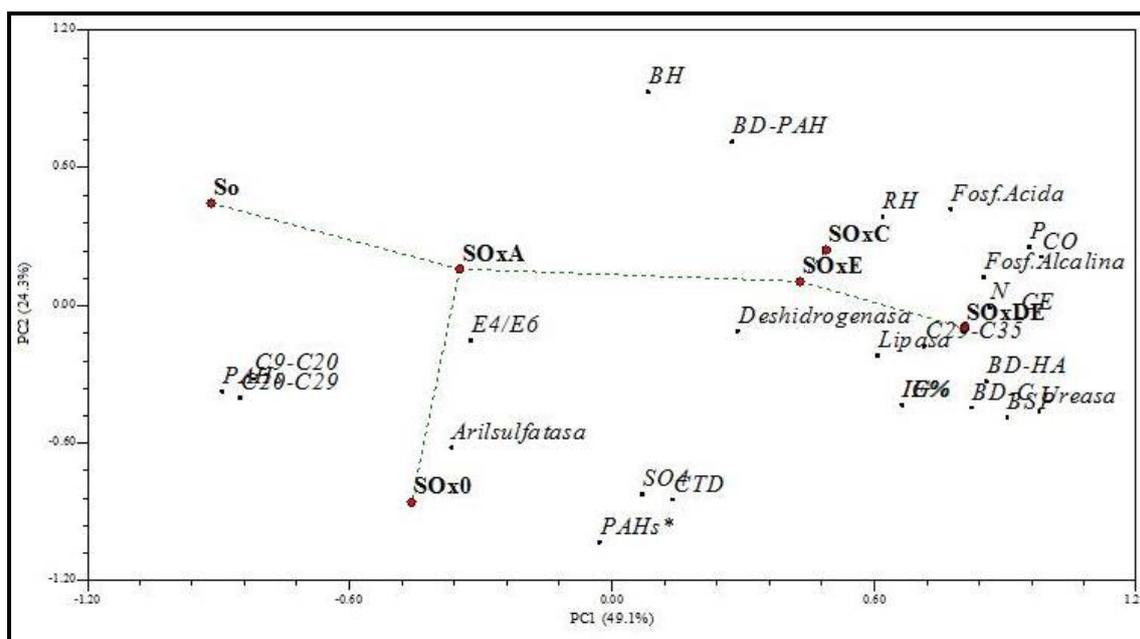


Figura V.37. Análisis de Componentes Principales aplicado a las variables físicas, químicas y biológicas determinadas en los microcosmos S_0 , SO_{x0} , SO_{xA} , SO_{xC} , SO_{xE} y SO_{xDE} al finalizar los tratamientos.

Los microcosmos S_0 y SO_{xA} se separaron de los microcosmos SO_{x0} en el Componente 2, atribuyendo esta separación a la concentración significativamente aumentada de sulfatos, de CTD y de PAHs biodisponibles en SO_{x0} , y a la recuperación de la población de BH en SO_{xA} .

Tabla V.27. Detalle de la contribución de cada variable analizada mediante la comparación de sistemas realizada en el ACP, en el Componente Principal 1 (PC1) y en el Componente Principal 2 (PC2).

Variable	PC1	PC2
CO	0.9850	0.2112
N	0.8618	-0.0076
P	0.9543	0.2553
CTD	0.1398	-0.8471
E ₄ /E ₆	-0.3223	-0.1503
CE	0.9316	-0.0548
SO ₄ ²⁻	0.0696	-0.8219
C9 – C20	-0.8204	-0.3182
C20 – C29	-0.8501	-0.4035
C29 – C35	0.7163	-0.1746
PAHs	-0.8924	-0.3714
PAHs* (Biodisponibles)	-0.0288	-0.9999
Deshidrogenasa	0.2865	-0.1096
Lipasa	0.6075	-0.2157
Arilsulfatasa	-0.3669	-0.6147
Ureasa	0.9783	-0.4641
Fosfatasa alcalina	0.8501	0.1231
Fosfatasa acida	0.7755	0.4216
BH	0.0823	0.9318
BSP	0.9054	-0.4844
RH	0.6212	0.3866
BD-PAHs	0.2765	0.7184
BD-HAs	0.8584	-0.3317
BD-C	0.8221	-0.4466
IG %	0.6640	-0.4311
IE %	0.6640	-0.4311

En negrita se resaltan los valores que fueron mayor o igual a 2/3 del valor máximo encontrado en cada componente, lo que indica que la variable contribuye a explicar la varianza del sistema en ese componente.

Análisis multivariado de las matrices de excitación emisión de fluorescencia

Con la intención de interpretar los cambios observados en las matrices de excitación emisión de fluorescencia (MEEF), de modo análogo a lo desarrollado en el **Capítulo IV**, se realizó el estudio integrado, mediante el análisis *Parallel Factor* (PARAFAC).

Con este objetivo, se empleó un extracto del suelo SP, un extracto del compost maduro y una solución saturada de los 16 PAHs (mix) para identificar e interpretar la

contribución de cada familia de compuestos, y su naturaleza, en los extractos de los suelos, antes y después de los distintos tratamientos.

Para lograr resolver los espectros de modo satisfactorio, logrando observar un máximo de emisión por especie, se requirieron un mínimo de 11 especies distintas en el análisis. La Figura V.38 presenta los espectros de emisión correspondiente a cada especie encontrada.

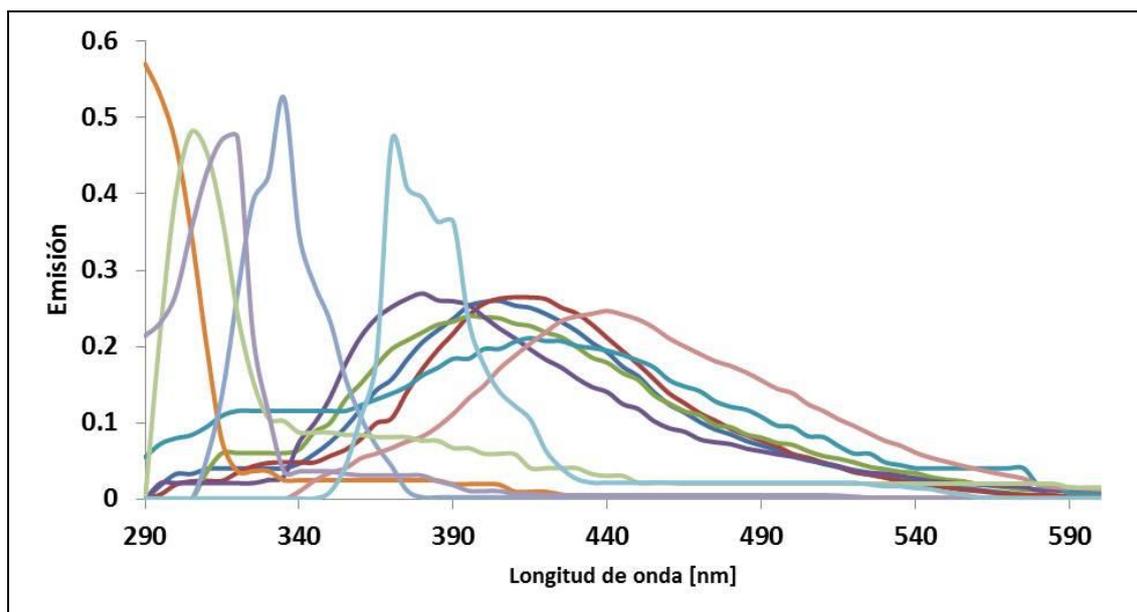


Figura V.38. Espectros de emisión de cada especie fluorófora encontrada

La Figura V.39 presenta los resultados de la contribución relativa de cada familia en el análisis integral, presentes en los extractos de los sistemas estudiados. El color de las especies se corresponde en ambas figuras (38 y 39). Como se mencionó en el **Capítulo IV**, las especies que mostraron su máximo de emisión a mayor longitud de onda se corresponden con las SH, mientras que los de menor longitud de onda (< 350 nm) se asocian a los PAHs (Ferretto y col., 2014).

Para la solución saturada de los 16 PAHs (mix) se distinguieron 4 especies como principales contribuyentes (con una contribución a la fluorescencia total > 7 %). En el extracto de SP se encontraron 7 especies de fluoróforos, 6 de las cuales también se detectaron en el extracto de compost, pero en distinta proporción. Las especies principales para SP y para el compost no se distinguieron en la mezcla de PAHs (o su contribución fue despreciable). Tampoco se apreció la contribución de los fluoróforos

de PAHs en el extracto de compost. Por lo tanto, el análisis realizado resuelve correctamente los 3 controles utilizados (SP, Mix y compost).

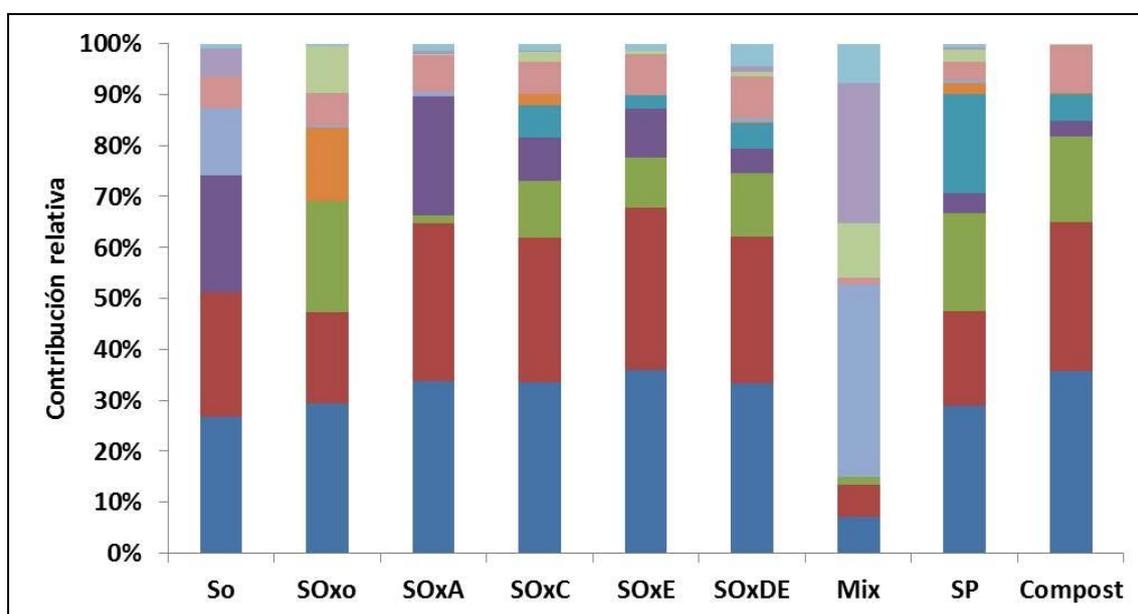


Figura V.39. Contribución relativa de cada familia de fluoróforos presentes en los extractos de cada microcosmos, solución acuosa saturada de PAHs (mix) y extractos de SP y compost.

En la Figura IV.40.A se muestra la intensidad de fluorescencia de cada extracto, y en la Figura IV.40.B la contribución de la fluorescencia aportada por los PAHs y por la MOS a la fluorescencia total de cada extracto.

En la figura se observa que las especies comunes en los extractos de SP no estuvieron representadas en el extracto de la mezcla de PAHs, o si lo estuvieron, su contribución fue mínima. Del mismo modo, no fue apreciada la contribución de los fluoróforos de PAHs en el extracto de compost. La pequeña contribución de éstos en el extracto de SP podría atribuirse a la contaminación difusa del suelo del predio, como se mencionó en el **Capítulo IV**, permitiendo afirmar que el análisis realizado resuelve correctamente los 3 controles utilizados (SP, Mix y compost).

Para completar el análisis fueron considerados los parámetros CTD y las relaciones E_4/E_6 , previamente determinadas en los distintos extractos de suelo luego de los tratamientos, que se presentan en la Tabla V.28.

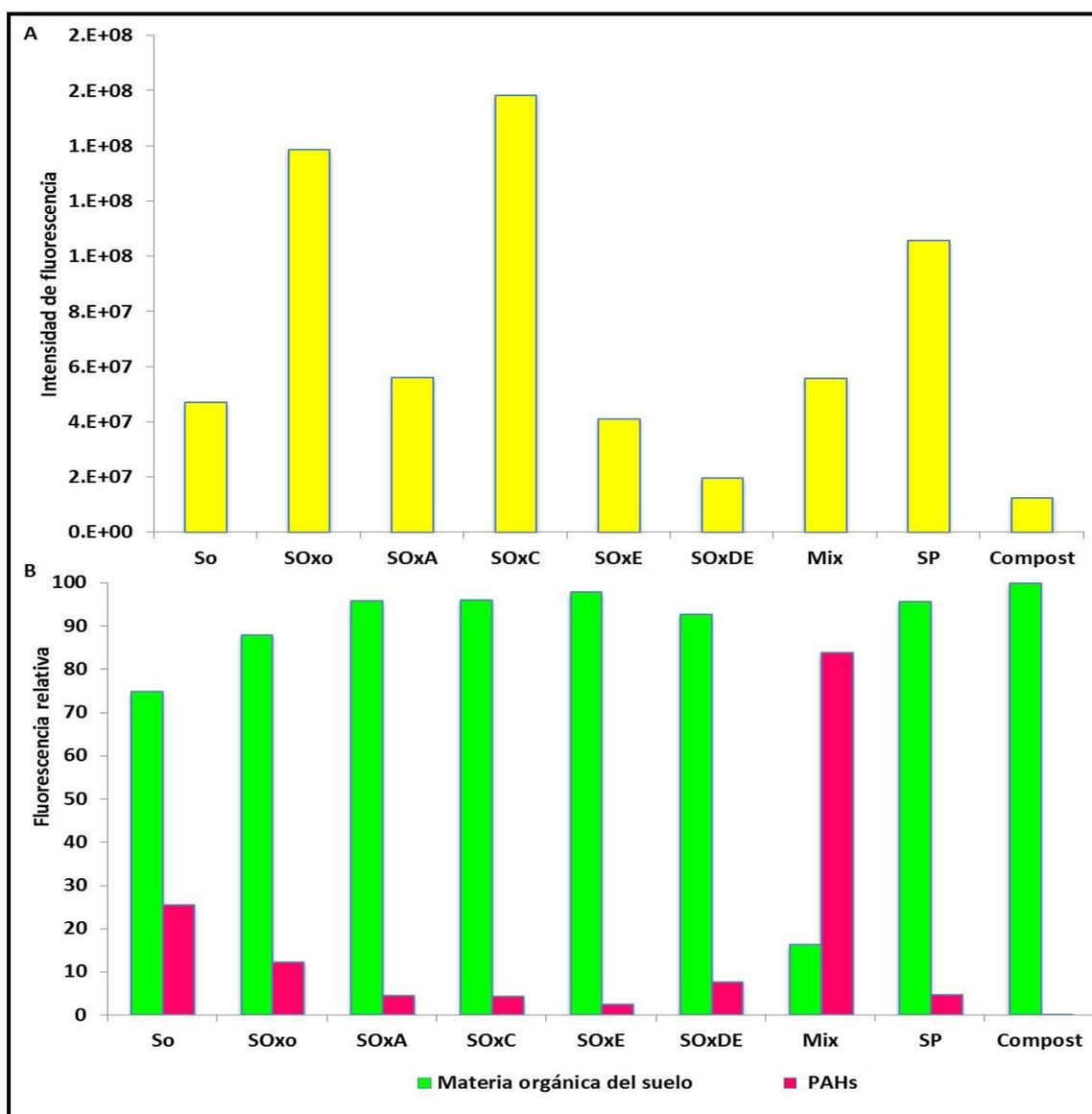


Figura V.40. A. Fluorescencia total en cada microcosmos. B. Contribución a la fluorescencia total aportada por los PAHs y por la materia orgánica del suelo en los extractos de cada microcosmos.

Tabla V.28. Valores de Carbono Total Disuelto (CTD, [mg L⁻¹]) y relación E₄/E₆ obtenida del análisis de los extractos alcalinos de los diferentes microcosmos.

Propiedades	S ₀	SOx ₀	SOxA	SOxC	SOxE	SOxDE	Compost	SP
CTD [mgL ⁻¹]	96 ± 3 (d)	226 ± 2 (a)	57 ± 2 (f)	62.22 ± 0.05 (e)	138 ± 2 (c)	189 ± 3 (b)	363 ± 3	151 ± 1
E ₄ /E ₆	15.0	17.7	7.1	23.0	3.8	3.8	4.6	13.7

La fluorescencia encontrada en S₀ correspondió un 74.7 % al aporte de la materia orgánica, mientras que un 25.3 % a la presencia de PAHs (Figura V.40.B).

La aplicación de PS produjo un incremento en la fluorescencia total de aproximadamente 300 % en los extractos alcalinos de SOx_0 , probablemente debido al incremento del CTD enriquecido en compuestos de naturaleza fluorescente, en mayor proporción que la correspondiente a S_0 , Tabla 28. Un 87.9 % de la fluorescencia del extracto de SOx_0 fue atribuida a la materia orgánica (Figura V.39). El cambio en la composición relativa de los fluoróforos encontrado en SOx_0 , con respecto a la correspondiente en S_0 , explicaría el leve corrimiento observado de la Región 1 de la MEEF con respecto a la posición en S_0 , atribuido al efecto oxidativo del PS sobre la MOS. La ausencia de la Región 2 en la MEEF de estos microcosmos sería atribuida al incremento del CTD que podría interferir en la extracción de los PAHs.

El acondicionamiento del suelo (microcosmos $SOxA$) produjo un leve aumento de la intensidad de fluorescencia de los extractos, con respecto a S_0 . En estos extractos se observó la reestructuración de la contribución de fluorescencia de cada familia de fluoróforos presentes en la muestra, con respecto de la correspondiente a SOx_0 , asociado al corrimiento de la Región 1 observado en la MEEF de estos microcosmos. Este corrimiento refleja la humificación (baja relación E_4/E_6) de la MOS producto del metabolismo de poblaciones resilientes.

Sin embargo, la fluorescencia total en estos microcosmos fue menor que la encontrada en SOx_0 , acorde al descenso del CTD encontrado. Estos cambios pueden ser atribuidos a la actividad biológica en los microcosmos, con aumento de biomasa a expensas de la materia orgánica fácilmente asimilable incrementada luego de la aplicación de PS.

Teniendo en cuenta lo observado en estos microcosmos: la incrementada biodisponibilidad de los PAHs y la ausencia de la Región 2 en la MEEF, se podría sugerir la asociación de los PAHs a las SH insolubles (huminas).

El compostaje y la estimulación con compost (una y dos aplicaciones), microcosmos $SOxC$, $SOxE$ y $SOxDE$, también provocaron cambios que se vieron reflejados en un incremento en la abundancia relativa de las especies presentes en los extractos de SP y del Compost, difiriendo sustancialmente de la composición observada tanto para S_0 como para SOx_0 . La contribución relativa de cada fluoróforo en estos tres microcosmos resultó equivalente. El menor grado de humificación de

SOxC (alta relación E_4/E_6) y la presencia de una especie fluorófora adicional permitiría explicar el desplazamiento del máximo de emisión correspondiente a la Región 1 observada en estos microcosmos con respecto a los máximos encontrados en los microcosmos estimulados con compost.

La fluorescencia total de los microcosmos SOxC se incrementó con respecto a la encontrada en SOx₀, mientras que en SOxE y SOxDE fue menor. Sin embargo, la contribución de fluorescencia aportada por los PAHs a la fluorescencia total fue relativamente baja en los tres microcosmos, con respecto a la correspondiente a S₀ (4.0, 2.3 y 7.4 % respectivamente). En el mismo sentido, la mayor fluorescencia total de los microcosmos SOxC y la alta relación E_4/E_6 encontrada en estos, es indicativa de un extracto enriquecido en compuestos fácilmente asimilables, de naturaleza fluorescente.

En los microcosmos SOxE y SOxDE el valor de CTD fue superior que el correspondiente a S₀ y SOxC. Considerando la baja relación E_4/E_6 , se puede inferir que la mayor concentración de CTD determinada en los microcosmos estimulados se correspondería a compuestos de alto grado de condensación de menor rendimiento de fluorescencia, evidenciando una MOS de distinta naturaleza.

De modo análogo a lo observado en SOxA, la alta biodisponibilidad de los PAHs y la ausencia de la Región 2 en la MEEF de los extractos de los microcosmos de SOxC y SOxE, sugiere la asociación de los PAHs a las huminas, impidiendo así su visualización.

Debido a la presencia de la Región 2 en la MEEF de los extractos de los microcosmos SOxDE, la asociación de los PAHs a las huminas se vería retrasada por la segunda intervención. Esta asociación resultaría independiente del tratamiento aplicado (compost maduro vs compostaje) y de la calidad de la materia orgánica (E_4/E_6). Estos resultados permiten inferir que la asociación de los PAHs del suelo con la esta fracción de las SH (huminas) sería dependiente del tiempo de tratamiento.

Impacto de los tratamientos sobre el potencial degradador de las comunidades bacterianas del suelo

En esta parte del trabajo, se optimizaron las condiciones para la amplificación mediante *real time* PCR de los genes 16S rARN, RHD α -GP y RHD α -GN utilizando ADN proveniente de S₀. La cantidad óptima de ADN molde fue 0.05 ng, y las temperaturas de *annealing* para cada gen estudiado fueron 63, 50 y 55.4°C, respectivamente. Los productos de PCR, que se visualizaron en geles de agarosa 2% (p/v) teñidos con GelRed, fueron del tamaño esperado para cada amplicon y mostraron una única banda. Las curvas de *melting* mostraron un único pico.

Los clones GN1 (número de acceso: KU608343) y GP5 (número de acceso: KU608338) obtenidos en el **Capítulo III** (Ver Anexo VI), se usaron para la construcción de las curvas de calibración para la cuantificación de los genes dioxigenasa. También se clonó el gen 16S rARN de *B. canariense* GV102, que se utilizó para la calibración de la cuantificación del gen 16S rARN.

Las curvas de calibración obtenidas se muestran en la Figura V.41. Las eficiencias de las reacciones se calcularon a partir de las curvas y fueron 85.7, 73.7 y 91.8 % para RHD α GN, RHD α GP y 16S rADN respectivamente.

La presencia de inhibidores se determinó utilizando un plásmido conteniendo el gen de la Kanamicina, como se describió en materiales y métodos, el cual no fue detectado en ninguna muestra ambiental. No se encontró inhibición en las muestras de S₀, SO_{x0}, SO_{xA}, SO_{xDE} ni SO_{xC}.

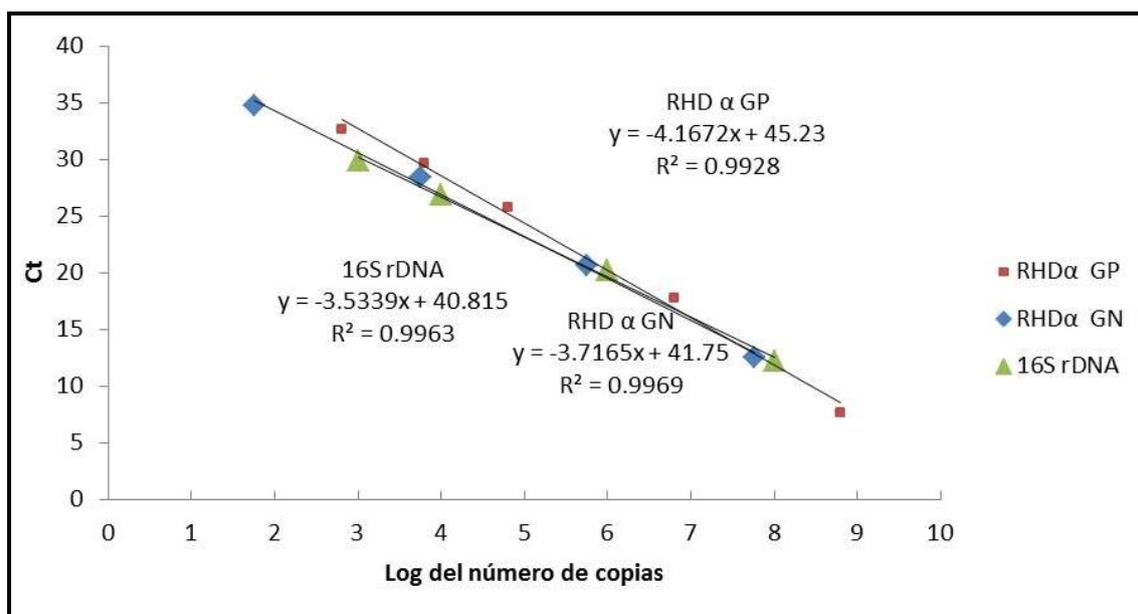


Figura V.41. Curvas de calibración para la cuantificación de genes mediante *real time* PCR. Curvas de calibración de los genes 16S rARN, RHDα GN y RHDα GP mediante *real time* PCR, obtenidas mediante el gráfico del logaritmo del número de copias (equivalente al número de plásmidos) vs el valor de Ct, que expresa el número de ciclos requeridos para incrementar la señal de fluorescencia por encima del valor de base (*threshold line*).

