



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN INTERVENCIÓN AMBIENTAL

“Bioaumentación vs bioestimulación en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Ensayos comparativos en microcosmos”



Autor: Valeria Irene Díaz

Director: María Alejandra Giavenno Filippa

Año 2022

Índice general:

Agradecimientos	2
Resumen.....	3
Summary	5
Parte A: Introducción y marco teórico.....	7
Capítulo 1: Introducción.....	8
1.1 Introducción	9
1.2 Hipótesis.....	11
1.3 Objetivo general.....	11
1.4 Objetivos específicos.....	11
Capítulo 2: Marco teórico.....	13
2.1 Un poco de historia	14
2.2.1 Algunos antecedentes.....	14
2.1.2 Primer pozo de petróleo	14
2.1.3 El petróleo en Neuquén	16
2.1.4 Situación actual	17
2.2 Contaminación del suelo con hidrocarburos	20
2.3 Marco legal.....	21
2.4 Tecnologías de remediación de suelos	22
Parte B: Descripción de los sitios de muestreo - selección y aislamiento de bacterias con capacidad hidrocarburofítica - construcción de ceparios.....	30
Capítulo 3: Descripción de los sitios de muestreo.....	31
3.1 Introducción	32
3.2 Sitios de muestreo y muestras de suelos para extracción del material biológico	33

3.3 Localización y descripción de los sitios de muestreo	33
3.3.1 Sitio Zapala	33
3.3.2 Sitio Plaza Huincul	36
Capítulo 4: Selección y aislamiento de bacterias con capacidad hidrocarburofílica - construcción de ceparios.....	39
4.1 Obtención de cultivos puros de cepas hidrocarburofílicas	40
4.2 Materiales y Métodos	40
4.2.1 Enriquecimiento y propagación de las muestras	40
4.2.2 Aislamiento de bacterias hidrocarburofílicas	41
4.2.3 Conservación de cepas hidrocarburofílicas aisladas.....	41
4.2.4 Conteo de las muestras en cámara de recuento	41
4.3 Resultados y discusión	41
4.3.1 Construcción del cepario.....	41
Parte C: Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de las cepas seleccionadas por su mejor capacidad hidrocarburofílica.....	46
Capítulo 5: Clasificación y agrupamiento de las cepas bacterianas según sus características morfológicas y fisiológicas.....	47
5.1 Agrupamiento de las cepas bacterianas hidrocarburofílicas según sus características morfológicas y fisiológicas	48
5.2 Materiales y Métodos	48
5.2.1 Coloración de Gram.....	49
5.2.2 Caracterización morfológica de las colonias	50
5.2.3 Pruebas bioquímicas para caracterización fisiológica.....	50
5.2.4 Ensayo para determinar capacidad hidrocarburofílica sobre diferentes hidrocarburos	51
5.2.5 Prueba de hidrofobicidad.....	51

5.3 Resultados y discusión	52
5.3.1 Características morfológicas del cepario y Tinción de Gram	52
5.3.2 Características metabólicas o fisiológicas del cepario (Pruebas Bioquímicas)	56
5.3.2.1 TSI.....	56
5.3.2.2 Catalasa.....	58
5.3.2.3 Oxidasa.....	59
5.3.2.4 OF (oxidación/fermentación).....	60
5.3.2.5 Hidrólisis del almidón.....	62
5.3.2.6 Cetrimide.....	64
5.3.2.7 BAM.....	65
5.3.2.7.1 Movilidad.....	65
5.3.2.7.2 Producción de SH ₂	65
5.3.2.7.3 Producción de Indol	68
5.3.2.8 MRVP (reaccion del rojo de metilo y Vogues Proskauer).....	69
5.3.2.9 Hidrólisis de gelatina.....	70
5.3.2.10 Citrato.....	71
5.3.3 Ensayo para determinar capacidad hidrocarburofílica sobre diferentes hidrocarburos.	75
5.3.4 Pruebas de hidrofobicidad	84
5.4 Conclusiones.....	87
Capítulo 6: Caracterización molecular de las cepas seleccionadas por su mejor capacidad hidrocarburofílica.....	89
6.1 Caracterización molecular de las cepas hidrocarburofílicas seleccionadas.....	90
6.1.1 Extracción y purificación de ADN	90