La Tabla V.29 muestra los valores del número de copias del gen 16S rARN y genes dioxigenasas para ambas poblaciones potencialmente degradadoras de PAH (RHDα GP y GN), determinados en el suelo antes y después del tratamiento oxidativo y a diferentes tiempos durante el acondicionamiento en los microcosmos SOxA.

Tabla V.29. Número de copias de los genes 16S rARN, RHDα GN y RHDα GP. Dinámica del número de copias de los distintos genes cuantificados por *real time* PCR durante el tratamiento de acondicionamiento y valores relativos al número de copias del gen 16S rARN, indicado como porcentaje.

Microcosmos	Número de copias			% (RHDα / 16S rADN)	
	16S rARN/g _{SS}	RHDα GN/ g _{SS}	RHDα GP/ g _{SS}	RHDα GN	RHDα GP
S ₀	1.22E+09 (B)	4.92E+06	1.00E+08 (a)	0.4	8
SOx ₀	2.92E+08 (C)	<i>No detectado</i>	7.65E+05 (c)	-	0.3
SOxA (1 mes)	1.71E+09 (B)	<i>No detectado</i>	4.68E+06 (c)	-	0.3
SOxA (6 meses)	7.21E+08 (C)	<i>No detectado</i>	3.19E+05 (c)	-	0.04
SOxA (9 meses)	5.06E+09 (A)	<i>No detectado</i>	6.00E+07 (b)	-	1
SOxA (12 meses)	4.01E+08 (C)	<i>No detectado</i>	8.48E+07 (a,b)	-	21

En la tabla se aprecia el predominio del número de copias del gen RHDα GP (8 %) y del RHDα GN (0.4 %) en S₀. Estos resultados pueden asociarse con la presencia de miembros del género *Mycobacterium* y *Pseudomonas* determinados en el mismo suelo

(Capítulo III) como representantes de las poblaciones degradadoras de PAH de Gram-positivos y Gram-negativos, respectivamente.

La Figura V.42 muestra el impacto del PS sobre las poblaciones bacterianas autóctonas resilientes en el suelo post oxidación.

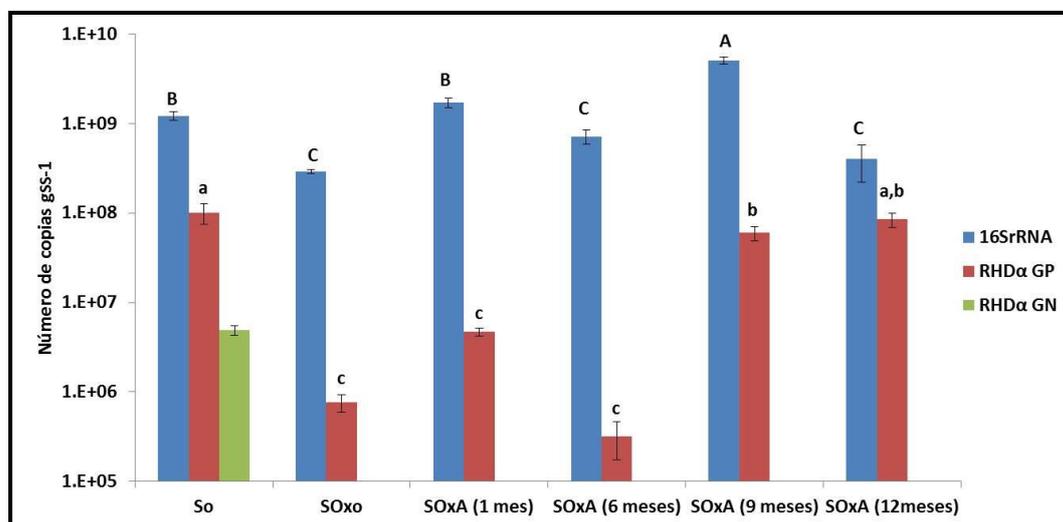


Figura V.42. Dinámica del número de copias de los genes 16S rARN, RHDα GN y RHDα GP cuantificados por real time PCR, expresados por gramo de suelo seco, durante el tratamiento de acondicionamiento post aplicación de PS.

La aplicación de PS provocó un significativo impacto sobre la comunidad total del suelo, reduciendo en aproximadamente un 1 orden de magnitud el número de copias del gen 16S rARN y en 2 ordenes en número de copias del gen RHDα GP, representando este último un 0.3 % de la población. Más aún, en estos microcosmos no se detectaron copias del gen RHDα GN. Otros autores han estudiado el impacto de la aplicación de persulfato de sodio sobre suelos crónicamente contaminados, en términos de poblaciones generalistas (16S rARN) y poblaciones especialistas (genes *alkB*). Sutton y col., (2014c), tratando suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos, mediante la aplicación de PS (0.3 g de persulfato de sodio/ g_{SS}) en sistemas *batch* no detectaron genes 16S rARN ni *alkB* inmediatamente luego de la aplicación de PS. Sin embargo, cuando emplearon H₂O₂ (en igual dosis) encontraron la reducción de 1 orden en el número de copias del gen 16S rARN, sin observar variaciones en el número de copias del gen *alkB*. Richardson y col., (2011) determinaron un descenso del número de genes 16S rARN, entre 2 y 3 ordenes, luego de la aplicación de persulfato de sodio en sistemas de suelo en columna, empleando

una dosis similar a la utilizada en nuestro trabajo (0.027 g de persulfato de sodio/ g_{SS}) y la inhibición de la población especialista degradadora de fenantreno. Estos resultados sugieren una resistencia diferencial de las diferentes poblaciones al persulfato dependiendo de la dosis de oxidante y del modo de administración.

Luego de 1 mes de iniciado el tratamiento de acondicionamiento, se observó aumento del número de copias del gen 16S rARN, recuperando el valor determinado en S₀. El número de copias del RHDα GP no evidenció cambios significativos de recuperación hasta después de 9 meses de incubación. Al final del tratamiento, SOxA evidenció un descenso del número de copias del gen 16S rARN, resultando en un enriquecimiento de la población GP potencialmente degradadora de PAHs. Durante todo el tiempo de monitoreo no fueron detectadas copias del gen RHD α GN.

La recuperación de las poblaciones resistentes fue atribuida a la mayor disponibilidad de nutrientes provocado por la oxidación, a través del aumento del CTD, sumado a la mayor disponibilidad de PAHs, permitiendo asociar esto último a la eliminación microbiológica de hidrocarburos encontrada durante el tratamiento. Respecto a la recuperación diferencial de las poblaciones, Richardson y col., 2011 describen la recuperación temprana de la población generalista, y tardía de la población especializada potencialmente degradadora de fenantreno. Los autores sugirieron que la recuperación diferencial sería causada por la tolerancia específica de cada población a las condiciones oxidativas. En nuestro trabajo, la sensibilidad particular de cada población frente al estrés oxidativo, se evidenció también en la falta de recuperación de los genes RHD α GN. Contrariamente, Sutton y col., 2014a describen la pronta recuperación de las poblaciones, luego de la aplicación de PS en un tratamiento por inyección del oxidante en suelo. En este caso, los autores atribuyen la recuperación a que el contacto de los microorganismos con el oxidante podría ser menor a causa de la heterogeneidad del suelo y al contacto con aguas subterráneas, que podrían estar aportando microorganismos al suelo continuamente.

La Tabla V30 y la Figura V.43 presentan los resultados de la cuantificación de los distintos genes realizada sobre material de los microcosmos al final de cada tratamiento de remediación biológica post tratamiento oxidativo con PS.

Tabla V.30. Número de copias de los genes 16S rARN, RHD α GN y RHD α GP. Número de copias de los distintos genes cuantificados por *real time* PCR en el suelo original (S₀), luego de la aplicación de PS (SOx₀) y al finalizar los tratamientos de remediación biológica acoplados; y valores relativos al número de copias del gen 16S rARN, indicado como porcentaje.

Microcosmos	Número de copias			% (RHD α / 16S rARN)	
	16S rARN	RHD α GN	RHD α GP	RHD α GN	RHD α GP
S ₀	1.22E+09 (B)	4.92E+06	1.00E+08(c)	0.4	8
SOx ₀	2.92E+08 (B)	No detectado	7.65E+05 (c)	-	0.3
SOxA	4.01E+08 (B)	No detectado	8.48E+07 (c)	-	21
SOxC	7.12E+10 (A)	No detectado	3.34E+08 (b)	-	0.5
SOxDE	5.11E+10 (A)	No detectado	7.60E+08 (a)	-	1.5

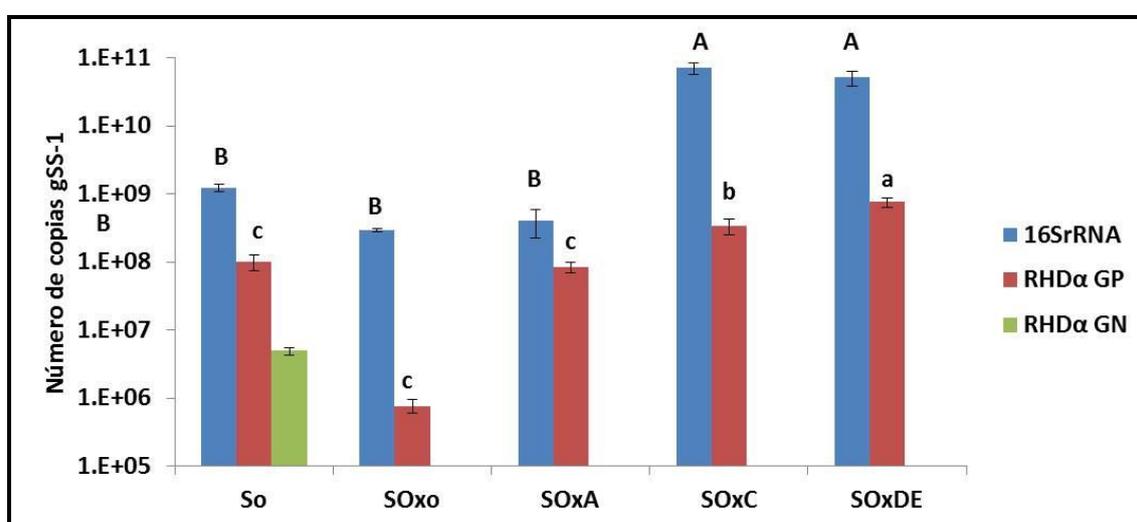


Figura V.43. Número de copias de los genes 16S rARN, RHD α GN y RHD α GP cuantificados por *real time* PCR, expresados por gramo de suelo seco, en el suelo original (S₀), luego de la aplicación de PS (SOx₀) y al finalizar los tratamientos de remediación biológica acoplados.

En el análisis comparativo de los tratamientos combinados puede apreciarse que el número de copias del gen 16S rARN fue similar en los microcosmos SOxDE y SOxC, y significativamente superior al encontrado en S₀. El resultado fue atribuido a la estimulación de la comunidad bacteriana por las enmiendas aplicadas en cada tratamiento. No obstante, las enmiendas únicamente evidenciaron la estimulación de la población RHD α GP, potencial degradadora.

La densidad de poblaciones estimadas por qPCR fue significativamente superior a las obtenidas por métodos de cultivo. Como se presenta en la Tabla V.31, el porcentaje de población BH representó entre el 0.008-3.2 % de los valores determinados mediante qPCR, mientras que la población de BD-PAHs representó entre el 0.00006-

0.01 % de los valores determinados por técnicas independientes de cultivo. Las técnicas dependientes de cultivo no reflejaron la eficiencia en la eliminación de PAHs, evidenciando la participación de las poblaciones no cultivables en la biodegradación.

Tabla V.31. Comparación de la densidad de poblaciones obtenidas por técnicas dependientes e independientes de cultivo.

	S ₀	SOx ₀	SOxA	SOxC	SOxDE
16S rARN [número de copias g _{SS} ⁻¹]	1.22E+09	2.92E+08	4.01E+08	7.12E+10	5.11E+10
RHD α (GP+ GN) [número de copias g _{SS} ⁻¹]	1.05E+08	7.65E+05	8.48E+07	3.34E+08	7.60E+08
BH [UFC g _{SS} ⁻¹]	4.09E+07	2.58E+04	1.66E+06	9.90E+06	4.42E+06
BD-PAHs[NMP g _{SS} ⁻¹]	2.96E+03	5.97E+01	1.03E+02	3.20E+04	5.10E+02

Impacto de los tratamientos sobre la estructura de las comunidades bacterianas del suelo

A partir de ADN proveniente de cada microcosmos se realizó la amplificación de las regiones hipervariables V3-V5 de unos 600 pb. Posteriormente, se realizó la DGGE incluyendo en el gel los productos de la amplificación de los diferentes tratamientos.

En un primer análisis se evaluó la dinámica de la comunidad resistente al tratamiento oxidativo durante el acondicionamiento de un año (SOxA).

La Figura V.44 muestra el dendrograma obtenido, evidenciando los cambios en la estructura de las comunidades durante el tratamiento. Del análisis se observa que las réplicas biológicas se agruparon con una similitud superior al 90 %.

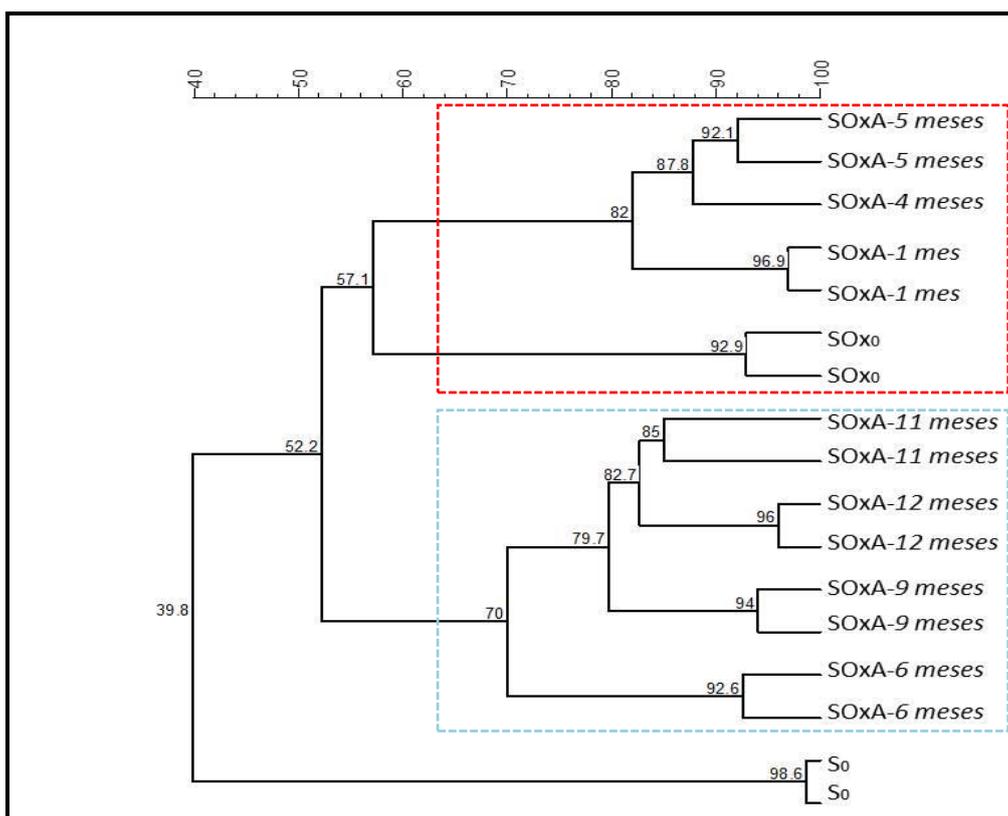


Figura V.44. Dendrograma basado en el perfil de bandas obtenido mediante DGGE de la muestra S_0 , y los microcosmos SOx_0 , y $SOxA$ durante el tratamiento. El UPGMA se construyó a partir de la matriz de distancia calculada mediante el coeficiente de Jaccard.

En el dendrograma se pueden apreciar 2 grandes clústeres. El primer clúster está formado por los microcosmos SOx_0 , y $SOxA$ hasta los 5 meses de tratamiento, mostrando una similitud entre ellos del 57.1 %. Este clúster indicaría el gran impacto que el PS provoca en la comunidad del suelo, SOx_0 , y su movilización paulatina evidenciada a través de pequeñas variaciones en la estructura de la comunidad microbiana autóctona resiliente durante los primeros meses a expensas de la alta concentración de CTD disponible.

El segundo clúster, agrupa los microcosmos $SOxA$ entre los 6 y 12 meses de tratamiento, y describe una estructura con un 70 % de similitud. Los mayores tiempos de ensayo (9, 11 y 12 meses) se correspondieron con un 79.7 % de similitud en la estructura, mientras que avanzando el tiempo, (11 y 12 meses), la similitud se incrementó al 82.7 %. Esta dinámica evidencia una etapa tardía de cambios en la comunidad, en tiempos mayores a 6 meses, conforme se reduce la concentración del CTD disponible.

Ambos clústeres se asociaron con un 52 % de similitud y al S_0 con un 40 %, sugiriendo el establecimiento de una comunidad de estructura diferente.

En un segundo análisis se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la estructura de la comunidad bacteriana del suelo post oxidación. La Figura V.45 muestra el dendrograma obtenido.

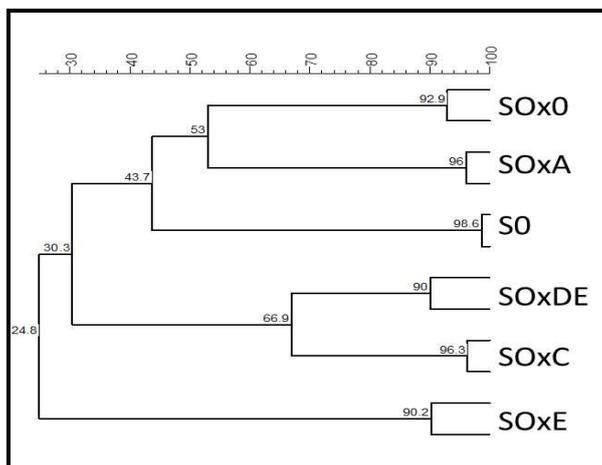


Figura V.45. Dendrograma basado en el perfil de bandas obtenido mediante DGGE de la muestra S_0 , y los microcosmos SOx_0 , $SOxA$, $SOxC$, $SOxE$ y $SOxDE$. El UPGMA se construyó a partir de la matriz de distancia calculada mediante el coeficiente de Jaccard.

En la primera observación se aprecia que las réplicas de los tratamientos se agrupan entre sí, en más del 90.0 % de similitud. Luego, se observa que todos los tratamientos provocaron marcados cambios estructurales en la comunidad bacteriana del suelo original. Se pueden apreciar 2 clústeres, uno formado por los perfiles de S_0 , los representativos del suelo oxidado (SOx_0) y los representativos del suelo oxidado incubado durante un año, $SOxA$, asociándose los tres microcosmos en un 43.7 % de similitud. El segundo clúster asoció a los perfiles de los suelos oxidados doblemente estimulados con enmienda, y compostados con un 66.9 % de similitud. Ambos clústeres se agruparon con un 30.3 % de similitud, y luego al 25 % aproximadamente con los perfiles del microcosmos de suelo oxidado estimulado con una aplicación de enmienda.

Los resultados sugieren una dinámica de comunidades promovida por la oxidación de la MOS (materia orgánica del suelo endógena), diferente de la provocada por el aporte de materia orgánica de las enmiendas (materia orgánica exógena).

Impacto del tratamiento oxidativo sobre la diversidad de la comunidad autóctona resiliente

Con el fin de profundizar el análisis de las comunidades asociadas al suelo oxidado en respuesta a los diferentes tratamientos, a continuación se analizará la diversidad mediante la pirosecuenciación de las regiones hipervariables V3-V5 del gen 16S rARN.

El análisis fue aplicado a muestras representativas del suelo original (S_0), y de los microcosmos SOx_0 y $SOxA$ luego de 1, 5, 9 y 12 meses de tratamiento.

El proceso de pirosecuenciación proporcionó 17.116 secuencias de alta calidad, de las cuales 5.984 corresponden a S_0 , 3.404 a SOx_0 ; 4.878 a $SOxA$ (1 mes); 1.094 a $SOxA$ (5 meses), 959 a $SOxA$ (9 meses) y 797 a $SOxA$ (12 meses). Para el cálculo de los índices de diversidad y la construcción de las curvas de rarefacción se normalizó el número de secuencias de todas las muestras, a 797. La Tabla V.32 presenta los parámetros de diversidad de las distintas comunidades obtenidos por el análisis de los datos de la pirosecuenciación, y la Figura V.46 la representación de las curvas de rarefacción correspondientes.

Tabla V.32. Parámetros de diversidad correspondientes a las comunidades microbianas del suelo original (S_0), suelo post aplicación de PS (SOx_0) y del microcosmos $SOxA$, durante el tratamiento. Resultados obtenidos por análisis de las regiones hipervariables V3-V5 del gen 16S rARN.

Microcosmos	N° secuencias	OTUs observadas	0D	1D	2D	Cobertura [%]
S_0	5984	215	449	61	44	84
SOx_0	3404	92	112	28	10	97
$SOxA$ (1m)	4878	44	65	6	3	97
$SOxA$ (5m)	1094	57	71	8	4	97
$SOxA$ (9m)	959	213	286	64	49	88
$SOxA$ (12m)	797	194	234	60	40	91

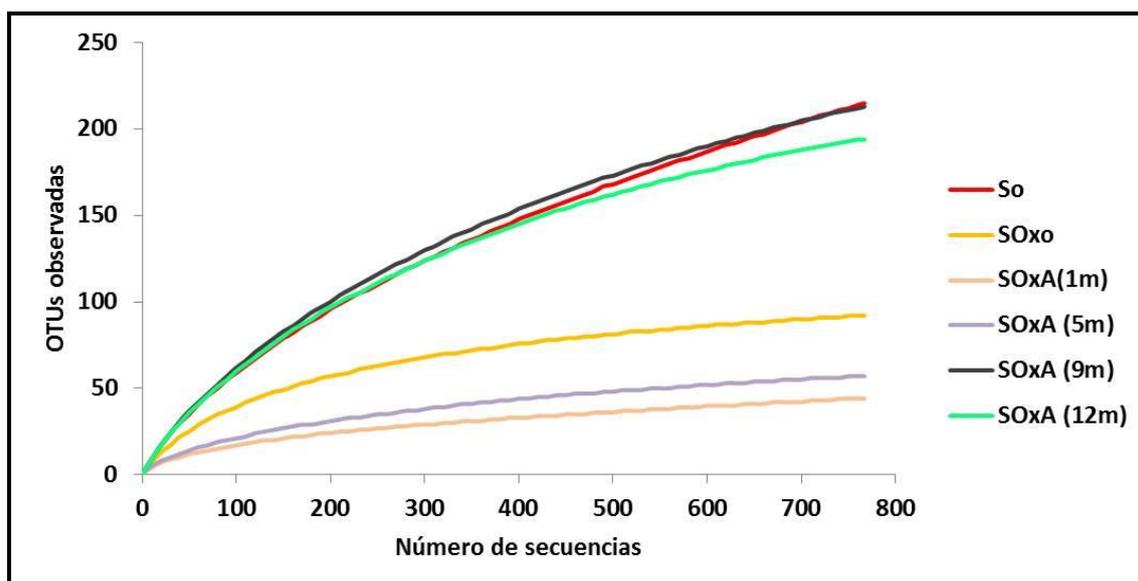


Figura V.46. Curvas de rarefacción realizadas utilizando el criterio de normalización a la baja. En el eje X se representa el número total de secuencias obtenidas para cada microcosmos, mientras que en el eje Y el número de secuencias observadas (OTUs) en cada uno de ellos.

La cobertura, que es un indicador de la calidad de la secuenciación, fue relativamente baja en los microcosmos S_0 y $SOx_A(9m)$. Como puede apreciarse, estos microcosmos fueron los que tuvieron mayor riqueza de especies.

La Figura V.47 presenta la estructura de cada comunidad, de acuerdo a la abundancia relativa de las clases bacterianas encontradas en cada muestra (> 2 %). Las clases representadas por abundancias menores al 2 % se agruparon en “*otros*”. Las clases bacterianas no clasificadas se eliminaron de este análisis.

Los microcosmos S_0 mostraron una comunidad diversa, con una alta riqueza de especies, y equitativa, evidenciados por la serie de Hill. *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* fueron las clases dominantes.

La aplicación de PS produjo la pérdida de la riqueza en el microcosmos SOx_0 , generando una comunidad con una marcada dominancia. Las clases predominantes en estos microcosmos fueron *Actinobacteria* (59 %), *Bacilli* (23 %) y *Clostridia* (9 %). Miembros del género *Streptomyces* fueron los más representativos de la clase *Actinobacteria*.

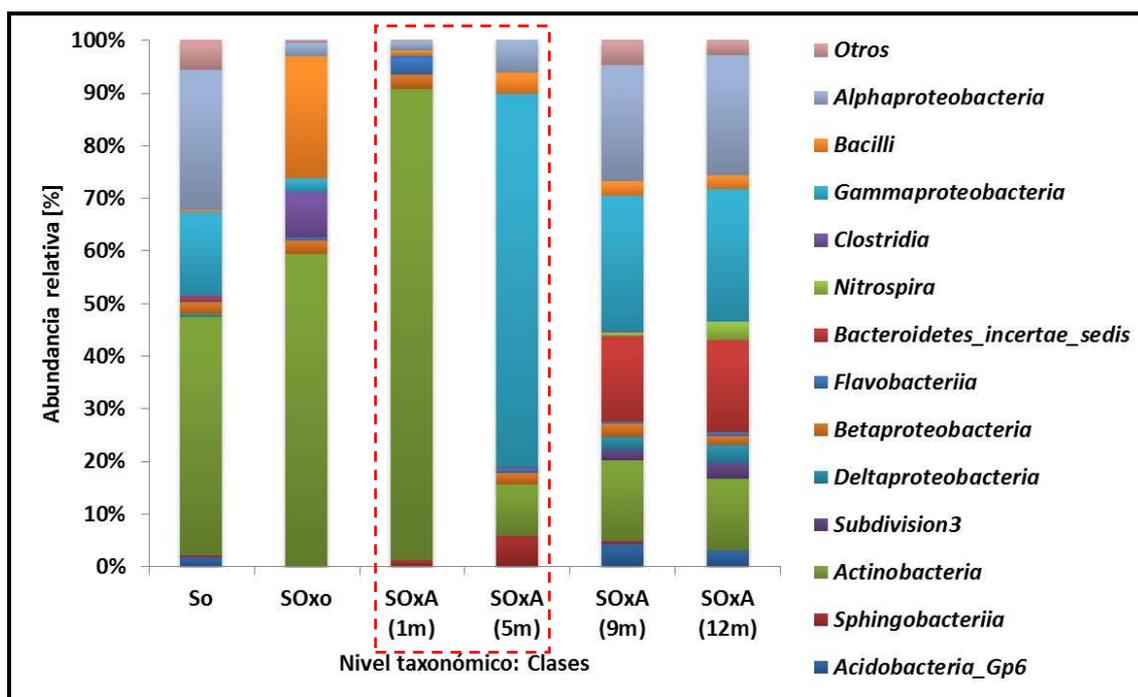


Figura V.47. Perfiles taxonómicos de las comunidades bacterianas de cada microcosmos. El análisis se realizó a nivel de clases. Las clases representadas por < 2 % se agruparon en “Otros”.

Estudios previos demostraron que los microorganismos de ambientes contaminados podrían experimentar un estrés oxidativo, como efecto directo del contaminante y por intermediarios (ROS) generados en la biodegradación aeróbica (Park y Madsen 2004). Para neutralizar estas sustancias reactivas los microorganismos podrían incrementar sus defensas antioxidantes, a través de enzimas específicas (catalasas, superoxidodismutasas, peroxidasas) que degradan las ROS. Ha sido descrito que *Streptomyces* posee varios factores sigma que controlan la expresión de genes en respuesta a varios factores ambientales, como limitación de nutrientes, o protección contra las sustancias reactivas del oxígeno generadas durante el metabolismo aeróbico (Rodríguez García y col., 2007). Una especie de este género fue muy estudiada respecto de cómo el estrés oxidativo modula su ciclo de vida (micelio aéreo), describiendo hasta 66 factores sigma involucrados en su diferenciación e induciendo luego la respuesta al estrés osmótico y oxidativo (Lee y col., 2005; Kallifidas y col., 2010). En este marco, es posible asociar el predominio del género *Streptomyces* en el suelo recientemente oxidado a su mecanismo protectoro contra las sustancias reactivas del oxígeno (ROS) presentes en el suelo por efecto del tratamiento oxidativo.

Bacilli y *Clostridia* pertenecen al filo *Firmicutes*, y son microorganismos esporulados, pudiendo conferir esta propiedad la resistencia al estrés oxidativo.

Luego de un mes de tratamiento, la riqueza fue aún menor, con una mayor dominancia de *Actinobacteria* (89 %). En este caso, miembros de la familia *Promicromonosporaceae* (*Cellulosimicrobium*) fueron los predominantes. Este género, a diferencia de otros de la familia, no desarrolla micelio aéreo. Son importantes en la degradación de la MOS, incluyendo celulosa, xilanos y otros polisacáridos (Rivas y col., 2003).

Los parámetros de diversidad fueron similares en la comunidad establecida luego de 5 meses, pero la clase dominante fue *Gammaproteobacteria* (71 %) y estuvo representada por miembros de la familia *Moraxellaceae* (*Acinetobacter*). Miembros de esta clase son clasificados como poblaciones de Gram negativas de rápido desarrollo en ambientes con disponibilidad de recursos (estrategas *r*). De modo similar a lo observado en el suelo luego de oxidar, la prevalencia del género *Acinetobacter* puede ser atribuida a su particular resistencia al estrés oxidativo. Zhang y col., 2012 demostraron la presencia de un mecanismo de tolerancia a la atrazina (herbicida selectivo) y control del balance redox intracelular producido por las ROS, más eficiente y a nivel más bajo en una cepa de *Acinetobacter* degradadora de atrazina.

El cambio de comunidad apreciado luego del 1ro y 5to mes, dominada en ambos casos por unas pocas clases, marcó un cambio en la estructura de la comunidad del suelo oxidado que se correspondió a lo evidenciado a través de los perfiles de PCR-DGGE (Figura V 44).

Luego de los 9 meses la comunidad pareció haber recuperado su diversidad y equidad hasta el final del tratamiento, apreciándose las clases *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Gamaproteobacteria* (*Acinetobacter*) y apareciendo una nueva clase, *Bacteroidetes incertae sedis* como dominantes. De acuerdo a lo observado en la dinámica de la estructura por PCR-DGGE, este cambio podría haber sucedido más temprano, a partir de los 6 meses.

La Figura V.48 muestra el ACP realizado con las clases representativas a los diferentes tiempos de tratamiento del suelo oxidado. En ella se aprecia que las

comunidades de S_0 y del suelo oxidado hasta el primer mes se separan, en el PC1, de la comunidad de SOxA a los 5 meses. Esta distribución es posible atribuirla a la dominancia de las clases *Actinobacteria* y *Gammaproteobacteria* durante la sucesión de poblaciones. La separación de los microcosmos en el PC2 fue atribuida a la mayor diversidad observada hacia el final del tratamiento.

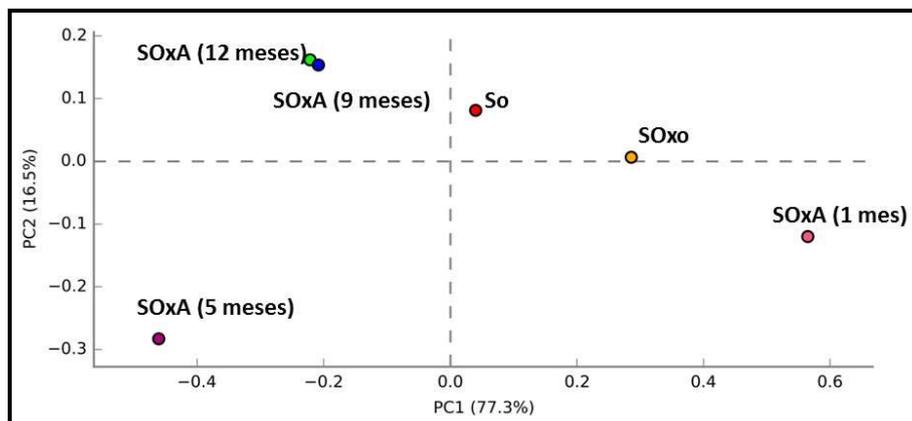


Figura V.48. Análisis de Componentes Principales de las comunidades microbianas del suelo oxidado, durante el tratamiento de acondicionamiento. El análisis se realizó a nivel de clases.

De acuerdo a la ubicación relativa de las comunidades en cada tiempo, se puede inferir que la comunidad del suelo oxidado experimentó una dinámica de poblaciones tendiente a recuperar su comunidad original. Estos cambios poblacionales reflejaron el efecto del oxidante sobre las poblaciones más susceptibles, y la modificación del metabolismo asociado a la materia orgánica movilizada en los microcosmos luego de la aplicación de PS, dado por el incremento del CTD, la mayor biodisponibilidad de los PAHs y la capacidad degradadora de hidrocarburos de las poblaciones resilientes. Esto último se vio reflejado en un 47 % de eliminación de PAHs y un 66 % de eliminación de HAs, respecto del suelo original.

Impacto de los tratamientos en la recuperación de la diversidad bacteriana del suelo post aplicación de PS

El impacto de los tratamientos sobre la diversidad del suelo fue evaluado a través de las regiones hipervariables V4-V5 del gen 16S rARN de la comunidad del suelo original (S_0), y los microcosmos SOx₀, SOxA, SOxC y SOxDE al finalizar los tratamientos. El proceso de pirosecuenciación proporcionó 133.611 secuencias totales,

y que luego de los filtros de calidad fueron 98.334. Trabajando con tres replicas por tratamiento, para el suelo original se obtuvieron en total 6.715, 6.785 y 4.728 secuencias de calidad, mientras que para SOx₀ 7.762, 5.899 y 3.745; para SOxA 5.414, 5.478 y 6.422; para SOxC 7.023, 7.588 y 9.065 y para los microcosmos SOxDE 8.227, 6.498 y 6.984. Estas secuencias se cargaron en la base de datos de NCBI Sequence Read Archive (www.ncbi.nlm.nih.gov/sra) bajo el número de acceso PRJNA306241.

La Tabla V.33 presenta los parámetros de diversidad de las distintas comunidades obtenidos por el análisis de los datos de la pirosecuenciación luego de normalizar los resultados utilizando 3.745 secuencias, que correspondieron al menor número de secuencias obtenidas en los microcosmos.

Tabla V.33. Parámetros de diversidad correspondientes a las comunidades microbianas del suelo original (S₀), suelo post aplicación de PS (SOx₀) y de los microcosmos SOxA, SOxC y SOxDE al finalizar los tratamientos. Resultados obtenidos por análisis de las regiones hipervariables V4-V5 del gen 16S rARN.

Microcosmos	OTUs Observadas	⁰ D	¹ D	² D	Cobertura [%]
S ₀	435 ± 9	624 ± 35	70 ± 2	45 ± 7	95
SOx ₀	53 ± 7	90 ± 26	3 ± 1	3.1 ± 0.5	99
SOxA	570 ± 18	815 ± 72	93 ± 3	77 0 ± 14	94
SOxC	420 ± 13	597 ± 37	75 ± 1	67 ± 4	96
SOxDE	433 ± 7	621 ± 12	68 ± 1	36 ± 1	96

Como se observa en la Tabla V.33, la aplicación de PS produjo una pérdida significativa de la riqueza de especies (OTUs observadas y ⁰D), rindiendo una comunidad muy desigual, con unas pocas especies dominantes.

Todas las intervenciones realizadas sobre el suelo oxidado permitieron la recuperación de la comunidad en términos de diversidad de especies, resultando en comunidades equitativas. Sin embargo, la mayor recuperación, con mayor equidad de especies se encontró en los microcosmos SOxA.

Como se indica en la Tabla V. 33, la cobertura del proceso de secuenciación fue elevada (> 94 %) en todos los sistemas de estudio. La Figura V.49 presenta las curvas de rarefacción obtenidas del proceso de pirosecuenciación, utilizando 3.750 secuencias de modo aleatorio. Como puede apreciarse, las mismas llegan a la saturación, lo que es consistente con los resultados de cobertura %, indicando que el proceso de

secuenciación ha sido capaz de relevar más del 94 % de los microorganismos presentes en los microcosmos, por lo que se infiere que los resultados obtenidos son representativos del proceso.

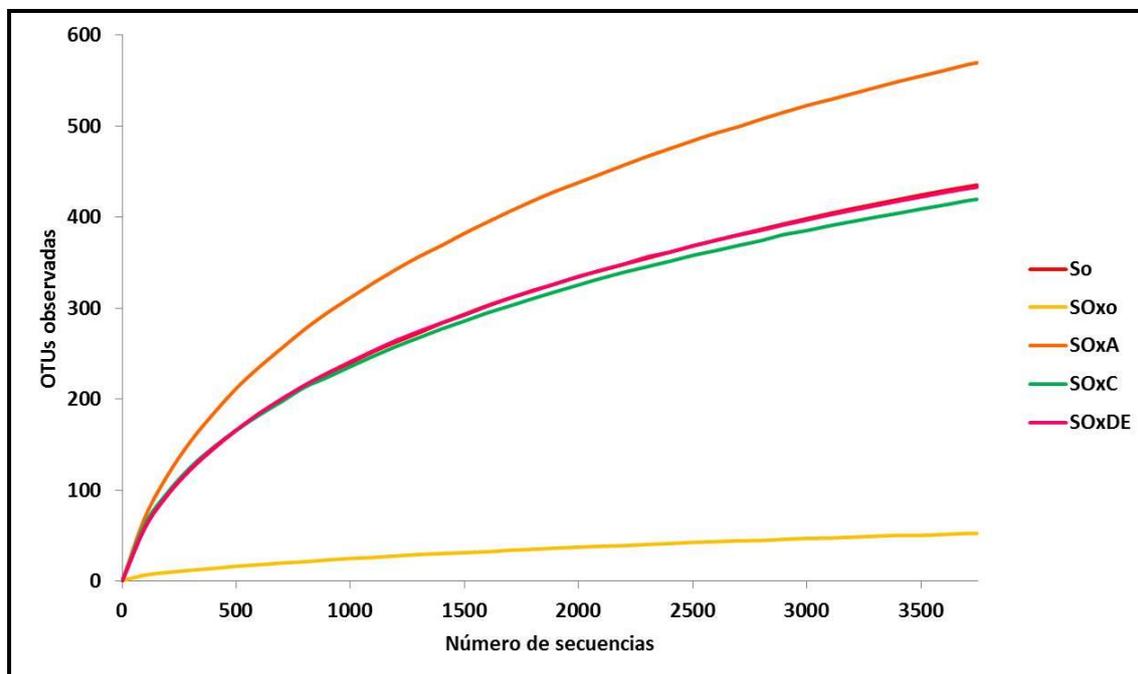


Figura V.49. Curvas de rarefacción realizadas utilizando el criterio de normalización a la baja. En el eje X se representa el número total de secuencias obtenidas para cada microcosmos, mientras que en el eje Y el número de secuencias observadas (OTUs) en cada uno de ellos.

La Figura V.50 presenta la estructura de las comunidades a nivel de clases bacterianas, en términos de abundancia relativa, donde las clases no clasificadas se eliminaron del análisis, con el objetivo de interpretar los cambios estudiados en los tratamientos en función de la comunidad. Esta consideración redujo el porcentaje de clases identificadas a los siguientes valores en cada tratamiento: 81.2 % en S_0 ; 99.9 % en SOx_0 ; 78.7 % en $SOxA$; 86.9 % en $SOxC$ y 85.5 % en $SOxDE$.

El suelo original, S_0 , resultó con dominancia de la clase *Actinobacteria* (43%) y de las clases *Alphaproteobacteria* (26%) y *Gammaproteobacteria* (11 %) representando a las poblaciones GN.

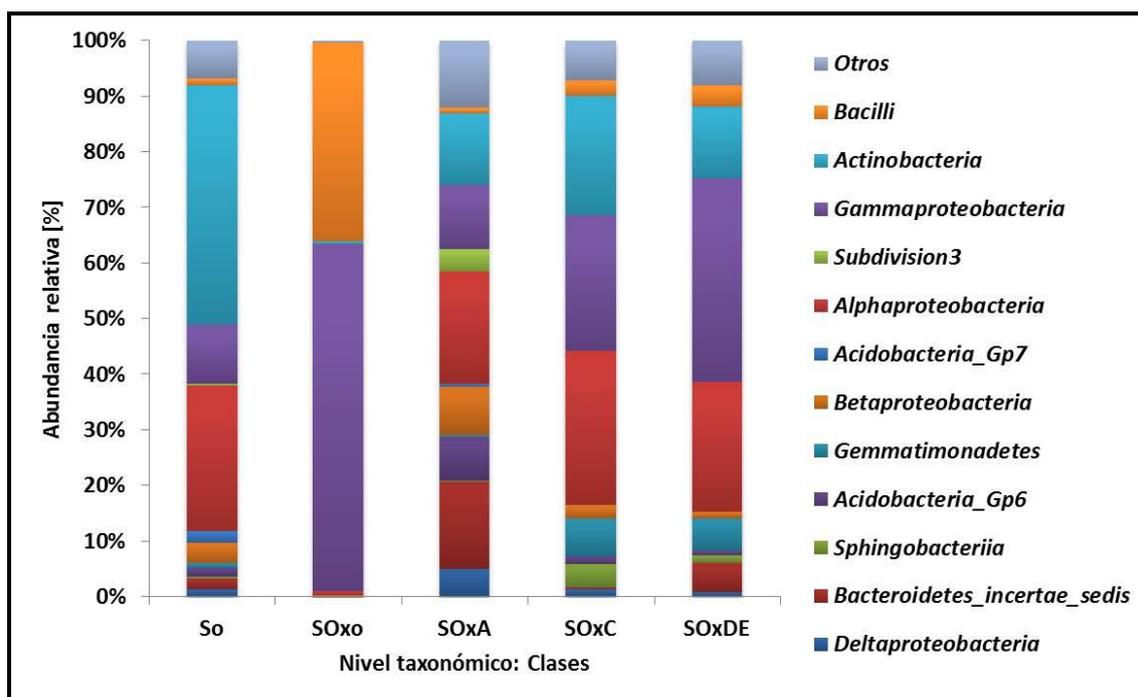


Figura V.50. Perfiles taxonómicos de las comunidades bacterianas de cada microcosmos. El análisis se realizó a nivel de clases. Las clases representadas por abundancias < 2 % se agruparon en “Otros”.

La marcada reducción de la diversidad observada en el suelo luego de la aplicación de PS (microcosmos SOx₀), estuvo representada por miembros de la clase *Gammaproteobacteria* (62 %) y *Bacilli* (36 %), pertenecientes a los géneros *Acinetobacter* y *Bacillus*, respectivamente. A diferencia de lo observado en la sucesión de comunidades del suelo oxidado analizado a través de la región V3-V5, donde se atribuyó la dominancia del género *Streptomyces* a su particular resistencia al estrés oxidativo, este nuevo análisis arroja a miembros del género *Acinetobacter* como dominantes inmediatamente después de la aplicación del PS.

Cuando se acopló la estrategia de acondicionamiento del suelo (microcosmos SOxA) durante un año, se observó una recuperación de la diversidad representada por las clases *Alphaproteobacteria* (20 %), *Bacteroidetes incertae sedis* (16 %), *Actinobacteria* (13 %), *Gammaproteobacteria* (12 %), *Betaproteobacteria* (9 %) y *Acidobacteria Gp6* (8 %). Los géneros *Ohtaekwangia* (*Bacteroidetes incertae sedis*) y *Acinetobacter* (*Gammaproteobacteria*) fueron los más abundantes entre los géneros identificados.

La diversidad de la comunidad de SOxA fue mayor a la evidenciada en los microcosmos donde se aplicaron enmiendas.

Cuando sobre el suelo oxidado se realizó compostaje (microcosmos SOxC), miembros de las clases *Alphaproteobacteria* (28 %), *Gammaproteobacteria* (24 %), *Actinobacteria* (21 %), *Gemmatimonadetes* (7 %) y *Sphingobacteriia* (4 %) fueron los representativos de la comunidad. Del análisis a nivel de género pudieron ser evidenciados miembros de *Sphingomonas* (*Alphaproteobacteria*), *Actinomadura* (*Actinobacteria*) y *Gemmatimonas* (*Gemmatimonadetes*).

La doble estimulación con compost del suelo oxidado (Microcosmos SOxDE) estimuló el desarrollo de *Gammaproteobacteria* (37 %), *Alphaproteobacteria* (23 %), *Actinobacteria* (13 %), *Gemmatimonadetes* (6 %) y *Bacteroidetes incertae sedis* (5 %) principalmente. En estos microcosmos los géneros dominantes identificados fueron *Steroidobacter* (*Gammaproteobacteria*), *Gemmatimonas* (*Gemmatimonadetes*) y *Ohtaekwangia* (*Bacteroidetes incertae sedis*).

Con el objetivo de interpretar los cambios producidos por los tratamientos combinados, se realizó un análisis de componentes principales utilizando las clases identificadas, Figura V.51. El análisis permitió explicar el 87.1 % de la varianza observada. La Tabla V.34 presenta la abundancia relativa de clases bacterianas cuya proporción es significativamente diferente, que permiten explicar los resultados del ACP.

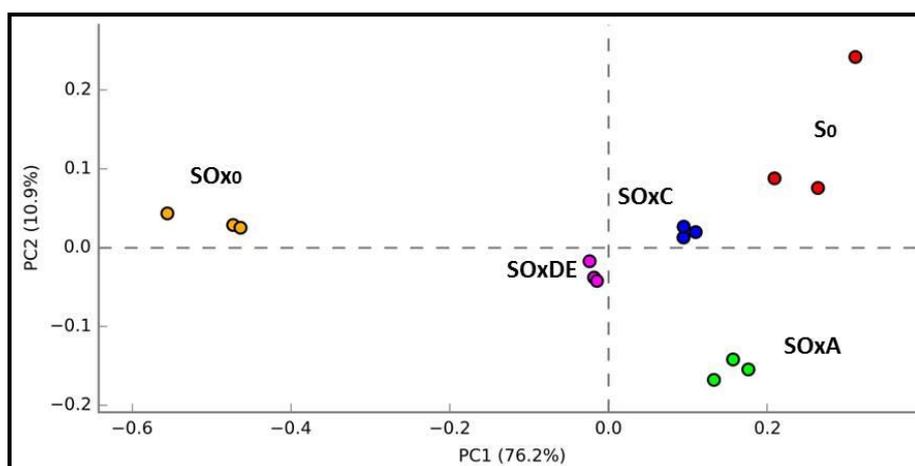


Figura V.51. Análisis de Componentes Principales (ACP) de las comunidades bacterianas (nivel de clases) de las muestras de suelo original (S₀), microcosmos de suelo post aplicación de PS (SOx₀), suelo oxidado acondicionado (SOxA), suelo oxidado compostado (SOxC) y suelo oxidado doblemente estimulado con compost (SOxDE), al finalizar los tratamientos.

El PC1 explicó el 76.2 % de la varianza encontrada. Esta separación se debió principalmente a la dominancia de *Gammaproteobacteria* y *Bacilli* en SOx₀. El PC2 permitió explicar el 10.9 % de varianza, y fue atribuido a la abundancia relativa de las clases *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* en S₀ y *Bacteroidetes incertae sedis* en SOxA los distintos tratamientos.

En la Figura V.52 se muestran las clases bacterianas que reflejan los cambios observados entre estos los tratamientos que involucraron el uso de enmiendas orgánicas, utilizando barras de error extendidas.

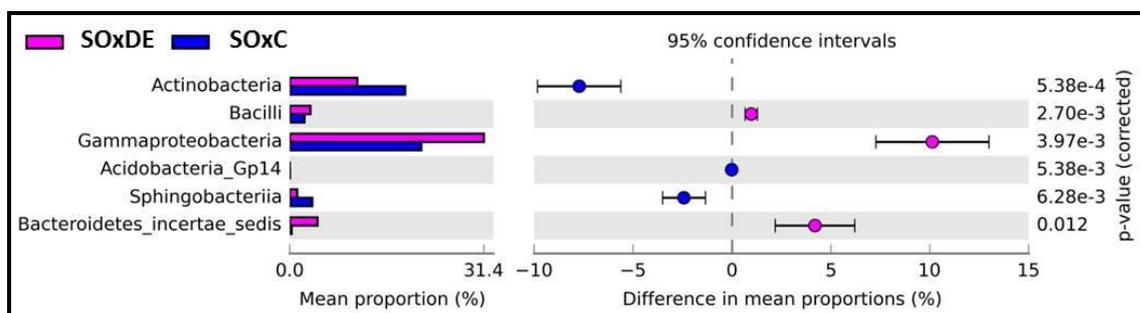


Figura V.52. Análisis de barras de error extendidas. Estudio comparativo de las poblaciones encontradas en SOxC y SOxDE, a nivel de clases.

Del análisis diferencial se puede concluir que el compostaje promovió el enriquecimiento en miembros de las clases *Actinobacteria* y *Sphingobacteriia* en mayor medida que la estimulación con compost, mientras que el doble agregado de compost promovió el enriquecimiento de miembros de las clases *Gammaproteobacteria*, *Bacteroidetes incertae sedis*.

Tabla V.34. Abundancia relativa de filos y clases bacterianas cuya proporción es diferente, estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Filo	Clase	S ₀	SO _{x0}	SO _{xA}	SO _{xC}	SO _{xDE}
<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	1.1	0.0	3.9	1.2	0.8
<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospira</i>	0.0	0.0	0.8	0.1	0.0
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidetes incertae sedis</i>	1.7	0.0	12.4	0.3	4.5
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacteriia</i>	0.3	0.0	0.0	3.6	1.2
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria Gp6</i>	1.5	0.0	6.2	1.2	0.6
<i>Ignavibacteriae</i>	<i>Ignavibacteria</i>	0.0	0.0	0.0	0.6	0.9
<i>Planctomycetes</i>	<i>Phycisphaerae</i>	0.0	0.0	0.0	0.9	1.0
<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonadetes</i>	0.7	0.0	0.3	6.0	5.0
<i>Hydrogenedentes</i>	<i>Candidatus Hydrogenedens</i>	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0
<i>Proteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	3.2	0.1	7.0	2.2	1.0
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria Gp7</i>	1.7	0.0	0.3	0.0	0.0
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	22.7	0.7	16.0	24.0	19.9
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Opitutae</i>	0.5	0.0	1.3	0.0	0.2
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Subdivision3</i>	0.2	0.0	3.1	0.0	0.0
<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	9.2	62.3	9.1	21.2	31.4
<i>Planctomycetes</i>	<i>Planctomycetia</i>	0.7	0.0	1.1	1.1	1.4
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	37.3	0.7	10.0	18.6	10.9
<i>Deinococcus Thermus</i>	<i>Deinococci</i>	0.0	0.3	0.0	0.8	0.6
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria Gp3</i>	1.6	0.0	1.1	0.0	0.1
<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	0.4	0.0	0.7	0.1	0.0
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	1.0	35.5	0.9	2.4	3.3
<i>Firmicutes</i>	<i>Erysipelotrichia</i>	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria Gp16</i>	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria Gp4</i>	0.5	0.0	0.3	0.0	0.0
<i>Chloroflexi</i>	<i>Caldilineae</i>	0.0	0.0	0.5	0.0	0.1
<i>Chloroflexi</i>	<i>Thermomicrobia</i>	0.7	0.0	0.3	0.7	0.8
<i>Chlamydiae</i>	<i>Chlamydiia</i>	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteria Gp1</i>	0.1	0.0	0.1	0.2	0.0
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteriia</i>	0.7	0.0	1.0	0.8	0.9
<i>Firmicutes</i>	<i>Clostridia</i>	0.2	0.1	0.7	0.5	0.5

En negrita se resaltan los filos, clases y su abundancia relativa, que permitirían explicar la varianza observada en el Análisis de Componentes Principales realizado.

Con el objetivo de integrar las propiedades físicas, químicas y biológicas de los microcosmos con la estructura de las comunidades establecidas luego de los distintos tratamientos, se realizó el Análisis de Correspondencia Canónico (ACC), que se presenta en la Figura V.53. En el análisis se incluyeron las variables físicas, químicas y biológicas que permitieron explicar la varianza entre los tratamientos en el ACP (Figura

V.37). Las variables físicas y químicas incluidas fueron el Carbono Orgánico (CO), el Nitrógeno (N), el Fósforo (P), la Conductividad Eléctrica (CE), el contenido de sulfato, el Carbono Total Disuelto (CTD), el contenido de la fracción de HAs pesados (C29 – 30), el contenido de PAHs (según el número de anillos aromáticos) y la concentración de PAHs biodisponible. Como variables biológicas se incluyeron la actividad ureasa y fosfatasa (ácida y alcalina). Las clases incluidas fueron aquellas clasificadas con abundancia relativa mayor al 5 % en al menos una de las muestras.

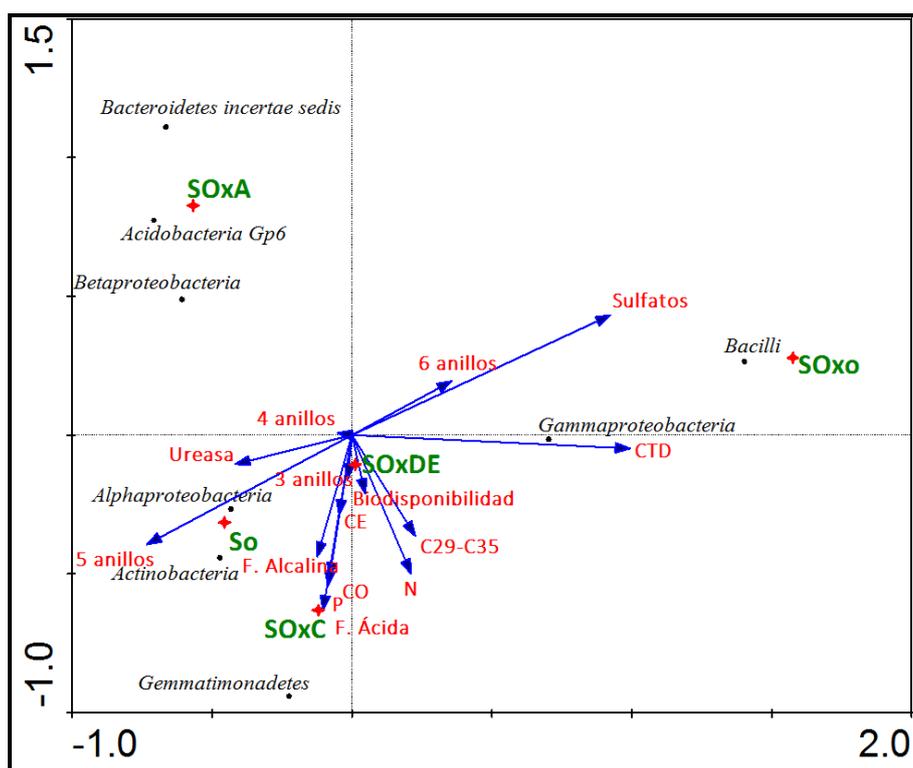


Figura V.53. Análisis de Correspondencia Canónica (ACC) aplicado a las variables físicas, químicas y biológicas de las comunidades de S_0 , SOx_0 , SOx_A , SOx_C y SOx_{DE} al finalizar los tratamientos.

En la Figura V.53 se observa que ambos ejes explicaron el 83.6 % de la varianza observada con un $p < 0.004$. Las variables CO, P y fosfatasa ácida resultaron colineales.

El análisis permitió definir que las variables CTD ($P = 0.002$), concentración de sulfatos ($P = 0.004$) y concentración de PAHs de 5 anillos ($P = 0.018$) contribuyeron significativamente a explicar la relación entre las propiedades de los microcosmos y sus comunidades bacterianas.

En la Figura V.53 se observa que el microcosmos SOx_0 se correlacionó positivamente con la concentración de sulfatos y el CTD, evidenciando la mayor

concentración de compuestos orgánicos solubles como consecuencia del tratamiento oxidativo, y la mayor concentración de sulfato residual en suelo. Este microcosmos se asoció al predominio de *Bacilli* y *Gammaproteobacteria*, correlacionándose positivamente con estas variables. Ninguna de las variables significativas permitió explicar la relación entre las propiedades de los microcosmos SO_xA y su comunidad bacteriana, representada por *Bacteroidetes incertae sedis*, *Betaproteobacteria* y *Acidobacteria Gp6*.

El suelo original, S₀, asociado a las clases *Alphaproteobacteria* y *Actinobacteria*, correlacionó positivamente con la concentración de PAHs de 5 anillos en suelo, mientras que el microcosmos SO_{x0} lo hizo negativamente, indicando que el tratamiento oxidativo redujo significativamente la concentración de esta fracción de PAHs. La proximidad de los microcosmos SO_xC y SO_xDE a S₀ indica que la concentración de PAHs de 5 anillos en los microcosmos con enmienda orgánica fue mayor que en SO_{x0}, sugiriendo el “desecuestramiento” de esta fracción durante el tratamiento de remediación biológica. La clase *Gemmatimonadetes* estuvo relativamente asociada al microcosmos SO_xC. Miembros de esta clase han sido frecuentemente aislados de bibliotecas genómicas, y recientemente por técnicas de secuenciación masiva se estimó su abundancia relativa en suelo en el rango de 0.2-6.5 %. Solo un miembro representativo de este filo ha sido aislado correspondiendo a un acumulador de polifosfato, aislado del efluente de una planta de barros activados (Zhang y col., 2003).

Conclusiones

La oxidación inespecífica de la MOS por el PS libera de la matriz del suelo compuestos orgánicos y nutrientes minerales, como Fe y P, permitiendo la eliminación de los PAHs, principalmente de bajo peso molecular, e incrementando la biodisponibilidad de los mismos.

La aplicación de PS produjo un impacto negativo sobre la comunidad microbiana del suelo, provocando una disminución significativa de la biomasa, de la diversidad y de la riqueza de especies, con la dominancia de *Bacillus* y *Acinetobacter* y una menor densidad de poblaciones especialistas (portadoras de genes dioxigenasa).

Estos cambios permiten acoplar estrategias de remediación biológicas que estimulen la comunidad autóctona resistente, incrementando la eliminación de hidrocarburos.

En términos generales, todas las estrategias de remediación biológica acopladas a la aplicación de PS producen la eliminación de HAs, principalmente de cadena liviana y la eliminación adicional de PAHs.

Todas las estrategias acopladas promueven el aumento de la biodisponibilidad de los PAHs y el “desecuestro” específico de dibenzo [*a*, *h*] antraceno (5 anillos aromáticos), a excepción de la doble estimulación con compost.

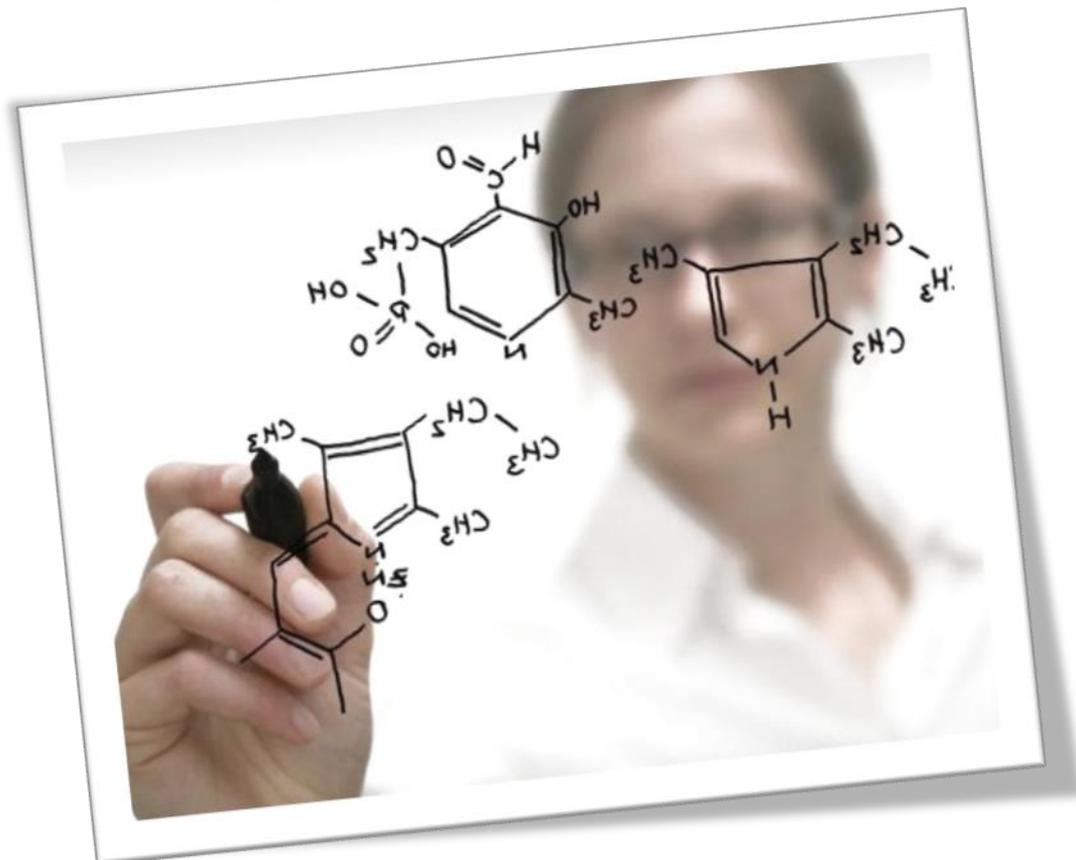
El uso de estrategias combinadas promueve el metabolismo de CTD y sulfatos, permitiendo la recuperación de poblaciones generalistas y estimulando las poblaciones especialistas, en una comunidad diversa, equitativa y funcional.

- El acondicionamiento del suelo, al recuperar las poblaciones generalistas, condujo al enriquecimiento de poblaciones potencialmente degradadoras de PAHs (RHD α GP).
- El uso de enmiendas orgánicas post oxidación incrementó el contenido de macro y micro nutrientes, con el aumento en la abundancia relativa de HAs de alto peso molecular.

Las estrategias de compostaje dieron indicios de reducción de la fitotoxicidad, incrementando la producción vegetal.

- La resiliencia asociada a la resistencia de las poblaciones degradadoras especialistas de PAHs RHD α GP permitió su recuperación y estimulación, resultando GN las poblaciones más susceptibles al estrés oxidativo
- El alto grado de humificación de la MOS observado en SOxA, SOxE y SOxDE limitaría la eliminación de los PAHs aun biodisponibles, por falta de sustratos co-metabólicos. En cambio, el menor grado de humificación observado en SOxC sugiere que el tiempo del tratamiento podría prolongarse incrementando la eficiencia de eliminación en este microcosmos.

Capítulo VI: Conclusiones



En base a lo expuesto y discutido en los **Capítulos III, IV y V**, en este capítulo se remarcan las conclusiones más relevantes de este trabajo.

El suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos, pobre en materia orgánica, posee una comunidad con potencial degradador, imposibilitada de eliminar la contaminación por falta de acceso al contaminante y de sustratos co-metabólicos.

Las estrategias tendientes a estimular la población autóctona, acondicionamiento y fertilización, estimulan el consumo de nutrientes sin mostrar mayores efectos sobre la funcionalidad del suelo y eliminación de hidrocarburos, mientras que las estrategias de compostaje inducen cambios en la matriz del suelo que movilizan tanto hidrocarburos alifáticos como aromáticos, estimulan distintas poblaciones, recuperan la funcionalidad del suelo y eliminan HAs livianos.

El tratamiento oxidativo, a través de la aplicación de PS, sobre el suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos permite la rápida eliminación de PAHs, movilizandolos nutrientes y así generando nuevas condiciones para el desarrollo de distintas poblaciones. Esta estrategia promueve el aumento no selectivo de la biodisponibilidad de los PAHs.

La combinación de tecnologías de remediación química y biológicas permite la eliminación de HAs y de PAHs, impulsada por la movilización de nutrientes inducida por el PS, generando comunidades diversas y equitativas, funcionalmente distintas a las del suelo original, con potencial degradador de hidrocarburos.

La transformación de la matriz del suelo, provocada por las estrategias de compostaje (pre y post oxidación), así como por el tratamiento oxidativo, puso en evidencia los distintos grados de interacción de los PAHs con la matriz del suelo: fracción biodisponible, fracción recalcitrante extraíble y fracción recalcitrante no extraíble.

El aumento de la biodisponibilidad de PAHs al usar enmiendas orgánicas se potencia por el tratamiento oxidativo previo, de modo no selectivo.

Luego del tratamiento oxidativo, el acondicionamiento del suelo, así como la estimulación y doble estimulación con compost alcanzan un alto grado de humificación de la MOS, lo que impide la eliminación de PAHs aun biodisponibles debido a la falta

de sustratos co- metabólicos. En las mismas condiciones, el compostaje del suelo, aun luego de un año de tratamiento, posee un grado de humificación bajo de la MOS lo que permite suponer que prolongar el tiempo de tratamiento incrementaría la eficiencia de eliminación de los PAHs.

Los valores de deshidrogenasa alcanzados por los sistemas compostado y estimulado previo al tratamiento químico fueron mayores a los correspondientes post oxidación, lo que refleja el daño generado por el estrés oxidativo.

La alta conductividad eléctrica, y la naturaleza de la MOS asociada al uso de enmiendas sobre el suelo, con o sin oxidación previa, provocan el retardo en la germinación de semillas. Este efecto negativo se ve reflejado en la producción vegetal.

En base a los resultados, es de destacar el uso de herramientas fotoquímicas para monitorear el grado de avance de los tratamientos. Particularmente el análisis de los espectros de absorción brinda información relevante sobre la transformación de la MOS y su calidad.

Debido a los cambios inducidos en la matriz del suelo por el uso estrategias de compostaje, con o sin oxidación previa, es relevante el monitoreo de la biodisponibilidad de los PAHs.

La productividad del suelo es una medida necesaria cuando se aplican estrategias de compostaje debido al retardo en la germinación asociado al uso de enmiendas orgánicas.

En el marco de la Ley Nacional 24.051, en el Anexo II del decreto 831/93 quedan establecidos los niveles guía de calidad de suelos, (mg/ kg suelo seco), según el uso diferencial de los mismos (agrícola, residencial e industrial). En la Tabla VI.1 se presentan los valores guía de los PAHs que están regulados en este marco legal.

Considerando los valores guía, se aprecia que el límite de PAHs totales para suelos agrícolas es de 0.9 ppm, para suelos residenciales 26 ppm y para uso industrial de 260 ppm. Por lo tanto, el suelo original (S_0) se encuadró dentro de los límites permitidos por la Ley Nacional para suelos industriales con una concentración de PAHs

totales de 214 ± 21 ppm. Sin embargo, el contenido de benzo [a] antraceno y de benzo [a] pireno fue superior al permitido.

Tabla VI.I. Valores guía permitidos de los distintos PAHs regulados por la Ley Nacional de residuos peligrosos, 24.051, en los suelos según sus usos, expresados en $\text{mg kg}_{\text{SS}}^{-1}$.

Constituyente peligroso	Uso agrícola	Uso residencial	Uso industrial
Benzo [a] antraceno	0.1	1	10
Benzo [a] pireno	0.1	1	10
Benzo [b] fluoranteno	0.1	1	10
Benzo [k] fluoranteno	0.1	1	10
Dibenzo [a, h] antraceno	0.1	1	10
Indeno [1, 2, 3 - cd] pireno	0.1	1	10
Naftaleno	0.1	5	50
Fenantreno	0.1	5	50
Pireno	0.1	10	100

La estimulación del suelo con compost, así como el tratamiento oxidativo y los tratamientos combinados, llevaron los valores de benzo [a] pireno a valores permitidos para suelos industriales. El uso de tecnologías de remediación combinadas redujo el valor de indeno [1, 2, 3 - cd] pireno al valor permitido en suelos de uso residencial. Por el tratamiento oxidativo los valores de dibenzo [a, h] antraceno se redujeron, siendo aceptado para suelos residenciales. Sin embargo el “desecuestramiento” promovido por las estrategias de remediación biológicas acopladas revirtió este efecto, siendo aceptado para suelos industriales. Estas observaciones dieron cuenta de los procesos degradativos producidos en la matriz del suelo por las tecnologías estudiadas, y ponen de manifiesto la necesidad de un monitoreo periódico.

En el marco de la Ley Nacional 24.611 que trata de la preservación del ambiente y conservación de los recursos naturales; la Ley Nacional 25.137 sobre el uso de protocolos que enmiendan daños ocasionados por la contaminación por hidrocarburos y la Ley Nacional 25.378, que declara de interés nacional la restauración del ambiente, es posible concluir que:

Las estrategias de compostaje acopladas al tratamiento oxidativo resultan una herramienta valiosa y prometedora para la recuperación de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos.

Bibliografía



- Abdel-Shafy, H. I., y M. S. M. Mansour. 2015. "A Review on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Source, Environmental Impact, Effect on Human Health and Remediation." *Egyptian Journal of Petroleum* 25 (1). Egyptian Petroleum Research Institute: 107–23. doi:10.1016/j.ejpe.2015.03.011.
- Ahmad, M., A. L. Teel, y R. J. Watts. 2010. "Persulfate Activation by Subsurface Minerals." *Journal of Contaminant Hydrology* 115 (1–4). Elsevier B.V.: 34–45. doi:10.1016/j.jconhyd.2010.04.002.
- Alexander, M. 2000. "Aging, Bioavailability, and Over estimation of Risk from Environmental Pollutants." *Environmental Science and Technology* 34 (20): 4259–65. doi:10.1021/es001069+.
- Al-Marzouqi, A. H., A. Y. Zekri, B. Jobe, y A. Dowaidar. 2007. "Supercritical Fluid Extraction for the Determination of Optimum Oil Recovery Conditions." *Journal of Petroleum Science and Engineering* 55 (1–2): 37–47. doi:10.1016/j.petrol.2006.04.011.
- Alvear, M., F. Reyes, A. Morales, C. Arriagada, y M. Reyes. 2007. "Actividad Biológica Y Agregados Estables Al Agua En Dos Tipos de Formaciones Vegetales de Un Bosque Templado Del Centro-Sur de Chile Con Perturbación Antrópica." *Ecología Austral* 17 (1): 113–22.
- Amellal, N., J. M. Portal, y J. Berthelin. 2001. "Effect of Soil Structure on the Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons within Aggregates of a Contaminated Soil." *Applied Geochemistry* 16 (14): 1611–19. doi:10.1016/S0883-2927(01)00034-8.
- Anipsitakis, G. P., y D. D. Dionysiou. 2004. "Radical Generation by the Interaction of Transition Metals with Common Oxidants Radical Generation by the Interaction of Transition Metals with Common Oxidants." *Environmental Science and Technology* 38 (13): 3705–12. doi:10.1021/es035121o.
- Anthony, E. J., y J. Wang. 2006. "Pilot Plant Investigations of Thermal Remediation of Tar-Contaminated Soil and Oil-Contaminated Gravel." *Fuel* 85 (4): 443–50. doi:10.1016/j.fuel.2005.08.012.
- Antizar-Ladislao, B., J. Lopez-Real, y A. J. Beck. 2004. "Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Contaminated Waste Using Composting Approaches." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 34 (3): 249–89. doi:10.1080/10643380490434119.
- Antizar-Ladislao, B., J. Lopez-Real, y A. J. Beck. 2006a. "Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in an Aged Coal Tar Contaminated Soil under in-Vessel Composting Conditions." *Environmental Pollution* 141 (3): 459–68. doi:10.1016/j.envpol.2005.08.066.
- Antizar-Ladislao, B., J. Lopez-Real, y A. J. Beck.: 2006b. "Investigation of Organic Matter Dynamics during in-Vessel Composting of an Aged Coal-Tar Contaminated Soil Using Fluorescence Excitation-Emission Spectroscopy." *Chemosphere* 64 (5): 839–47. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.10.036.
- Antizar-Ladislao, B., K. Spanova, A. J. Beck, y N. J. Russell. 2008. "Microbial Community Structure Changes during Bioremediation of PAHs in an Aged Coal-Tar Contaminated Soil by in-Vessel Composting." *International Biodeterioration and Biodegradation* 61 (4): 357–64. doi:10.1016/j.ibiod.2007.10.002.
- Asquith, E. A., P. M. Geary, A. L. Nolan, y C. A. Evans. 2012. "Comparative Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil by Biostimulation, Bioaugmentation and Surfactant Addition." *Journal of Environmental Science and Engineering* 1 (5): 637–50.
- Atlas, R. M. B., R. M. Atlas, R. Bartha, E. Gentilini, P. E. Martino, E. Pennimpepe, y T. Michael. 2002. *Ecología Microbiana Y Microbiología Ambiental*.
- Bacosa, H. P., y C. Inoue. 2015. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Biodegradation Potential and Diversity of Microbial Consortia Enriched from Tsunami Sediments in Miyagi, Japan." *Journal of Hazardous Materials* 283. Elsevier B.V.: 689–97. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.09.068.
- Baker, G. C., J. J. Smith, y D. A. Cowan. 2003. "Review and Re-Analysis of Domain-Specific 16S Primers." *Journal of Microbiological Methods* 55 (3): 541–55. doi:10.1016/j.mimet.2003.08.009.
- Bamforth, S. M., y I. Singleton. 2005. "Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Current Knowledge and Future Directions." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80 (7): 723–36. doi:10.1002/jctb.1276.

- Bao, M., Y. Pi, L. Wang, P. Sun, Y. Li, y L. Cao. 2014. "Lipopeptide Biosurfactant Production Bacteria *Acinetobacter Sp. D3-2* and Its Biodegradation of Crude Oil." *Environmental Science: Processes & Impacts* 16 (4): 897. doi:10.1039/c3em00600j.
- Barabás, G., G. Vargha, I. M. Szabó, A. Penyige, S. Damjanovich, János Szöllösi, J. Matkó, T. Hirano, A. Mátyus, y I. Szabó. 2001. "N-Alkane Uptake and Utilisation by *Streptomyces* Strains." *Antonie van Leeuwenhoek* 79 (3–4): 269–76. doi:10.1023/A:1012030309817.
- Bastida, F., N. Jehmlich, K. Lima, B. E. L. Morris, H. H. Richnow, T. Hernández, M. von Bergen, y C. García. 2015. "The Ecological and Physiological Responses of the Microbial Community from a Semiarid Soil to Hydrocarbon Contamination and Its Bioremediation Using Compost Amendment." *Journal of Proteomics* 135 (August): 162–69. doi:10.1016/j.jprot.2015.07.023.
- Beaudin, N., R. F. Caron, R. Legros, J. Ramsay, y B. Ramsay. 1999. "Identification of the Key Factors Affecting Composting of a Weathered Hydrocarbon-Contaminated Soil." *Biodegradation* 10 (2): 127–33. doi:10.1023/A:1008365832031.
- Birdwell, J. E., y A. S. Engel. 2010. "Characterization of Dissolved Organic Matter in Cave and Spring Waters Using UV-Vis Absorbance and Fluorescence Spectroscopy." *Organic Geochemistry* 41 (3). Elsevier Ltd: 270–80. doi:10.1016/j.orggeochem.2009.11.002.
- Bobadilla Fazzini, R. A., M. J. Preto, A. C. Poucas Quintas, A. Bielecka, K. N. Timmis, y V. A. P. Martins dos Santos. 2010. "Consortia Modulation of the Stress Response: Proteomic Analysis of Single Strain versus Mixed Culture." *Environmental Microbiology* 12 (9): 2436–49. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02217.x.
- Bölter, M. 1977. "Microbial Ecology of a Brackish Water Environment. Volume 25 of the Series." In *Ecological Studies*, 138–47.
- Bosio, G. N., P. M. David Gara, F. S. Einschlag, M. C. Gonzalez, M. T. Del Panno, y D. O. Martire. 2008. "Photodegradation of Soil Organic Matter and Its Effect on Gram-Negative Bacterial Growth." *Photochemistry and Photobiology* 84 (5): 1126–32. doi:PHP274 [pii]r10.1111/j.1751-1097.2007.00274.x.
- Braddock, J. F., M. L. Ruth, P. H. Catterall, J. L. Walworth, y K. A. Mccarthy. 1997. "Enhancement and Inhibition of Microbial Activity in Hydrocarbon- Contaminated Arctic Soils: Implications for Nutrient-Amended Bioremediation." *Environmental Science and Technology* 31 (7): 2078–84. doi:10.1021/es960904d.
- Breedveld, G. D., y M. Sparrevik. 2000. "Nutrient-Limited Biodegradation of PAH in Various Soil Strata at a Creosote Contaminated Site." *Biodegradation* 11 (6): 391–99. doi:10.1023/A:1011695023196.
- Brzeszcz, J., T. Steliga, P. Kapusta, A. Turkiewicz, y P. Kaszycki. 2016. "R-Strategist versus K-Strategist for the Application in Bioremediation of Hydrocarbon-Contaminated Soils." *International Biodeterioration and Biodegradation* 106: 41–52. doi:10.1016/j.ibiod.2015.10.001.
- Buffle J. A. E. 1977. "Humic Substances in Water and Their Interaction with Mineral Ions." *Techniques et Sciences Municipales* 73: 3–10.
- Cébron, A., P Faure, C. Lorgeoux, S. Ouvrard, y C. Leyval. 2013. "Experimental Increase in Availability of a PAH Complex Organic Contamination from an Aged Contaminated Soil: Consequences on Biodegradation." *Environmental Pollution* 177. Elsevier Ltd: 98–105. doi:10.1016/j.envpol.2013.01.043.
- Cébron, A., B. Louvel, P. Faure, C. France-Lanord, Y. Chen, J. C. Murrell, y C. Leyval. 2011. "Root Exudates Modify Bacterial Diversity of Phenanthrene Degraders in PAH-Polluted Soil but Not Phenanthrene Degradation Rates." *Environmental Microbiology* 13 (3): 722–36. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02376.x.
- Cébron, A., M. P. Norini, T. Beguiristain, y C. Leyval. 2008. "Real-Time PCR Quantification of PAH-Ring Hydroxylating Dioxygenase (PAH-RHD α) Genes from Gram Positive and Gram Negative Bacteria in Soil and Sediment Samples." *Journal of Microbiological Methods* 73 (2): 148–59. doi:10.1016/j.mimet.2008.01.009.

- Ceccanti, Brunello, Grazia Masciandaro, Carlos Garcia, Cristina MacCi, y Serena Doni. 2006. "Soil Bioremediation: Combination of Earthworms and Compost for the Ecological Remediation of a Hydrocarbon Polluted Soil." *Water, Air, and Soil Pollution* 177 (1–4): 383–97. doi:10.1007/s11270-006-9180-4.
- Cerniglia, C. E. 1992. "Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Microorganisms to Combat Pollution* 3: 351–68. doi:10.1007/978-94-011-1672-5_16.
- Chaîneau, C. H., C. Yepremian, J. F. Vidalie, J. Ducreux, y D. Ballerini. 2003. "Bioremediation of a Crude Oil-Polluted Soil: Biodegradation, Leaching and Toxicity Assessments." *Water, Air, and Soil Pollution* 144 (1–4): 419–40. doi:10.1023/A:1022935600698.
- Chapelle, F. H., P. M. Bradley, y C. C. Casey. 2005. "Behavior of a Chlorinated Ethene Plume Following Source-Area Treatment with Fenton's Reagent." *Ground Water Monitoring and Remediation* 25 (2): 131–41. doi:10.1111/j.1745-6592.2005.0020.x.
- Chauhan, A., Fazlurrahman., J. G. Oakeshott, y R. K. Jain. 2008. "Bacterial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Strategies for Bioremediation." *Indian Journal of Microbiology* 48 (1): 95–113. doi:10.1007/s12088-008-0010-9.
- Chen, J., P. T. Huang, K. Y. Zhang, y F. R. Ding. 2012. "Isolation of Biosurfactant Producers, Optimization and Properties of Biosurfactant Produced by *Acinetobacter Sp.* from Petroleum-Contaminated Soil." *Journal of Applied Microbiology* 112 (4): 660–71. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05242.x.
- Chen, M., P. Xu, G. Zeng, C. Yang, D. Huang, y J. Zhang. 2015. "Bioremediation of Soils Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Petroleum, Pesticides, Chlorophenols and Heavy Metals by Composting: Applications, Microbes and Future Research Needs." *Biotechnology Advances* 33 (6): 745–55. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.05.003.
- Chen, S., J. Peng, y G. Duan. 2015. "Enrichment of Functional Microbes and Genes during Pyrene Degradation in Two Different Soils." *Journal of Soils and Sediments* 16 (2): 417–26. doi:10.1007/s11368-015-1204-5.
- Chien, Y. C. 2012. "Field Study of in Situ Remediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil on Site Using Microwave Energy." *Journal of Hazardous Materials* 199 (November 2011): 457–61. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.11.012.
- Chiu, C. H., y A. Chao. 2014. "Distance-Based Functional Diversity Measures and Their Decomposition: A Framework Based on Hill Numbers." *PLoS ONE* 9 (7). doi:10.1371/journal.pone.0100014.
- Chung, N., y M. Alexander. 1998. "Differences in Sequestration and Bioavailability of Organic Compounds Aged in Dissimilar Soils." *Environmental Science and Technology* 32 (7): 855–60. doi:10.1021/es970740g.
- Chung, N., y M. Alexander. 1999. "Effect of Concentration on Sequestration and Bioavailability of Two Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Environmental Science and Technology* 33 (20): 3605–8. doi:10.1021/es9902874.
- Cole, M.A., X. Liu, y L. Zhang. 1995. "Effect of Compost Addition on Pesticide Degradation in Planted Soils." In *Bioremediation of Recalcitrant Organics*, 183–90.
- Crimi, M. L., y R. L. Siegrist. 2003. "Geochemical Effects of Metals Following Permanganate Oxidation of DNAPLs." *Groundwater* 41 (4): 458–69.
- Curtis, T. P., W. T. Sloan, y J. W. Scannell. 2002. "Estimating Prokaryotic Diversity and Its Limits." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (16): 10494–99. doi:10.1073/pnas.142680199.
- David Gara, P. M. 2008. "Extracción, Caracterización de Sustancias Húmicas Y Su Empleo En Procesos Fotoquímicos de Interés Ambiental."
- David Gara, P. M., J. A. Rosso, M. V. Martin, G. N. Bosio, M. C. Gonzalez, y D. O. Mártire. 2011. "Characterization of Humic Substances and Their Role in Photochemical Processes of Environmental Interest." *Trends in Photochemistry and Photobiology* 13: 51–70.

Degens, B. P., y J. A. Harris. 1997. "Development of a Physiological Approach to Measuring the Catabolic Diversity of Soil Microbial Communities." *Soil Biology and Biochemistry* 29 (9–10): 1309–20. doi:10.1016/S0038-0717(97)00076-X.

Degens, B. P., L. A. Schipper, G. P. Sparling, y L. C. Duncan. 2001. "Is the Microbial Community in a Soil with Reduced Catabolic Diversity Less Resistant to Stress or Disturbance?" *Soil Biology and Biochemistry* 33 (9): 1143–53. doi:10.1016/S0038-0717(01)00018-9.

Del Panno, M. T., I. S. Morelli, B. Engelen, y L. Berthe-Corti. 2005. "Effect of Petrochemical Sludge Concentrations on Microbial Communities during Soil Bioremediation." *FEMS Microbiology Ecology* 53 (2): 305–16. doi:10.1016/j.femsec.2005.01.014.

Di Gennaro, P., E. Rescalli, E. Galli, G. Sello, y G. Bestetti. 2001. "Characterization of *Rhodococcus Opacus R7*, a Strain Able to Degrade Naphthalene and *O*-Xylene Isolated from a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Soil." *Research in Microbiology* 152 (7): 641–51. doi:10.1016/S0923-2508(01)01243-8.

Dias, R. L., L. Ruberto, A. Calabró, A. Lo Balbo, M. T. Del Panno, y W. P. Mac Cormack. 2015. "Hydrocarbon Removal and Bacterial Community Structure in on-Site Biostimulated Biopile Systems Designed for Bioremediation of Diesel-Contaminated Antarctic Soil." *Polar Biology* 38 (5): 677–87. doi:10.1007/s00300-014-1630-7.

Dias, R. L., L. Ruberto, E. Hernández, S. C. Vázquez, A. Lo Balbo, M. T. Del Panno, y W. P. Mac Cormack. 2012. "Bioremediation of an Aged Diesel Oil-Contaminated Antarctic Soil: Evaluation of The 'on Site' biostimulation Strategy Using Different Nutrient Sources." *International Biodeterioration and Biodegradation* 75 (October): 96–103. doi:10.1016/j.ibiod.2012.07.020.

Do, S. H., Y. J. Kwon, y S. H. Kong. 2010. "Effect of Metal Oxides on the Reactivity of persulfate/Fe(II) in the Remediation of Diesel-Contaminated Soil and Sand." *Journal of Hazardous Materials* 182 (1–3). Elsevier B.V.: 933–36. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.06.068.

Eilers, K. G., C. L. Lauber, R. Knight, y N. Fierer. 2010. "Shifts in Bacterial Community Structure Associated with Inputs of Low Molecular Weight Carbon Compounds to Soil." *Soil Biology and Biochemistry* 42 (6). Elsevier Ltd: 896–903. doi:10.1016/j.soilbio.2010.02.003.

Emami, S., A. A. Pourbabaei, y H. A. Alikhani. 2014. "Interactive Effect of Nitrogen Fertilizer and Hydrocarbon Pollution on Soil Biological Indicators." *Environmental Earth Sciences* 72 (9): 3513–19. doi:10.1007/s12665-014-3259-9.

Ensign, J. C. 1992. "Introduction to the Actinomycetes." *The Prokaryotes* 1: 811–15.

Esechie, H. A. 1994. "Interaction of Salinity and Temperature on the Germination of Sorghum." *Agronomy and Crop Science* 83 (172): 194–99. doi:10.2134/agronj1991.00021962008300010039x.

Fahrbach, M., J. Kuever, M. Remesch, B. E. Huber, P. Kämpfer, W. Dott, y J. Hollender. 2008. "*Steroidobacter Denitrificans* Gen. Nov., Sp. Nov., a Steroidal Hormone-Degrading Gammaproteobacterium." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58 (9): 2215–23. doi:10.1099/ijs.0.65342-0.

Falkowski, P. G., T. Fenchel, y E. F. Delong. 2008. "The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles." *Science* 320 (5879): 1034–39. doi:10.1126/science.1153213.

Fang, G. D., D. D. Dionysiou, S. R. Al-Abed, y D. M. Zhou. 2013. "Superoxide Radical Driving the Activation of Persulfate by Magnetite Nanoparticles: Implications for the Degradation of PCBs." *Applied Catalysis B: Environmental* 129. Elsevier B.V.: 325–32. doi:10.1016/j.apcatb.2012.09.042.

Ferguson, S. H., P. D. Franzmann, A. T. Reville, I. Snape, y J. L. Rayner. 2003. "The Effects of Nitrogen and Water on Mineralisation of Hydrocarbons in Diesel-Contaminated Terrestrial Antarctic Soils." *Cold Regions Science and Technology* 37 (2): 197–212. doi:10.1016/S0165-232X(03)00041-7.

Fernández, J. M., N. Senesi, C. Plaza, G. Brunetti, y A. Polo. 2009. "Effects of Composted and Thermally Dried Sewage Sludges on Soil and Soil Humic Acid Properties." *Pedosphere* 19 (3): 281–91. doi:10.1016/S1002-0160(09)60119-3.

Fernández, L. A., M. A. Sagardoy, y M.A. Gómez. 2008. "Estudio de La Fosfatasa Ácida Y Alcalina En Suelos de La Región Pampeana Norte Del Área Sojera Argentina." *Ciencia Del Suelo* 26 (1): 35–40.

Fernández, L. A., P. Zalba, M. A. Gómez, y M. A. Sagardoy. 2005. "Bacterias Solubilizadoras de Fosfato Inorgánico Aisladas de Suelos de La Región Sojera." *Ciencia Del Suelo* 23 (1): 31–37.

Ferretto, N., M. Tedetti, C. Guigue, S. Mounier, R. Redon, y M. Goutx. 2014. "Identification and Quantification of Known Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Pesticides in Complex Mixtures Using Fluorescence Excitation-Emission Matrices and Parallel Factor Analysis." *Chemosphere* 107. Elsevier Ltd: 344–53. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.12.087.

Festa, S., B. M. Coppotelli, y I. S. Morelli. 2016a. "Comparative Bioaugmentation with a Consortium and a Single Strain in a Phenanthrene-Contaminated Soil: Impact on the Bacterial Community and Biodegradation." *Applied Soil Ecology* 98. Elsevier B.V.: 8–19. doi:10.1016/j.apsoil.2015.08.025.

Festa, S., M. Macchi, F. Cortés, I. S. Morelli, y B. M. Coppotelli. 2016b. "Monitoring the Impact of Bioaugmentation with a PAH-Degrading Strain on Different Soil Microbiomes Using Pyrosequencing." *FEMS Microbiology Ecology* 92 (8): 1–12. doi:10.1093/femsec/fiw125.

Festa, Sabrina, Bibiana M. Coppotelli, y Irma S. Morelli. 2013. "Bacterial Diversity and Functional Interactions between Bacterial Strains from a Phenanthrene-Degrading Consortium Obtained from a Chronically Contaminated-Soil." *International Biodeterioration and Biodegradation* 85. Elsevier Ltd: 42–51. doi:10.1016/j.ibiod.2013.06.006.

Fierer, N., M. A. Bradford, y R. B. Jackson. 2007. "Toward an Ecological Classification of Soil Bacteria." *Ecology* 88 (6): 1354–64. doi:10.1890/05-1839.

Flores, R., G. Blass, y V. Domínguez. 2007. "Soil Remediation by an Advanced Oxidative Method Assisted with Ultrasonic Energy." *Journal of Hazardous Materials* 140 (1–2): 399–402. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.09.044.

Flotron, V., C. Delteil, Y. Padellec, y V. Camel. 2005. "Removal of Sorbed Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Soil, Sludge and Sediment Samples Using the Fenton's Reagent Process." *Chemosphere* 59 (10): 1427–37. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.12.065.

Fuenmayor, S. L., M. Wild, A. L. Boyes, y P. A. Williams. 1998. "A Gene Cluster Encoding Steps in Conversion of Naphthalene to Gentisate in *Pseudomonas Sp. Strain U2*." *Journal of Bacteriology* 180 (9): 2522–30.

Furman, O. S., A. L. Teel, M. Ahmad, M. C. Merker, y R. Watts. 2011. "Effect of Basicity on Persulfate Reactivity." *Journal of Environmental Engineering* 137 (4): 241–47. doi:10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000323.

Gan, S., E. V. Lau, y H. K. Ng. 2009. "Remediation of Soils Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)." *Journal of Hazardous Materials* 172 (2–3): 532–49. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.07.118.

Gandolfi, I., M. Sicolo, A. Franzetti, E. Fontanarosa, A. Santagostino, y G. Bestetti. 2010. "Influence of Compost Amendment on Microbial Community and Ecotoxicity of Hydrocarbon-Contaminated Soils." *Bioresource Technology* 101 (2). Elsevier Ltd: 568–75. doi:10.1016/j.biortech.2009.08.095.

Gans, J., M. Wolinsky, y J. Dunbar. 2005. "Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil." *Science* 309 (2005): 1387–90. doi:10.1126/science.1112665.

García, R. O., H. Reichenbach, M. W. Ring, y R. Müller. 2009. "Phaselicystis Flava Gen. Nov., Sp. Nov., an Arachidonic Acid-Containing Soil Myxobacterium, and the Description of Phaselicystidaceae Fam. Nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (6): 1524–30. doi:10.1099/ijs.0.003814-0.

Geng, Y., J. Dighton, y D. Gray. 2012. "The Effects of Thinning and Soil Disturbance on Enzyme Activities under Pitch Pine Soil in New Jersey Pinelands." *Applied Soil Ecology* 62. Elsevier B.V.: 1–7. doi:10.1016/j.apsoil.2012.07.001.

- Glaeser, S. P., y P. Kämpfer. 2007. "Streptomycetaceae: Phylogeny, Ecology and Pathogenicity." eLS DOI: 10.10.
- Goicoechea, H. C., S. Yu, A. F. T. Moore, y A. D. Campiglia. 2012. "Four-Way Modeling of 4.2 K Time-Resolved Excitation Emission Fluorescence Data for the Quantitation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil Samples." *Talanta* 101. Elsevier: 330–36. doi:10.1016/j.talanta.2012.09.035.
- Goldstein, A. H. 1986. "Bacterial Solubilization of Mineral Phosphates: Historical Perspective and Future Prospects." *American Journal of Alternative Agriculture* 1 (2): 51–57.
- González, N., R. Simarro, M. C. Molina, L. F. Bautista, L. Delgado, y J. A. Villa. 2011. "Effect of Surfactants on PAH Biodegradation by a Bacterial Consortium and on the Dynamics of the Bacterial Community during the Process." *Bioresource Technology* 102 (20). Elsevier Ltd: 9438–46. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.066.
- Goodfellow, M., P. Kämpfer, H. J. Busse, M. E. Trujillo, K. I. Suzuki, W. Ludwig, y W. B. Whitman. 2012. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*.
- Griffiths, B. S., M. Bonkowski, J. Roy, y K. Ritz. 2001. "Functional Stability, Substrate Utilisation and Biological Indicators of Soils Following Environmental Impacts." *Applied Soil Ecology* 16 (1): 49–61. doi:10.1016/S0929-1393(00)00081-0.
- Griffiths, B. S., y L. Philippot. 2013. "Insights into the Resistance and Resilience of the Soil Microbial Community." *FEMS Microbiology Reviews* 37 (2): 112–29. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00343.x.
- Gupta, S., B. Pathak, y M. H. Fulekar. 2015. "Molecular Approaches for Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds: A Review." *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 14 (2): 241–69. doi:10.1007/s11157-014-9353-3.
- Habe, H., y T. Omori. 2003. "Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67 (2): 225–43. doi:10.1271/bbb.67.225.
- Hall, T. A. 1999. "BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT." *Nucleic Acids Symposium Series*. doi:citeulike-article-id:691774.
- Han, X. M., Y. R. Liu, L. M. Zhang, y J. Z. He. 2015. "Insight into the Modulation of Dissolved Organic Matter on Microbial Remediation of PAH-Contaminated Soils." *Microbial Ecology* 70 (2): 400–410. doi:10.1007/s00248-015-0575-x.
- Hanser, O., C. Biache, M. Boulangé, S. Parant, C. Lorgeoux, D. Billet, R. Michels, y P. Faure. 2015. "Evolution of Dissolved Organic Matter during Abiotic Oxidation of Coal Tar-Comparison with Contaminated Soils under Natural Attenuation." *Environmental Science and Pollution Research* 22 (2): 1431–43. doi:10.1007/s11356-014-3465-8.
- Haritash, A. K., y C. P. Kaushik. 2009. "Biodegradation Aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review." *Journal of Hazardous Materials* 169 (1–3): 1–15. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.03.137.
- Hedlund, B. P., A. D. Geiselbrecht, T. J. Bair, y J. T. Staley. 1999. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by a New Marine Bacterium, *Neptunomonas Naphthovorans* Gen. Nov., Sp. Nov." *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1): 251–59. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=91009&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hennessee, C. T., y Q. X. Li. 2010. "Micrococccineae: *Arthrobacter* and Relatives." In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 1853–64.
- Heuer, H., G. Wieland, J. Schönfeld, A. Schönwälder, N. C. M. Gomes, y K. Smalla. 2001. "Bacterial Community Profiling Using DGGE or TGGE Analysis." *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications* 9: 177–90.
- Hua, L., W. Wu, Y. Liu, Y. Chen, y M. B. McBride. 2008. "Effect of Composting on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Removal in Sewage Sludge." *Water, Air, and Soil Pollution* 193 (1–4): 259–67. doi:10.1007/s11270-008-9687-y.

Huesemann, Michael H, Tom S Hausmann, y Tim J Fortman. 2004. "Does Bioavailability Limit Biodegradation? A Comparison of Hydrocarbon Biodegradation and Desorption Rates in Aged Soils." *Biodegradation* 15 (4): 261–74. doi:10.1023/B:BIOD.0000042996.03551.f4.

Huling, S. G., y B. E. Pivetz. 2006. In-Situ Chemical Oxidation.

Husson, O. 2013. "Redox Potential (Eh) and pH as Drivers of Soil/plant/microorganism Systems: A Transdisciplinary Overview Pointing to Integrative Opportunities for Agronomy." *Plant Soil* 362 (1–2): 389–417. doi:10.1007/s11104-012-1429-7.

Hwang, S., y T. J. Cutright. 2003. "Effect of Expandable Clays and Cometabolism on PAH Biodegradability." *Environmental Science and Pollution Research International* 10 (5): 277–80. doi:http://dx.doi.org.ezproxy.lib.calpoly.edu/10.1065/espr2003.08.167.

Ibarrolaza, A., B. M. Coppotelli, M. T. Del Panno, E. R. Donati, y I. S. Morelli. 2011. "Application of the Knowledge-Based Approach to Strain Selection for a Bioaugmentation Process of Phenanthrene- and Cr(VI)-Contaminated Soil." *Journal of Applied Microbiology* 111 (1): 26–35. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05036.x.

Iwai, S., T. A. Johnson, B. Chai, S. A. Hashsham, y J. M. Tiedje. 2011. "Comparison of the Specificities and Efficacies of Primers for Aromatic Dioxygenase Gene Analysis of Environmental Samples." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (11): 3551–57. doi:10.1128/AEM.00331-11.

Jiang, Y., K. J. Brassington, G. Prpich, G. I. Paton, K. T. Semple, S. J. T. Pollard, y F. Coulon. 2016. "Insights into the Biodegradation of Weathered Hydrocarbons in Contaminated Soils by Bioaugmentation and Nutrient Stimulation." *Chemosphere* 161. Elsevier Ltd: 300–307. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.07.032.

Johnsen, A. R., y U. Karlson. 2007. "Diffuse PAH Contamination of Surface Soils: Environmental Occurrence, Bioavailability, and Microbial Degradation." *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 (3): 533–43. doi:10.1007/s00253-007-1045-2.

Johnsen, A. R., L. Y. Wick, y H. Harms. 2005. "Principles of Microbial PAH-Degradation in Soil." *Environmental Pollution* 133 (1): 71–84. doi:10.1016/j.envpol.2004.04.015.

Jones, M. D., E. A. Rodgers-Vieira, J. Hu, y M. D. Aitken. 2014. "Association of Growth Substrates and Bacterial Genera with Benzo[a]Pyrene Mineralization in Contaminated Soil." *Environmental Engineering Science* 31 (12): 689–97. doi:10.1089/ees.2014.0275.

Jonsson, S., Y. Persson, S. Frankki, B. van Bavel, S. Lundstedt, P. Haglund, y M. Tysklind. 2007. "Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Contaminated Soils by Fenton's Reagent: A Multivariate Evaluation of the Importance of Soil Characteristics and PAH Properties." *Journal of Hazardous Materials* 149 (1): 86–96. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.03.057.

Jouanneau, Y., C. Meyer, y N. Duraffourg. 2016. "Dihydroxylation of Four- and Five-Ring Aromatic Hydrocarbons by the Naphthalene Dioxygenase from *Sphingomonas* CHY-1." *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (3): 1253–63. doi:10.1007/s00253-015-7050-y.

Jung, J., y W. Park. 2015. "Acinetobacter Species as Model Microorganisms in Environmental Microbiology: Current State and Perspectives." *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (6): 2533–48. doi:10.1007/s00253-015-6439-y.

Kallifidas, D., D. Thomas, P. Doughty, y M. S. B. Paget. 2010. "The σ R Regulon of *Streptomyces Coelicolor* A3(2) Reveals a Key Role in Protein Quality Control during Disulphide Stress." *Microbiology* 156 (6): 1661–72. doi:10.1099/mic.0.037804-0.

Kallimanis, A., S. Frillingos, C. Drainas, y A. I. Koukkou. 2007. "Taxonomic Identification, Phenanthrene Uptake Activity, and Membrane Lipid Alterations of the PAH Degrading *Arthrobacter* Sp. Strain Sphe3." *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 (3): 709–17. doi:10.1007/s00253-007-1036-3.

Kallimanis, A., K. Kavakiotis, A. Perisynakis, C. Spröer, R. Pukall, C. Drainas, y A. I. Koukkou. 2009. "Arthrobacter Phenanthrenivorans Sp. Nov., to Accommodate the Phenanthrene-Degrading Bacterium *Arthrobacter* Sp. Strain Sphe3." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (2): 275–79. doi:10.1099/ij.s.0.000984-0.

- Kandeler, E., y H. Gerber. 1988. "Short-Term Assay of Soil Urease Activity Using Colorimetric Determination of Ammonium." *Biology and Fertility of Soils* 6 (1): 68–72. doi:10.1007/BF00257924.
- Kästner, M. 2000. "Humification Process or Formation of Refractory Soil Organic Matter." *Biotechnology. Environmental Processes II. Soil Decontamination*. Wiley-VCH. Weinheim. Vol. 11–12. doi:10.1002/9783527620999.ch4m.
- Kästner, M., y A. Miltner. 2016. "Application of Compost for Effective Bioremediation of Organic Contaminants and Pollutants in Soil." *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (8): 3433–49. doi:10.1007/s00253-016-7378-y.
- Khoramnia, A., A. Ebrahimpour, B. K. Beh, y O. M. Lai. 2011. "Production of a Solvent, Detergent, and Thermotolerant Lipase by a Newly Isolated *Acinetobacter* Sp. in Submerged and Solid-State Fermentations." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011. doi:10.1155/2011/702179.
- Kim, B. K., K. Baek, S. H. Ko, y J. W. Yang. 2011. "Research and Field Experiences on Electrokinetic Remediation in South Korea." *Separation and Purification Technology* 79 (2): 116–23. doi:10.1016/j.seppur.2011.03.002.
- Kim, S. H., H. Y. Han, Y. J. Lee, C. W. Kim, y J. W. Yang. 2010. "Effect of Electrokinetic Remediation on Indigenous Microbial Activity and Community within Diesel Contaminated Soil." *Science of the Total Environment* 408 (16). Elsevier B.V.: 3162–68. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.03.038.
- Kim, S. J., O. Kweon, y C. E. Cerniglia. 2009. "Proteomic Applications to Elucidate Bacterial Aromatic Hydrocarbon Metabolic Pathways." *Current Opinion in Microbiology* 12 (3): 301–9. doi:10.1016/j.mib.2009.03.006.
- Kosaric, N. 2001. "Biosurfactants and Their Applications for Soil Bioremediation." *Food Technology and Biotechnology* 39 (4): 295–304. doi:10.1002/chin.199112362.
- Kostka, J. E., O. Prakash, W. A. Overholt, S. J. Green, G. Freyer, A. Canion, J. Delgardio, N. Norton, T. C. Hazen, y M. Huettel. 2011. "Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (22): 7962–74. doi:10.1128/AEM.05402-11.
- Kuiper, I., E. L. Lagendijk, G. V. Bloemberg, y B. J. J. Lugtenberg. 2004. "Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction." *Molecular Plant Microbe Interaction* 17 (1): 6–15.
- Kulik, N., A. Goi, M. Trapido, y T. Tuhkanen. 2006. "Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Combined Chemical Pre-Oxidation and Bioremediation in Creosote Contaminated Soil." *Journal of Environmental Management* 78 (4): 382–91. doi:10.1016/j.jenvman.2005.05.005.
- Ladd, J. N., y J. H. A. Butler. 1972. "Short-Term Assay of Soil Proteolytic Enzyme Activities Using Proteins and Dipeptides Derivates as Substrates." *Soil Biology and Biochemistry* 4 (1965): 19–39.
- Lafortune, I., P. Juteau, E. Déziel, F. Lépine, R. Beaudet, y R. Villemur. 2009. "Bacterial Diversity of a Consortium Degrading High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in a Two-Liquid Phase Biosystem." *Microbial Ecology* 57 (3): 455–68. doi:10.1007/s00248-008-9417-4.
- Lau, S S S, y J W C Wong. 2001. "Toxicity Evaluation of Weathered Coal Fly Ash Amended Manure Compost." *Water, Air Soil Pollut.* 128: 243–54.
- Laurent, F., A. Cébron, C. Schwartz, y C. Leyval. 2012. "Oxidation of a PAH Polluted Soil Using Modified Fenton Reaction in Unsaturated Condition Affects Biological and Physico-Chemical Properties." *Chemosphere* 86 (6). Elsevier Ltd: 659–64. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.11.018.
- Leahy, J. G., y R. R. Colwell. 1990. "Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment." *Microbiological Reviews* 54 (3): 305–15.
- Lee, B. D., y M. Hosomi. 2001. "A Hybrid Fenton Oxidation-Microbial Treatment for Soil Highly Contaminated with Benz(a)anthracene." *Chemosphere* 43 (8): 1127–32. doi:10.1016/S0045-6535(00)00182-X.
- Lee, C. H., J. Y. Lee, W. Y. Jang, Y. H. Jeon, y K. K. Lee. 2002. "Evaluation of Air Injection and Extraction Tests in a Landfill Site in Korea: Implications for Landfill Management." *Environmental Geology* 42 (8): 945–54. doi:10.1007/s00254-002-0599-7.

- Lee, E. J., N. Karoonuthaisiri, H. S. Kim, J. H. Park, C. J. Cha, C. M. Kao, y J. H. Roe. 2005. "A Master Regulator σ^B Governs Osmotic and Oxidative Response as Well as Differentiation via a Network of Sigma Factors in *Streptomyces Coelicolor*." *Molecular Microbiology* 57 (5): 1252–64. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04761.x.
- Lguirati, A., G. Ait Baddi, A. El Mousadik, V. Gilard, J. C. Revel, y M. Hafidi. 2005. "Analysis of Humic Acids from Aerated and Non-Aerated Urban Landfill Composts." *International Biodeterioration and Biodegradation* 56 (1): 8–16. doi:10.1016/j.ibiod.2005.03.004.
- Li, X., Y. Du, G. Wu, Z. Li, H. Li, y H. Sui. 2012. "Solvent Extraction for Heavy Crude Oil Removal from Contaminated Soils." *Chemosphere* 88 (2). Elsevier Ltd: 245–49. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.03.021.
- Liang, C., C. F. Huang, N. Mohanty, y R. M. Kurakalva. 2008. "A Rapid Spectrophotometric Determination of Persulfate Anion in ISCO." *Chemosphere* 73 (9). Elsevier Ltd: 1540–43. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.08.043.
- Liao, J., J. Wang, y Y. Huang. 2015. "Bacterial Community Features Are Shaped by Geographic Location, Physicochemical Properties, and Oil Contamination of Soil in Main Oil Fields of China." *Microbial Ecology*, no. 5: 380–89. doi:10.1007/s00248-015-0572-0.
- Lim, M. W., E. V. Lau, y P. E. Poh. 2016. "A Comprehensive Guide of Remediation Technologies for Oil Contaminated Soil - Present Works and Future Directions." *Marine Pollution Bulletin* 109 (1). Elsevier Ltd: 14–45. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.04.023.
- Liu, B. E., Ji. Guo-Mei, C. Jian, y W. Gang. 2006. "A Review of Methods for Studying Microbial Diversity in Soils." *Pedosphere*, no. 1: 18–24. doi:10.1016/S1002-0160(06)60021-0.
- Liu, W., Y. Luo, Y. Teng, Z. Li, y L. Q. Ma. 2010. "Bioremediation of Oily Sludge-Contaminated Soil by Stimulating Indigenous Microbes." *Environmental Geochemistry and Health* 32 (1): 23–29. doi:10.1007/s10653-009-9262-5.
- Lizarazo-Medina, X. P., y D. Gómez-Vásquez. 2015. "Rizospheric Microbiota of *Espeletia Spp.* from Santa Inés and Frontino- Urrao Paramos in Antioquia, Colombia." *Acta Biológica Colombiana*. doi:10.15446/abc.v20n1.42827.
- Lladó, S., S. Covino, A. M. Solanas, M. Petruccioli, A. D'annibale, y M. Viñas. 2014. "Pyrosequencing Reveals the Effect of Mobilizing Agents and Lignocellulosic Substrate Amendment on Microbial Community Composition in a Real Industrial PAH-Polluted Soil." *Journal of Hazardous Materials* 283: 35–43. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.08.065.
- Lladó, S., E. Gràcia, A. M. Solanas, y M. Viñas. 2013. "Fungal and Bacterial Microbial Community Assessment during Bioremediation Assays in an Aged Creosote-Polluted Soil." *Soil Biology and Biochemistry* 67. Elsevier Ltd: 114–23. doi:10.1016/j.soilbio.2013.08.010.
- Lladó, S., N. Jiménez, M. Viñas, y A. M. Solanas. 2009. "Microbial Populations Related to PAH Biodegradation in an Aged Biostimulated Creosote-Contaminated Soil." *Biodegradation* 20 (5): 593–601. doi:10.1007/s10532-009-9247-1.
- Loehr, R. C., M. T. Webster, D. L. Johnston, E. M. Kegel, y J. D. Meyers. 2000. "Remediation of Petroleum Refinery Waste Pond Contents: A Case Study." *Waste Management* 4 (October): 140–47.
- Loreau, M. 2010. "Linking Biodiversity and Ecosystems: Towards a Unifying Ecological Theory." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 365 (1537): 49–60. doi:10.1098/rstb.2009.0155.
- Lu, Xiao Ying., X. Y. Lu, T. Zhang, Tong. Zhang, H. H. P. Fang, and Herbert Han Ping. Fang. 2011. "Bacteria-Mediated PAH Degradation in Soil and Sediment." *Applied Microbiology and Biotechnology* 89 (5): 1357–71. doi:10.1007/s00253-010-3072-7.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, J. Parker, E. G. Fernández, C. R. Fernández, y M. S. Pérez. 2004. *Brock Biología de Los Microorganismos*.
- Madueño, L., B. M. Coppotelli, H. M. Alvarez, y I. S. Morelli. 2011. "Isolation and Characterization of Indigenous Soil Bacteria for Bioaugmentation of PAH Contaminated Soil of Semiarid Patagonia,

Argentina." *International Biodeterioration and Biodegradation* 65 (2). Elsevier Ltd: 345–51. doi:10.1016/j.ibiod.2010.12.008.

Mahjoubi, M., A. Jaouani, A. Guesmi, S. Ben Amor, A. Jouini, H. Cherif, A. Najjari, A. Boudabous, N. Koubaa, y A. Cherif. 2013. "Hydrocarbonoclastic Bacteria Isolated from Petroleum Contaminated Sites In Tunisia: Isolation, Identification and Characterization of the Biotechnological Potential." *New Biotechnology* 30 (6). Elsevier B.V.: 723–33. doi:10.1016/j.nbt.2013.03.004.

Maletić, S., B. Dalmacija, y S. Rončević. 2013. "Petroleum Hydrocarbon Biodegradability in Soil." In *Implications for Bioremediation*, 22. doi:10.5772/50108.

Mao, J., Y. Luo, Y. Teng, y Z. Li. 2012. "Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Soil by a Bacterial Consortium and Associated Microbial Community Changes." *International Biodeterioration and Biodegradation* 70. Elsevier Ltd: 141–47. doi:10.1016/j.ibiod.2012.03.002.

Marcos, M. S., M. Lozada, W. D. Di Marzio, y H. M. Dionisi. 2012. "Abundance, Dynamics, and Biogeographic Distribution of Seven Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Dioxygenase Gene Variants in Coastal Sediments of Patagonia." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (5): 1589–92. doi:10.1128/AEM.06929-11.

Margesin, R., G. Feller, M. Hämmerle, U. Stegner, y F. Schinner. 2002. "A Colorimetric Method for the Determination of Lipase Activity in Soil." *Biotechnology Letters* 24: 27–33. doi:10.1006/abio.1995.0063.

Marhuenda-Egea, F. C., E. Martínez-Sabater, J. Jordá, R. Moral, M. A. Bustamante, C. Paredes, y M. D. Pérez-Murcia. 2007. "Dissolved Organic Matter Fractions Formed during Composting of Winery and Distillery Residues: Evaluation of the Process by Fluorescence Excitation-Emission Matrix." *Chemosphere* 68 (2): 301–9. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.12.075.

Martínez, E. H., J. P. Fuentes, y E. H. Acevedo. 2008. "Carbono Orgánico Y Propiedades Del Suelo." *Revista de La Ciencia Del Suelo Y Nutrición Vegetal* 8 (1): 68–96. doi:10.4067/S0718-27912008000100006.

Masakorala, K., J. Yao, H. Guo, R. Chandankere, J. Wang, M. Cai, H. Liu, y M. M. F Choi. 2013. "Phytotoxicity of Long-Term Total Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil - A Comparative and Combined Approach." *Water, Air, and Soil Pollution* 224 (5). doi:10.1007/s11270-013-1553-x.

Merdy, P., R. Achard, I. Samaali, y Y. Lucas. 2014. "Selective Extraction of PAHs from a Sediment with Structural Preservation of Natural Organic Matter." *Chemosphere* 107. Elsevier Ltd: 476–79. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.12.055.

Miller, C. M., R. L. Valentine, M. E. Roehl, y P. J. J. Alvarez. 1996. "Chemical and Microbiological Assessment of Pendimethalin-Contaminated Soil after Treatment with Fenton's Reagent." *Water Research* 30 (11): 2579–86.

Mohn, W. W., C. Z. Radziminski, M. C. Fortin, y K. J. Reimer. 2001. "On Site Bioremediation of Hydrocarbon-Contaminated Arctic Tundra Soils in Inoculated Biopiles." *Applied Microbiology and Biotechnology* 57 (1–2): 242–47. doi:10.1007/s002530100713.

Mora, V. C., L. Madueño, M. Peluffo, J. A. Rosso, M. T. Del Panno, y I. S. Morelli. 2014. "Remediation of Phenanthrene-Contaminated Soil by Simultaneous Persulfate Chemical Oxidation and Biodegradation Processes." *Environmental Science and Pollution Research* 21 (12): 7548–56. doi:10.1007/s11356-014-2687-0.

Morán Vieyra, F. E., V. I. Palazzi, M. I. Sanchez de Pinto, y C. D. Borsarelli. 2009. "Combined UV-Vis Absorbance and Fluorescence Properties of Extracted Humic Substances-like for Characterization of Composting Evolution of Domestic Solid Wastes." *Geoderma* 151 (3–4). Elsevier B.V.: 61–67. doi:10.1016/j.geoderma.2009.03.006.

Morelli, I. S., M. T. Del Panno, G. L. De Antoni, y M. T. Paineira. 2005. "Laboratory Study on the Bioremediation of Petrochemical Sludge-Contaminated Soil." *International Biodeterioration and Biodegradation* 55 (4): 271–78. doi:10.1016/j.ibiod.2005.03.001.

- Morelli, I. S., G. I. Vecchioli, M. T. Del Panno, y M. T. Paineira. 2001. "Effect of Petrochemical Sludge Concentrations on Changes in Mutagenic Activity during Soil Bioremediation Process." *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (10): 2179–83. doi:10.1002/etc.5620201007.
- Morgan, P., y R. J. Watkinson. 1992. "Factors Limiting the Supply and Efficiency of Nutrient and Oxygen Supplements for the *in Situ* Biotreatment of Contaminated Soil and Groundwater." *Water Research* 26 (1): 73–78. doi:10.1016/0043-1354(92)90113-I.
- Mrozik, A., y Z. Piotrowska-Seget. 2010. "Bioaugmentation as a Strategy for Cleaning up of Soils Contaminated with Aromatic Compounds." *Microbiological Research* 165 (5). Elsevier: 363–75. doi:10.1016/j.micres.2009.08.001.
- Muyzer, G., T. Brinkhoff, U. Nübel, C. Santegoeds, H. Schäfer, y C. Wawer. 1998. "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology." *Mol. Microb. Ecol* 3: 1–27.
- Muyzer, G., E. C. De Waal, y A. G. Uitterlinden. 1993. "Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA." *Applied and Environmental Microbiology* 59 (3): 695–700. doi:0099-2240/93/030695-06\$02.00/0.
- Nam, K., W. Rodriguez, y J. J. Kukor. 2001. "Enhanced Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Biodegradation Combined with a Modified Fenton Reaction." *Chemosphere* 45 (1): 11–20. doi:10.1016/S0045-6535(01)00051-0.
- Namkoong, W., E. Y. Hwang, J. S. Park, y J. Y. Choi. 2002. "Bioremediation of Diesel-Contaminated Soil with Composting." *Environmental Pollution* 119 (1): 23–31. doi:10.1016/S0269-7491(01)00328-1.
- Nannipieri, P., J. Ascher, M. T. Ceccherini, L. Landi, G. Pietramellara, y G. Renella. 2003. "Microbial Diversity and Soil Functions." *European Journal of Soil Science* 54 (4): 655. doi:10.1046/j.1365-2389.2003.00556.x.
- Nannipieri, P., F. Pedrazzini, P. G. Arcara, y C. Piovanelli. 1979. "Changes in Amino Acids, Enzyme Activities, and Biomasses during Soil Microbial Growth." *Soil Science* 127 (1): 26–34.
- Neher, D. A., T. R. Weicht, S. T. Bates, J. W. Leff, y N. Fierer. 2013. "Changes in Bacterial and Fungal Communities across Compost Recipes, Preparation Methods, and Composting Times." *PLoS ONE* 8 (11): e79512. doi:10.1371/journal.pone.0079512.
- Nikolopoulou, M., y N. Kalogerakis. 2008. "Enhanced Bioremediation of Crude Oil Utilizing Lipophilic Fertilizers Combined with Biosurfactants and Molasses." *Marine Pollution Bulletin* 56 (11): 1855–61. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.07.021.
- Nkwelang, G., y H. Kamga. 2008. "Studies on the Diversity, Abundance and Succession of Hydrocarbon Utilizing Micro Organisms in Tropical Soil Polluted with Oily Sludge." *African Journal of Biotechnology* 7 (8): 1075–80. <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58624>.
- Nocentini, M., D. Pinelli, y F. Fava. 2000. "Bioremediation of a Soil Contaminated by Hydrocarbon Mixtures: The Residual Concentration Problem." *Chemosphere* 41 (8): 1115–23. doi:10.1016/S0045-6535(00)00057-6.
- Oleszczuk, P. 2007. "Investigation of Potentially Bioavailable and Sequestered Forms of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons during Sewage Sludge Composting." *Chemosphere* 70 (2): 288–97. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.06.011.
- Osgerby, I. T. 2006. "ISCO Technology Overview: Do You Really Understand the Chemistry?" In *Contaminated Soils, Sediments and Water: Success and Challenges*, 287–308. doi:10.1007/0-387-28324-2_19.
- Ouvrard, S., C. Barnier, P. Bauda, T. Beguiristain, C. Biache, M. Bonnard, C. Caupert, et al. 2011. "In Situ Assessment of Phytotechnologies for Multicontaminated Soil Management." *International Journal of Phytoremediation* 13 (sup1): 245–63. doi:10.1080/15226514.2011.568546.
- Pan, L. W., R. L. Siegrist, y M. Crimi. 2012. "Effects of In Situ Remediation Using Oxidants or Surfactants on Subsurface Organic Matter and Sorption of Trichloroethene." *Ground Water Monitoring and Remediation* 31 (3): 82–94. doi:10.1111/j1745.

Pandey, J., A. Chauhan, y R. K. Jain. 2009. "Integrative Approaches for Assessing the Ecological Sustainability of *in Situ* Bioremediation." *FEMS Microbiology Reviews* 33 (2): 324–75. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00133.x.

Pannu, J. K., A. Singh, y O. P. Ward. 2004. "Vegetable Oil as a Contaminated Soil Remediation Amendment: Application of Peanut Oil for Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Soil." *Process Biochemistry* 39 (10): 1211–16. doi:10.1016/S0032-9592(03)00254-1.

Pape, A., C. Switzer, N. McCosh, y C. W. Knapp. 2015. "Impacts of Thermal and Smouldering Remediation on Plant Growth and Soil Ecology." *Geoderma* 243–244. Elsevier B.V.: 1–9. doi:10.1016/j.geoderma.2014.12.004.

Park, W., y E. L. Madsen. 2004. "Characterization in *Pseudomonas Putida* Cg1 of *nahR* and Its Role in Bacterial Survival in Soil." *Applied Microbiology and Biotechnology* 66 (2): 209–16. doi:10.1007/s00253-004-1630-6.

Parks, D. H., G. W. Tyson, P. Hugenholtz, y R. G. Beiko. 2014. "STAMP: Statistical Analysis of Taxonomic and Functional Profiles." *Bioinformatics* 30 (21): 3123–24. doi:10.1093/bioinformatics/btu494.

Peng, R. H., A. S. Xiong, Y. Xue, X. Y. Fu, F. Gao, W. Zhao, Y. S. Tian, y Q. H. Yao. 2008. "Microbial Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons." *FEMS Microbiology Reviews* 32 (6): 927–55. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x.

Pessacq, J., R. Medina, C. Terada, F. E. Bianchini, I. S. Morelli, y M. T. Del Panno. 2015. "Assessment of the Responsiveness to Different Stresses of the Microbial Community from Long-Term Hydrocarbon-Contaminated Soils." *Water, Air, and Soil Pollution* 226 (2): 1–13. doi:10.1007/s11270-014-2262-9.

Piccolo, A. 1994. "Interactions between Organic Pollutants and Humic Substances in the Environment." In *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*, 961–79.

Plaza, César, Baoshan Xing, José M. Fernández, Nicola Senesi, y Alfredo Polo. 2009. "Binding of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Humic Acids Formed during Composting." *Environmental Pollution* 157 (1): 257–63. doi:10.1016/j.envpol.2008.07.016.

Pumphrey, G. M., y E. L. Madsen. 2007. "Naphthalene Metabolism and Growth Inhibition by Naphthalene in *Pseudomonas Naphthalenivorans* Strain CJ2." *Microbiology* 153 (11): 3730–38. doi:10.1099/mic.0.2007/010728-0.

Quatrini, P., G. Scaglione, C. De Pasquale, S. Riela, y A. M. Puglia. 2008. "Isolation of Gram-Positive *N-Alkane* Degraders from a Hydrocarbon-Contaminated Mediterranean Shoreline." *Journal of Applied Microbiology* 104 (1): 251–59. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03544.x.

Reasoner, D. J., y E. E. Geldreich. 1985. "A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water." *Applied and Environmental Microbiology* 49 (1): 1–7.

Richardson, S. D., B. L. Lebron, C. T. Miller, y M. D. Aitken. 2011. "Recovery of Phenanthrene-Degrading Bacteria after Simulated *in Situ* Persulfate Oxidation in Contaminated Soil." *Environmental Science and Technology* 45 (2): 719–25. doi:10.1021/es102420r.

Rivas, R., M. Sánchez, M. E. Trujillo, J. L. Zurdo-Piñeiro, P. F. Mateos, E. Martínez-Molina, y E. Velázquez. 2003. "*Xylanimonas Cellulosilytica* Gen. Nov., Sp. Nov., a Xylanolytic Bacterium Isolated from a Decayed Tree (*Ulmus Nigra*)." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53 (1): 99–103. doi:10.1099/ij.s.0.02207-0.

Rodríguez-García, A., C. Barreiro, F. Santos-Beneit, A. Sola-Landa, y J. F. Martín. 2007. "Genome-Wide Transcriptomic and Proteomic Analysis of the Primary Response to Phosphate Limitation in *Streptomyces Coelicolor* M145 and in a *ΔphoP* Mutant." *Proteomics* 7 (14): 2410–29. doi:10.1002/pmic.200600883.

- Rosso, J. A., P. E. Allegretti, D. O. Mártire, y M. C. Gonzalez. 1999. "Reaction of Sulfate and Phosphate Radicals with Alpha ,alpha ,alpha -Trifluorotoluene." *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, no. 2: 205–10. doi:10.1039/a807751g.
- Roy, A. S., R. Baruah, M. Borah, A. K. Singh, H. P. Deka Boruah, N. Saikia, M. Deka, N. Dutta, y T. Chandra Bora. 2014. "Bioremediation Potential of Native Hydrocarbon Degrading Bacterial Strains in Crude Oil Contaminated Soil under Microcosm Study." *International Biodeterioration and Biodegradation* 94. Elsevier Ltd: 79–89. doi:10.1016/j.ibiod.2014.03.024.
- Sahl, J., y J. Munakata-Marr. 2006. "The Effects Ofin Situ Chemical Oxidation on Microbiological Processes: A Review." *Remediation Journal* 16 (3): 57–70. doi:10.1002/rem.20091.
- Said-Pullicino, D., y G. Gigliotti. 2007. "Oxidative Biodegradation of Dissolved Organic Matter during Composting." *Chemosphere* 68 (6): 1030–40. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.02.012.
- Salazar, S., L. E. Sánchez, J. Alvarez, A. Valverde, P. Galindo, J. M. Igual, A. Peix, y I. Santa-Regina. 2011. "Correlation among Soil Enzyme Activities under Different Forest System Management Practices." *Ecological Engineering* 37 (8): 1123–31. doi:10.1016/j.ecoleng.2011.02.007.
- Sanger, F., S. Nicklen, y A. R. Coulson. 1977. "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12): 5463–67. doi:10.1073/pnas.74.12.5463.
- Sarkar, D., M. Ferguson, R. Datta, y S. Birnbaum. 2005. "Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Soils: Comparison of Biosolids Addition, Carbon Supplementation, and Monitored Natural Attenuation." *Environmental Pollution* 136 (1): 187–95. doi:10.1016/j.envpol.2004.09.025.
- Sawulski, P., N. Clipson, y E. Doyle. 2014. "Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Microbial Community Structure and PAH Ring Hydroxylating Dioxygenase Gene Abundance in Soil." *Biodegradation* 25 (6): 835–47. doi:10.1007/s10532-014-9703-4.
- Sayara, T., E. Borràs, G. Caminal, M. Sarrà, y A. Sánchez. 2011. "Bioremediation of PAHs-Contaminated Soil through Composting: Influence of Bioaugmentation and Biostimulation on Contaminant Biodegradation." *International Biodeterioration and Biodegradation* 65 (6). Elsevier Ltd: 859–65. doi:10.1016/j.ibiod.2011.05.006.
- Sayara, T., M. Sarrà, y A. Sánchez. 2009. "Preliminary Screening of Co-Substrates for Bioremediation of Pyrene-Contaminated Soil through Composting." *Journal of Hazardous Materials* 172 (2–3): 1695–98. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.07.142.
- Sayara, T., M. Sarrà, y A. Sánchez. 2010a. "Effects of Compost Stability and Contaminant Concentration on the Bioremediation of PAHs-Contaminated Soil through Composting." *Journal of Hazardous Materials* 179 (1–3): 999–1006. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.03.104.
- Sayara, T., M. Sarrà, y A. Sánchez. 2010b. "Optimization and Enhancement of Soil Bioremediation by Composting Using the Experimental Design Technique." *Biodegradation* 21 (3): 345–56. doi:10.1007/s10532-009-9305-8.
- Scelza, R., M. A. Rao, y L. Gianfreda. 2010. "Properties of an Aged Phenanthrene-Contaminated Soil and Its Response to Bioremediation Processes." *Journal of Soils and Sediments* 10 (3): 545–55. doi:10.1007/s11368-009-0133-6.
- Scherr, K. E., T. Lundaa, V. Klose, G. Bochmann, y A. P. Loibner. 2012. "Changes in Bacterial Communities from Anaerobic Digesters during Petroleum Hydrocarbon Degradation." *Journal of Biotechnology* 157 (4). Elsevier B.V.: 564–72. doi:10.1016/j.jbiotec.2011.09.003.
- Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, et al. 2009. "Introducing Mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities." *Applied and Environmental Microbiology* 75 (23): 7537–41. doi:10.1128/AEM.01541-09.

- Semple, K. T., K. J. Doick, K. C. Jones, P. Burauel, A. Craven, y H. Harms. 2004. "Peer Reviewed: Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment Is Complicated." *Environmental Science and Technology* 38 (12): 228A–321A.
- Semple, K. T., K. J. Doick, L. Y. Wick, y H. Harms. 2007. "Microbial Interactions with Organic Contaminants in Soil: Definitions, Processes and Measurement." *Environmental Pollution* 150 (1): 166–76. doi:10.1016/j.envpol.2007.07.023.
- Semple, K. T., B. J. Reid, y T. R. Fermor. 2001. "Impact of Composting Strategies on the Treatment of Soil Contaminated with Diesel Fuel." *Environmental Pollution* 112: 269–83.
- Senesi, N., y Y. Chen. 1989. "Interaction of Toxic Organic Chemicals with Humic Substances." In *Toxic Organic Chemicals in Porous Media*, 37–90.
- Senesi, N., C. Plaza, G. Brunetti, y A. Polo. 2007. "A Comparative Survey of Recent Results on Humic-like Fractions in Organic Amendments and Effects on Native Soil Humic Substances." *Soil Biology and Biochemistry* 39 (6): 1244–62. doi:10.1016/j.soilbio.2006.12.002.
- Seo, J. S., Y. S. Keum, y Q. X. Li. 2009. "Bacterial Degradation of Aromatic Compounds." *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Vol. 6. doi:10.3390/ijerph6010278.
- Shahi, A., S. Aydin, B. Ince, y O. Ince. 2016. "Evaluation of Microbial Population and Functional Genes during the Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil as an Effective Monitoring Approach." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 125. Elsevier: 153–60. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.11.029.
- Sirguey, C., P. T. de Souza e Silva, C. Schwartz, y M. O. Simonnot. 2008. "Impact of Chemical Oxidation on Soil Quality." *Chemosphere* 72 (2): 282–89. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.01.027.
- Smyth, T. J. P., A. Perfumo, S. McClean, R. Marchant, y I. M. Banat. 2010. "Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology." In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 1:2314–28. doi:10.1007/978-3-540-77587-4.
- Sobrero, Mc, Alicia Ronco, y G Castillo. 2004. "Ensayo de Toxicidad Aguda Con Semillas de Lechuga (*Lactuca Sativa L.*)." In *Ensayos Toxicológicos Y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas.*, 55–68. <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/573/cap4.pdf>.
- Stamets, P., y J. S. Chilton. 1983. *The Mushroom Cultivator: A Practical Guide to Growing Mushrooms at Home*.
- Stevenson, I. L., y M. Schnitzer. 1982. "Transmission Electron Microscopy of Extracted Fulvic and Humic Acid." *Soil Science* 133 (3): 179–85.
- Stokes, J. D., G. I. Paton, y K. T. Semple. 2006. "Behaviour and Assessment of Bioavailability of Organic Contaminants in Soil: Relevance for Risk Assessment and Remediation." *Soil Use and Management* 21: 475–86. doi:10.1079/SUM2005347.
- Stroo, H. F., R. Jensen, R. C. Loehr, D. V. Nakles, A. Fairbrother, y C. B. Liban. 2000. "Environmentally Acceptable Endpoints for PAHs at a Manufactured Gas Plant Site." *Environmental Science and Technology* 34 (18): 3831–36. doi:10.1021/es990623g.
- Sui, H., Z. Hua, X. Li, H. Li, y G. Wu. 2014. "Influence of Soil and Hydrocarbon Properties on the Solvent Extraction of High-Concentration Weathered Petroleum from Contaminated Soils." *Environmental Science and Pollution Research* 21 (9): 5774–84. doi:10.1007/s11356-014-2511-x.
- Sun, H. B., M. Tateda, M. Ike, y M. Fujita. 2003. "Short- and Long-Term Sorption/desorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons onto Artificial Solids: Effects of Particle and Pore Sizes and Organic Matters." *Water Research* 37 (12): 2960–68. doi:10.1016/S0043-1354(02)00450-5.
- Sun, R., X. X. Zhang, X. Guo, D. Wang, y H. Chu. 2015. "Bacterial Diversity in Soils Subjected to Long-Term Chemical Fertilization Can Be More Stably Maintained with the Addition of Livestock Manure than Wheat Straw." *Soil Biology and Biochemistry* 88. Elsevier Ltd: 9–18. doi:10.1016/j.soilbio.2015.05.007.
- Sutton, N. B., T. C. Grotenhuis, A. A. M. Langenhoff, y H. H. M. Rijnaarts. 2011. "Efforts to Improve Coupled in Situ Chemical Oxidation with Bioremediation: A Review of Optimization Strategies." *Journal of Soils and Sediments* 11 (1): 129–40. doi:10.1007/s11368-010-0272-9.

- Sutton, N. B., M. Kalisz, J. Krupanek, J. Marek, T. C. Grotenhuis, H. Smidt, J. De Weert, H. H. M. Rijnaarts, P. Van Gaans, y T. Keijzer. 2014a. "Geochemical and Microbiological Characteristics during in Situ Chemical Oxidation and in Situ Bioremediation at a Diesel Contaminated Site." *Environmental Science and Technology* 48 (4): 2352–60. doi:10.1021/es404512a.
- Sutton, N. B., T. C. Grotenhuis, y H. H. M. Rijnaarts. 2014b. "Impact of Organic Carbon and Nutrients Mobilized during Chemical Oxidation on Subsequent Bioremediation of a Diesel-Contaminated Soil." *Chemosphere* 97. Elsevier Ltd: 64–70. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.11.005.
- Sutton, N. B., A.A. M. Langenhoff, D. H. Lasso, B. Van Der Zaan, P. van Gaans, F. Maphosa, H. Smidt, T. C. Grotenhuis, y H. H. M. Rijnaarts. 2014c. "Recovery of Microbial Diversity and Activity during Bioremediation Following Chemical Oxidation of Diesel Contaminated Soils." *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (6): 2751–64. doi:10.1007/s00253-013-5256-4.
- Sutton, R., y G. Sposito. 2005. "Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View." *Environmental Science and Technology* 39 (23): 9009–15. doi:10.1021/es050778q.
- Szczepaniak, Z., J. Czarny, J. Staninska-Pięta, P. Lisiecki, A. Zgoła-Grześkowiak, P. Cyplik, Ł. Chrzanowski, et al. 2016. "Influence of Soil Contamination with PAH on Microbial Community Dynamics and Expression Level of Genes Responsible for Biodegradation of PAH and Production of Rhamnolipids." *Environmental Science and Pollution Research* 23 (22): 23043–56. doi:10.1007/s11356-016-7500-9.
- Szulc, A., D. Ambrozewicz, M. Sydow, Ł. Ławniczak, A. Piotrowska-Cyplik, R. Marecik, y Ł. Chrzanowski. 2014. "The Influence of Bioaugmentation and Biosurfactant Addition on Bioremediation Efficiency of Diesel-Oil Contaminated Soil: Feasibility during Field Studies." *Journal of Environmental Management* 132: 121–28. doi:10.1016/j.jenvman.2013.11.006.
- Tabak, H. H., J. M. Lazorchak, Li. Lei, A. P. Khodadoust, J. E. Antia, R. Bagchi, y M. T. Suidan. 2003. "Studies on Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Sediments: Bioavailability, Biodegradability, and Toxicity Issues." *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (3): 473–82. doi:10.1002/etc.5620220303.
- Tamaki, H., C. L. Wright, X. Li, Q. Lin, C. Hwang, S. Wang, J. Thimmapuram, Y. Kamagata, y W. T. Liu. 2011. "Analysis of 16S rRNA Amplicon Sequencing Options on the roche/454 next-Generation Titanium Sequencing Platform." *PLoS ONE* 6 (9): 6–8. doi:10.1371/journal.pone.0025263.
- Tang, J., H. H. Liste, y M. Alexander. 2002. "Chemical Assays of Availability to Earthworms of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil." *Chemosphere* 48 (1): 35–42. doi:10.1016/S0045-6535(02)00046-2.
- Tao, D. 2005. "Role of Bubble Size in Flotation of Coarse and Fine Particles—A Review." *Separation Science and Technology* 39 (4): 741–60. doi:10.1081/SS-120028444.
- Tardif, S., E. Yergeau, J. Tremblay, P. Legendre, L. Whyte, y C. Greer. 2016. "The Willow Microbiome Is Influenced by Soil Petroleum-Hydrocarbon Concentration with Plant Compartment-Specific Effects." *Frontiers in Microbiology* 7 (September): 1–14. doi:10.3389/fmicb.2016.01363.
- Tatàno, F., F. Felici, y F. Mangani. 2013. "Lab-Scale Treatability Tests for the Thermal Desorption of Hydrocarbon-Contaminated Soils." *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 22 (4): 433–56. doi:10.1080/15320383.2013.721814.
- Teng, Y., Y. Luo, L. Ping, D. Zou, Z. Li, y P. Christie. 2010. "Effects of Soil Amendment with Different Carbon Sources and Other Factors on the Bioremediation of an Aged PAH-Contaminated Soil." *Biodegradation* 21 (2): 167–78. doi:10.1007/s10532-009-9291-x.
- Torsvik, V., y L. Øvreas. 2002. "Microbial Diversity and Function in Soil: From Genes to Ecosystems." *Ecology and Industrial Microbiology* 5 (3): 240–45. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7.
- Torsvik, V., L. Øvreas, y T. F. Thingstad. 2002. "Prokaryotic Diversity--Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors." *Science* 296: 1064–66. doi:10.1126/science.1071698.

- Towell, M. G., J. Bellarby, G. I. Paton, F. Coulon, S. J. T. Pollard, y K. T. Semple. 2011. "Mineralisation of Target Hydrocarbons in Three Contaminated Soils from Former Refinery Facilities." *Environmental Pollution* 159 (2). Elsevier Ltd: 515–23. doi:10.1016/j.envpol.2010.10.015.
- Tsibart, A. S., y A. N. Gennadiev. 2013. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils: Sources, Behavior, and Indication Significance (a Review)." *Eurasian Soil Science* 46 (7): 728–41. doi:10.1134/S1064229313070090.
- Tsitonaki, A., B. Petri, M. L. Crimi, H. Mosbæk, R. L. Siegrist, y P. L. Bjerg. 2010. "In Situ Chemical Oxidation of Contaminated Soil and Groundwater Using Persulfate: A Review." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, no. December 2013: 37–41. doi:10.1080/10643380802039303.
- Tuomela, M., M. Vikman, A. Hatakka, y M. Itävaara. 2000. "Biodegradation of Lignin in a Compost Environment: A Review." *Bioresource Technology* 72 (2): 169–83. doi:10.1016/S0960-8524(99)00104-2.
- Vecchioli, G. I., M. T. Del Panno, y M. T. Paineira. 1990. "Use of Selected Autochthonous Soil Bacteria to Enhanced Degradation of Hydrocarbons in Soil." *Environmental Pollution* 67: 249–58. doi:10.1016/0269-7491(90)90190-N.
- Verchot, L. V., y T. Borelli. 2005. "Application of Para-Nitrophenol (pNP) Enzyme Assays in Degraded Tropical Soils." *Soil Biology and Biochemistry* 37 (4): 625–33. doi:10.1016/j.soilbio.2004.09.005.
- Vila, J., y M. Grifoll. 2009. "Actions of Mycobacterium Sp. Strain AP1 on the Saturated- and Aromatic-Hydrocarbon Fractions of Fuel Oil in a Marine Medium." *Applied and Environmental Microbiology* 75 (19): 6232–39. doi:10.1128/AEM.02726-08.
- Visioli, G., F. D. Conti, C. Gardi, y C. Menta. 2014. "Germination and Root Elongation Bioassays in Six Different Plant Species for Testing Ni Contamination in Soil." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 92 (4): 490–96. doi:10.1007/s00128-013-1166-5.
- Walworth, J. L., A. Pond, I. Snape, J. L. Rayner, S. H. Ferguson, y P. Harvey. 2007. "Nitrogen Requirements for Maximizing Petroleum Bioremediation in a Sub-Antarctic Soil." *Cold Regions Science and Technology* 48 (2 SPEC. ISS.): 84–91. doi:10.1016/j.coldregions.2006.07.001.
- Wan, C. K., J. W. C. Wong, M. Fang, y D. Y. Ye. 2003. "Effect of Organic Waste Amendments on Degradation of PAHs in Soil Using Thermophilic Composting." *Environmental Technology* 24 (1): 23–30. doi:10.1080/09593330309385532.
- Wang, H., J. Zhang, X. Wang, W. Qi, y Y. Dai. 2012. "Genome Shuffling Improves Production of the Low-Temperature Alkalophilic Lipase by *Acinetobacter Johnsonii*." *Biotechnology Letters* 34 (1): 145–51. doi:10.1007/s10529-011-0749-7.
- Wang, J., X. Zhang, y G. Li. 2012. "Effects of Ozonation on Soil Organic Matter of Contaminated Soil Containing Residual Oil." *Journal of Soils and Sediments* 12 (2): 117–27. doi:10.1007/s11368-011-0439-z.
- Wang, Q., G. M. Garrity, J. M. Tiedje, y J. R. Cole. 2007. "Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (16): 5261–67. doi:10.1128/AEM.00062-07.
- Wang, S. Y., Y. C. Kuo, A. Hong, Y. C. Chang, y C. M. Kao. 2016. "Bioremediation of Diesel and Lubricant Oil-Contaminated Soils Using Enhanced Landfarming System." *Chemosphere* 164. Elsevier Ltd: 558–67. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.08.128.
- Whalen, J. K., y P.R. Warman. 1996. "Arylsulfatase Activity in Soil and Soil Extracts Using Natural and Artificial Substrates." *Biology and Fertility of Soils* 22: 373–78.
- Williamson, D. G., R. C. Loehr, y Y. Kimura. 1997. "Measuring Release and Biodegradation Kinetics of Aged Hydrocarbons from Soils." *In Situ and On-Site Bioremediation* 5: 605–10.
- Wu, G., C. Kechavarzi, X. Li, H. Sui, S. J. T. Pollard, y F. Coulon. 2013. "Influence of Mature Compost Amendment on Total and Bioavailable Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Contaminated Soils." *Chemosphere* 90 (8). Elsevier Ltd: 2240–46. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.10.003.

Wu, M., W. A. Dick, W. Li, X. Wang, Q. Yang, T. Wang, L. Xu, M. Zhang, y L. Chen. 2016. "Bioaugmentation and Biostimulation of Hydrocarbon Degradation and the Microbial Community in a Petroleum-Contaminated Soil." *International Biodeterioration and Biodegradation* 107. Elsevier Ltd: 158–64. doi:10.1016/j.ibiod.2015.11.019.

Yen, C. H., K. F. Chen, C. M. Kao, S. H. Liang, y T. Y. Chen. 2011. "Application of Persulfate to Remediate Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil: Feasibility and Comparison with Common Oxidants." *Journal of Hazardous Materials* 186 (2): 2097–2102.

Zhang, G. Y., J. Y. Ling, H. B. Sun, J. Luo, Y. Y. Fan, y Z. J. Cui. 2009. "Isolation and Characterization of a Newly Isolated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-Degrading *Janibacter Anophelis* Strain JY11." *Journal of Hazardous Materials* 172 (2–3): 580–86. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.07.037.

Zhang, H., Y. Sekiguchi, S. Hanada, P. Hugenholtz, H. Kim, Y. Kamagata, y K. Nakamura. 2003. "Gemmatimonas Aurantiaca Gen. Nov., Sp. Nov., a Gram-Negative, Aerobic, Polyphosphate-Accumulating Micro-Organism, the First Cultured Representative of the New Bacterial Phylum Gemmatimonadetes Phyl. Nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53 (4): 1155–63. doi:10.1099/ijs.0.02520-0.

Zhang, Y., D. Meng, Z. Wang, H. Guo, Y. Wang, X. Wang, y X. Dong. 2012. "Oxidative Stress Response in Atrazine-Degrading Bacteria Exposed to Atrazine." *Journal of Hazardous Materials* 229–230. Elsevier B.V.: 434–38. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.05.054.

Zhao, Y. S., C. Sun, J. Q. Sun, y R. Zhou. 2015. "Kinetic Modeling and Efficiency of Sulfate Radical-Based Oxidation to Remove *P*-Nitroaniline from Wastewater by persulfate/Fe₃O₄ Nanoparticles Process." *Separation and Purification Technology* 142. Elsevier B.V.: 182–88. doi:10.1016/j.seppur.2014.12.035.

Abreviaturas utilizadas

AF: Ácidos Fúlvicos

AH: Ácidos Húmicos

BD-C: Bacterias Degradadoras de Celulosa

BD-HAs: Bacterias Degradadoras de HAs

BD-PAHs: Bacterias Degradadoras de PAHs

BHT: Bacterias Heterótrofas Totales cultivables

BSP: Bacterias que Solubilizan Fósforo

CTD: Carbono Total Disuelto

GN: Gram Negativa

GP: Gram Positiva

HAs: Hidrocarburos Alifáticos

IE%: Índice de inhibición en la elongación radicular

IG%: Índice de germinación

MEEF: Matrices de Excitación Emisión de Fluorescencia

MOS: Materia Orgánica del Suelo

PAHs: Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos

PS: Persulfato de amonio

RH: Recuento de Hongos

RHD α : Subunidad alfa de dioxigenasa, *Ring-Hydroxylating-Dioxygenase Alpha Subunit*

S₀: Suelo contaminado

SA: Suelo Acondicionado

SC: Suelo Compostado

SE: Suelo Estimulado con compost (enmienda orgánica)

SF: Suelo estimulado con NH₄NO₃ (sales inorgánicas)

SH: Sustancias Húmicas

SOx: Suelo tratado con persulfato

SOxA: Suelo Oxidado Acondicionado

SOxC: Suelo Oxidado Compostado

SOxDE: Suelo Oxidado Doblemente Estimulado con compost

SOxE: Suelo Oxidado Estimulado con compost (enmienda orgánica)

SP: Suelo del predio

PCR: reacción en cadena de la polimerasa. *Polymerase Chain Reaction*

qPCR: PCR cuantitativa. *Quantitative PCR*

DGGE: electroforésis en gel con gradient desnaturizante. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

Anexos

Anexo I: Análisis realizado sobre el estiércol de cabra, el rastrojo de avena y el compost tradicional

Análisis realizado sobre el estiércol de cabra y el rastrojo de avena

En la Tabla A.I.1 se presenta la caracterización microbiológica de los materiales utilizados para llevar a cabo el compostaje. Tanto el estiércol de cabra como el rastrojo de avena poseen una carga de bacterias heterótrofas y de hongos superior a la presente en S_0 . También, en el estiércol de cabra fueron detectadas poblaciones bacterianas que solubilizan fósforo, degradadoras de HAs, degradadoras de PAHs y degradadoras de celulosa. El agente de volumen (rastrojo de avena) presentó una comunidad potencialmente degradadora de HAs y celulosa.

Tabla A.I.1 Caracterización microbiológica de los materiales utilizados para el proceso de compostaje.

Población	Estiércol de cabra	Rastrojo de avena
Bacterias heterótrofas (BH) [\log UFC g_{SS}^{-1}].	9.57 ± 0.06	11.06 ± 0.01
Hongos (RH) [\log UFC g_{SS}^{-1}].	4.45 ± 0.01	6.8 ± 0.6
Bacterias solubilizadoras de P [\log UFC g_{SS}^{-1}].	5.26 ± 0.05	<i>No detectado</i>
Bacterias degradadoras de HAs [\log NMP BD-HAs g_{SS}^{-1}].	$> 5.6 \pm 0.6$	$> 5.8 \pm 0.6$
Bacterias degradadoras de PAHs [\log NMP BD-PAHs g_{SS}^{-1}].	5.11	<i>No detectado</i>
Bacterias degradadoras de celulosa [\log NMP BD-C g_{SS}^{-1}].	5.6 ± 0.6	4.9 ± 0.5

Análisis realizados sobre el compost tradicional, utilizado como enmienda orgánica en los ensayos de estimulación con compost

La humedad del compost obtenido en el laboratorio fue de 60 %, y el pH de este material fue de 7.58.

El estudio de las poblaciones cultivables mostró que el compost posee una población de bacterias heterótrofas, de hongos y poblaciones que solubilizan fósforo, como se detalla en la Tabla A1.II. No se detectaron bacterias degradadoras de PAHs.

Tabla A1.II. Caracterización microbiológica del compost utilizado como enmienda en los ensayos de estimulación.

Población	Compost
Bacterias heterótrofas (BH) [log UFC g _{SS} ⁻¹].	8.5 ± 0.1
Hongos (RH) [log UFC g _{SS} ⁻¹].	6.10 ± 0.04
Bacterias solubilizadoras de P [log UFC g _{SS} ⁻¹].	5.39 ± 0.01
Bacterias degradadoras de PAHs [log NMP BD-PAHs g _{SS} ⁻¹]	<i>No detectado</i>

La actividad deshidrogenasa medida en el compost fue de 2782 ± 80 µg TPF g compost seco⁻¹, es decir que es un material biológicamente activo.

Anexo II: Medios de cultivo

Todos los medios y soluciones se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1 atmósfera extra de presión durante 15 minutos. La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detallan a continuación (composición especificada por 1000 ml de agua destilada). El pH de los medios se ajustó por agregado de NaOH o HCl al 10% según corresponda.

A.I.1. Solución fisiológica

NaCl 0,85 % (p/v) en agua destilada.

A.I.2. Agar Reasoner 2A (R2) (Reasoner y Geldreich 1985). El pH se ajustó en 7.2.

Compuesto	g L ⁻¹
Extracto de levadura	0.5
Proteosa peptona	0.5
Ácido casamino	0.5
Glucosa	0.5
Almidón	0.5
Ácido pirúvico	0.3
K ₂ HPO ₄	0.3
MgSO ₄	0.05
Agar	15

A.I.3. Agar Rosa de Bengala (RB) (Vecchioli y col., 1990). El pH se ajustó en 6.0. Una vez esterilizado, dejar templar y adicionar estreptomicina, 0.25 mg L⁻¹.

Compuesto	g L ⁻¹
Peptona	5
Glucosa	10
MgSO ₄	0.5
KH ₂ (PO ₄) ₃	1
Rosa de bengala	0.035
Agar	15

A.I.4. Agar Solubilización de Fósforo Inorgánico (SFI) (Goldstein 1986). El pH se ajustó en 7.2.

Compuesto	g L ⁻¹
Glucosa	10
MgSO ₄	1
NaCl	1
NH ₄ Cl	5
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
Agar	20

A.I.5. Medio Mineral Líquido (MML) (Vecchioli y col., 1990). El pH se ajustó en 7.0.

Compuesto	g L ⁻¹
NaCl	5
K ₂ HPO ₄	1
(NH ₄)H ₂ PO ₄	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgSO ₄	0.2
KNO ₃	3

A.I.6. MML suplementado con celulosa (Bölter 1977).

Tubos de vidrio conteniendo 5 ml de MML se suplementan con una tira de papel de filtro de 0.5mm x 20 mm aproximadamente.

A.I.7. MML suplementado con PAHs (Pessacq y col., 2015)

Se prepara una mezcla de PAHs en pentano de la siguiente composición (expresada en g L⁻¹ de pentano). La mezcla se conserva en refrigeración (4°C).

En placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano estériles se coloca en cada pocillo 20 µl de la mezcla. Una vez evaporado el solvente se adicionan 180 µl de MML por pocillo.

Compuesto	g L ⁻¹
Fenantreno	1
Fluoreno	0.5
Antraceno	0.5
Dibenzotiofeno	0.5

A.I.8. MML suplementado con hexadecano (Pessacq y col., 2015)

Tubos de vidrio conteniendo 5 ml de MML estériles son suplementados con 50 µl de hexadecano comercial (Merk).

A.I.9. Luria Bertani (LB) (Technical Manual pGEM T and pGEM T Easy Vector Systems) (Technical Manual- pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems, Promega. Instruction for use of product A1360, A1380, A3600 and A3610, Promega). El pH se ajustó en 7.0. Una vez esterilizado, templar y una vez a 50°C se adiciona la ampicilina hasta concentración final 100 µg/ml.

Compuesto	g L ⁻¹
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5

A.I.10. Agar LB suplementado con ampicilina/ IPTG/ X-Gal

Se agregan 15 g/l de agar (Difco) al medio de cultivo caldo LB. Una vez esterilizado, cuando el medio se encuentre a unos 50°C, se agrega ampicilina hasta concentración de 100µg ml⁻¹. Luego se suplementa con 0.5mM IPTG y 80µg ml⁻¹ de X-Gal, según se

describe en el manual técnico del sistema de clonado de los vectores pGEM.T y pGEM-T Easy (Promega).

Anexo III: Soluciones y reactivos empleados en estudios de funcionalidad del suelo

AIII.1. Drogas utilizadas en los ensayos enzimáticos

- Triclorofeniltetrazolio: Cicarelli, pro análisis.
- Trifenilformazan: Sigma Aldrich.
- *p* NPB: 4 nitrofenil butirato. Sigma Aldrich. Pureza >98%.
- *p* NPS: 4 nitrofenil sulfato de potasio. Sigma Aldrich. Pureza >98%.
- *p* NPP: 4 nitrofenil fosfato disódico. Sigma Aldrich. Pureza >98%.
- *p* NP: 4 nitrofenol. Sigma Aldrich. Pureza >98%.
- Urea: calidad molecular. Merk. Pureza >99%.
- Caseína de leche bovina: Sigma Aldrich.
- L-tirosina: Merk. Pureza >99%.
- Acido tricolor acético (TCA): Biopack, pro-análisis.
- Soluciones para la determinación de aminoácidos mediante el método de Lowry.

Reactivo A: Carbonato de sodio 2%, NaOH 0.1 M.

Reactivo B1: Sulfato de cobre 1%

Reactivo B2: Tartrato de sodio potasio 2%.

Reactivo C: Se prepara en el momento de iniciar el ensayo, mezclando los 3 anteriores en proporción 50:0.5:0.5.

A.III.2. Soluciones utilizadas en la medida de la respuesta respiratoria inducida por sustrato

Todas las soluciones fueron preparadas en el momento con reactivos de calidad pro-análisis de uso común en el laboratorio. Los mono y disacáridos fueron preparados en concentración 100 mM; los sustratos aminoacídicos en concentración 10 mM, los hidratos de carbono en 10 mM y los hidrocarburos en 100 ppm. En todos los casos el pH fue ajustado en 6. A continuación se listan los sustratos empleados para determinar el perfil catabólico del suelo.

Glucosa	Xilosa	Fructosa	Manitol
Celobiosa	Lactosa	Adonitol	Glucosa 6 fosfato
Glicerol 3 fosfato	Piruvato de sodio	Tirosina	Arginina
Glicina	Fenilalanina	Taurina	N-acetilglucosamina
Acido cítrico	Acido succínico	Ácido glutámico	Acido ascórbico
Dextrina	Tween 20	Tween 80	Almidón
Tetracosano	Acido naftoico	Fenantreno	Fluoreno

Anexo IV: Soluciones y reactivos empleados en los estudios genómicos

A.IV. 1. Extracción de ADN de suelo

1. Pesar 500 mg de perlas de vidrio en un tubo de centrifuga.
2. Agregar 0.2-1 g de suelo.
3. Agregar 1 ml de buffer SLX-Mlus. Vortex durante 4 minutos.
4. Agregar 100 µL de buffer DS. Mezclar por vortex.
5. Incubar 10 minutos en baño a 70°. A los 5 minutos, volver a mezclar.
6. Incubar 2 minutos a 95°C.
7. Centrifugar los tubos durante 3 minutos a 3000 rpm.
8. Transferir 800 µL del sobrenadante a un tubo de microcentrífuga. Repetir los pasos 3-8 dos veces, juntando los sobrenadantes sucesivos.
9. Agregar 270 µL de buffer P2. Mezclar.

10. Incubar en hielo 4 minutos.
11. Centrifugar a $\geq 13,000 \times g$ por 5 minutos a 4°C.
12. Cuidadosamente transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifuga.
13. Agregar 0.7 volúmenes de isopropanol frío. Mezclar por inversión unas 20 o 30 veces e incubar a -20°C durante 1 hora.
14. Centrifugar a $\geq 13,000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C.
15. Cuidadosamente descartar el sobrenadante, sin tocar el pellet de AND.
16. Invertir los tubos en papel absorbente y secar durante 1 minuto.
17. Agregar 200 μL de buffer Elution y agitar con vortex durante 10 segundos.
18. Incubar a 70°C 15 minutos para disolver el pellet.
19. Agregar 100 μL de reactivo HTR y mezclar con vortex.
20. Incubar a temperatura ambiente 2 minutos.
21. Centrifugar a $\geq 13,000 \times g$ durante 2 minutos.
22. Transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrifuga limpio. Si el sobrenadante no es claro/ transparente, repetir los pasos 18-20.
23. Agregar igual volumen de buffer XP1 y mezclar.
24. Colocar una columna HiBind® DNA Mini Column dentro de un tubo de 2 mL
25. Transferir la muestra del paso 22 a la columna.
26. Centrifugar 1 minuto a 10,000 g a temperatura ambiente.
27. Descartar el eluyente.
28. Agregar 300 μL de buffer XP1.
29. Centrifugar a 10,000 $\times g$ durante 1 minuto.
30. Descartar el eluyente.
31. Colocar la columna HiBind® DNA Mini Column dentro de un tubo de 2 mL nuevo.
32. Agregar 700 μL de buffer SPW Wash
33. Centrifugar a 10,000 $\times g$ durante 1 minuto.
34. Descartar el filtrado.

35. Repetir los pasos 31 a 33.
36. Centrifugar la columna vacía durante 2 minutos a $\geq 13,000 \times g$ a temperatura ambiente.
37. Transferir la columna a un tubo de 1.5ml limpio.
38. Agregar entre 30 y 100 μL de buffer Elution.
39. Incubar a 70° durante 15 minutos.
40. Centrifugar a $\geq 13,000 \times g$ durante 1 minuto.
41. Repetir las etapas 37-39.
42. Conservar el ADN a -20°C .

A.IV.2. Preparación de soluciones de DGGE

Las soluciones utilizadas en la preparación de los geles de DGGE se describen en la siguiente tabla (Tabla A.IV.1). Las cantidades que se indican son para preparar 100 ml de cada solución. La acrilamida/bisacrilamida utilizada es una solución comercial 30%, en relación 29:1. (Biorad). La urea utilizada fue de calidad Merk. La formamida es de uso de biología molecular desionizada (AppliChem).

Tabla A.IV.1. Preparación de soluciones estándar para el armado de geles desnaturizantes de acrilamida/bisacrilamida con gradiente desnaturizante de urea. Se lleva a 100 ml con agua destilada en matraz.

Solución	80%	0%
TAE 40X	2.5 ml	2.5 ml
Acrilamida: bisacrilamida	20.14 ml	20.14 ml
Urea	33.8 g	-
Formamida	32 ml	-

Para el armado de los distintos gradientes desnaturizantes se prepararon soluciones de distinto % de urea, según se describe a continuación (Tabla A.IV.2). Para el estudio de la estructura de la comunidad mediante PCR 16S - rADN se utilizó el gradiente 45-70%. El Persulfato de sodio (PAS) utilizado fue de grado molecular (Sigma Aldrich), preparado en el momento (100 mg ml^{-1}) en agua bidestilada. El TEMED que se usó fue de AppliChem (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina) de grado molecular.

Tabla A.IV.2. Descripción de la composición de cada solución empleada en el armado de geles de acrilamida/bisacrilamida con gradiente desnaturizante de urea.

Solución	45%	70%
0% (ml)	4.81	1.38
80% (ml)	6.19	9.62
TEMED (μ l)	18	18
PAS (μ l)	72	72

Para el stacking, se utilizaron 5 ml de solución 0% suplementados con 5 μ l de TEMED y 25 μ l de PAS .

Anexo V: Descripción de las regiones utilizadas en los estudios de diversidad mediante pirosecuenciación del gen 16S rRNA

Como se mencionó en Materiales y métodos, se realizaron estudios de diversidad mediante distintos ensayos.

Una de las modalidades se realizó utilizando el servicio del Laboratorio de investigación molecular (MR DNA; Shallowater, TX; <http://www.mrdnalab.com/>), donde la amplificación fue con los *primers* 341Fbac (5'- CCTACGGGAGGCAGCAG-3') (Muyzer y col., 1993) y 909R. La pirosecuenciación también se realizó en la Estación Experimental del Zaidín durante una estancia corta en el marco del Programa BecAr , donde la amplificación se llevó a cabo con los *primers* U519F (5'- CAGCMGCCGCGTAATWC-3') y U926R (5'- CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3') (Baker y col., 2003).

En la Tabla A.V.1 se describe la metodología empleada para el estudio de la diversidad en cada microcosmos.

Tabla A.V.1. Descripción de la metodología empleada en cada microcosmos para el estudio de diversidad mediante pirosecuenciación del gen 16S rRNA

Región analizada	Microcosmos
V3-V5	Suelo contaminado (S ₀) Suelo Acondicionado (SA) Suelo Compostado (SC) Suelo Estimulado con compost (SE) Suelo tratado con persulfato (SOx ₀) Suelo tratado con persulfato Acondicionado, 1 mes (SOxA-1m) Suelo tratado con persulfato Acondicionado, 5 meses (SOxA-5m) Suelo tratado con persulfato Acondicionado, 9 meses (SOxA-9m) Suelo tratado con persulfato Acondicionado, 12 meses (SOxA-12m)
V4-V5	Suelo contaminado (S ₀) Suelo tratado con persulfato (SOx ₀) Suelo tratado con persulfato Acondicionado, 12 meses (SOxA-12m) Suelo tratado con persulfato Compostado, 12 meses (SOxC-12m) Suelo tratado con persulfato Doblemente Estimulado con compost, 12 meses (SOxDE-12m)

Anexo VI: Secuencias obtenidas mediante el clonado de la región RHD α de genes dioxigenasa

En la Tabla A.VI.1 se detalla el número de acceso con el que fue anotada la secuencia obtenida para cada clon en la base de datos <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Tabla A.VI.1. Identificación y número de acceso a la base de datos <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> de las secuencias obtenidas para cada clon secuenciado.

Identificación	Número de acceso	Identificación	Número de acceso
Clon GP 5	KU608338	Clon GN 1	KU608343
Clon GP 6	KU608339	Clon GN 2	KU608344
Clon GP 8	KU608340	Clon GN 7	KU608345
Clon GP 9	KU608341	Clon GN 8	KU608346
Clon GP 10	KU608342	Clon GN 13	KU608347
Clon GP 11	KU608333	Clon GN 14	KU608348
Clon GP 15	KU608334	Clon GN 15	KU608349
Clon GP 16	KU608335	Clon GN 16	KU608350
Clon GP 19	KU608336	Clon GN 18	KU608351
Clon GP 20	KU608337	Clon GN 20	KU608352

- Clones correspondientes a genes dioxigenasa (PAH-RHD α) de bacterias gram positivas (GP)

Se obtuvo una única secuencia, de 241 pares de bases:

**GGACGGCTATCACACGGTCATGACGCACCGTTCGATGTGTGAGCTGGGGTTGTTACCGCCCG
ATAATGTGGCCGTTTCGCCGGCCACGTCAGCCTATCGGGCGGGCACGGGGCGGGCGTTCT
AGGCGCACCAACCGGCATACCCGCACCGCCGTACATGGGCTATCCGGAGGAAGTCGTCTCCG
GTCTCAGCGAGGGTTACGGCGATGACGTCCATGGCGAGTTGCTGAAACGGACGATG**

- Clones correspondientes a genes dioxigenasa (PAH-RHD α) de bacterias gram negativas (GN)

Los clones GN 1, GN 2, GN 14, GN 18 y GN 20 mostraron similitud (100%) en la secuencia clonada. Por otro lado, la secuencia de los clones GN 15 y GN 16 fue idéntica. Si bien la secuencia de los clones GN 7, GN 8 y GN 13 mostró gran similitud con las anteriores, todas presentaron diferencias en la secuencia nucleotídica. Todas las secuencias obtenidas fueron de 254 pares de bases.

Secuencia de los clones GN 1, GN 2, GN 14, GN 18 y GN 20:

**CGCATGCGTCTTCGCTTCGCTCAGGGCAGTCGGTCTTCTCGTCGTTAGCTGGCAACGCAGCTT
TGCCCCAGAAGGTGCAGGTCTGCAAATGACCTCAAATACGGCAGCGGCCTGGGTGTGTT
GTGGGACGCATATTCAGGCGTGACAGCGCAGACCTGGTTCCGGAATTGATGGCCTTCGGC
GGTGCTAAGCAGGAACGGCTGAACAAAGAAATTGGCGAGGTTGCGGCACGAATCTATCGC
AGCCACCTC**

Secuencia de los clones GN 15 y GN 16

**CGCACGCGTCTTCGCTTCGCTCAGGGCAGTCGGTCTTCTCGTCGTTAGCTGGCAACGCAGCTT
TGCCCCAGAAGGTGCAGGTCTGCAAATGACCTCAAATACGGCAGCGGCCTGGGTGTGTT
GTGGGACGCATATTCAGGCGTGACCGCGCAGACCCGGTTCCGGAATTGATGGCCTTCGGC
GGTGCTAAGCAGGAACGGCTGAACAAAGAAATTGGCGAGGTTGCGGCACGAATCTATCGC
AGCCACCTC**

Secuencia del clon GN 7

**CGCATGCGTCTTCGCTTCGTGTGGGGCAATCGGTCTTGTGCGCCGATGGCTGGCAATGCAGCA
TTGCCCCAGAAGGCGCAGGTCTGCAAATGACCTCAAATACGGCAGCGGCATGGGTGTGT**

TGTGGGACGGATATTCAGGCGTGACAGCGCAGACCTGGTTCGGAATTGATGGCCTTCGG
CGGTGCTAAGCAGGAACGGCTGAACAAAGAAATTGGCGAGGTTTCGCGCACGAATCTATCGC
AGCCACCTC

Secuencia del clon GN 8

CGCATGCGTCTTCGCTTCGTGTGGGGCAATCGGTCTTGTGCGCCGATGGCTGGCAATGCAGCA
TTGCCCCAGAAGGCGCAGGTCCGCAAATGACCTCAAATACGGCAGCGGCATGGGTGTGT
TGTGGGACGGATATTCAGGCGTGACAGCGCAGACCTGGTTCGGAATTGATGGCCTTCGG
CGGTGCTAAGCAGGAACGGCTGAACAAAGAAATTGGCGAGGTTTCGCGCACGAATCTATCGC
AGCCACCTC

Secuencia del clon GN 13

CGCATGCGTCTTCGCTTCGCTCAGGGCAGTCGGTCTTCTCGTCGTTAGCTGGCAACGCAGCTT
TGCCCCAGAAGGTGCAGGTCTGCAAATGACCTCAAATACGGCAGCGGCATGGGTGTGTT
GTGGGACGTATATTCAGGCGTGACAGCGCAGACCTGGTTCGGAATTGATGGCCTTCGGC
GGTGCTAAGCAGGAACGGCTGAACAAAGAAATTGGCGAGGTTTCGCGCACGAATCTATCGTA
GCCACCTC