6.1.2 Amplificación del gen que codifica para 16S-RNA y Electroforesis en gel de agarosa	91
6.1.3 Clonación y secuenciación de los fragmentos de ADNr 16S de las cepas hidrocarburofílicas puras	91
6.2 Crecimiento en medio salino para diferenciar entre especies bacterianas.....	92
6.3 Resultados y discusión	92
6.3.1 Caracterización molecular de las cepas hidrocarburofílicas seleccionadas.....	92
6.4 Crecimiento en medio salino para diferenciación entre <i>Brevibacterium sp.</i> y <i>Microbacterium sp.</i>	97
6.5 Conclusiones.....	103
Parte D: Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos . Ensayos en microcosmos.....	106
 Captítulo 7: Ensayos preliminares y puesta a punto de las técnicas analíticas para cuantificar hidrocarburos en los microcosmos.....	 107
7.1 Ensayos preliminares.....	108
7.2 Materiales y Métodos	110
7.2.1 Ensayos preliminares para la determinación de hidrocarburos en suelos	110
7.2.1.1 Prueba de volatilidad de hidrocarburos.....	110
7.2.2. Determinación gravimétrica de hidrocarburos en suelos.....	111
7.2.2.1 Determinación del porcentaje de humedad.....	111
7.2.2.2 Determinación del porcentaje de hidrocarburos totales de petróleo (HTP).....	111
7.2.2.3 Cálculo de los límites de detección y cuantificación del método gravimétrico para la determinación del %HTP.....	112
7.3 Resultados y discusión	112
7.3.1 Prueba de volatilidad de hidrocarburos.....	112

7.3.2 Análisis de regresión para la efectividad en la recuperación de gasoil por el método gravimétrico	116
7.3.3 Cálculo de límites de cuantificación y de detección	1177
7.4 Conclusiones.....	118
Capítulo 8: Ensayos en microcosmos para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos.....	120
8.1 Introducción	121
8.2 Materiales y Métodos	121
8.2.1. Producción de biomasa	121
8.2.2 Recuento de bacterias hidrocarburolíticas presentes en el suelo mediante técnica de NMP.....	122
8.3 Ensayo en microcosmos: bioestimulación y bioaumentación	122
8.3.1. Ensayo I. Suelo Arenoso contaminado <i>ex situ</i> con aproximadamente 4% de gasoil	122
8.3.1.1 Introducción.....	122
8.3.1.2 Armado de microcosmos.....	123
8.3.1.3 Seguimiento del ensayo	125
8.3.1.4 Resultados	126
8.3.2 Ensayo II. Suelo arcilloso proveniente de un pasivo ambiental contaminado <i>in situ</i> con aproximadamente 2% de petróleo	130
8.3.2.1 Introducción.....	130
8.3.2.2 Armado de microcosmos.....	131
8.3.2.3 Seguimiento del ensayo.....	132
8.3.2.4 Resultados.....	132
8.3.3 Ensayo III: Suelo arcilloso proveniente de un pasivo ambiental contaminado <i>in situ</i> con aproximadamente 6% de petróleo.....	137

8.3.3.1	Introducción.....	137
8.3.3.2	Armado del microcosmos.....	137
8.3.3.3	Seguimiento del ensayo.....	138
8.3.3.4	Resultados.....	138
8.4	Conclusiones.....	142
8.4.1	Ensayo I. Suelo Arenoso contaminado <i>ex situ</i> con aproximadamente 4,0% de gasoil	142
8.4.2	Ensayo II con suelo contaminado <i>in situ</i> aproximadamente al 2,5%.....	143
8.4.3	Ensayo III con suelo contaminado <i>in situ</i> al 6,5%.....	143
	Parte E: Conclusiones generales y perspectivas.....	145
Capítulo 9:	Conclusiones generales.....	146
9.1	Conclusiones generales	147
Capítulo 10:	Perspectivas.....	150
10.1	Perspectivas	151
	Parte F: Anexos, bibliografía y referencias.....	152
ANEXOS.....		153
ANEXO 1: MEDIOS DE CULTIVO, ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO Y CONSERVACION DE CEPAS		154
1.1	Medio de Cultivo Bushnell-Haas (BH)	154
1.2	Medio de Cultivo Luria-Bertani (LB).	154
1.3	Enriquecimiento y propagación de las muestras	154
1.4	Aislamiento de bacterias hidrocarburolíficas	155
1.5	Conservación de cepas hidrocarburolíficas aisladas.....	156
ANEXO 2: CUANTIFICACION MICROBIANA.....		157

2.1 Recuento en Cámara Thoma	157
ANEXO 3: PRUEBAS BIOQUIMICAS.....	160
3.1 TSI.....	160
3.2 Catalasa	161
3.3 Oxidasa	161
3.4 OF (Diferenciación entre fermentación y oxidación de carbohidratos (glucosa)	162
3.5 Hidrólisis de almidón.....	163
3.6 Cetrimide.....	163
3.7 BAM.....	164
3.8 Producción de indol.....	165
3.9 MRVP (reacción de rojo de metilo y Vogues Proskauer)	166
3.9.1 Reacción del rojo de metilo.....	166
3.9.2 Reacción de Vogues –Proskauer (VP).....	167
3.10 Hidrolisis de la gelatina	167
3.11 Citrato.....	168
ANEXO 4: CARACTERIZACION DE CEPAS POR PRUEBAS BIOQUIMICAS.....	170
ANEXO 5: CARACTERIZACION MOLECULAR DE CEPAS SELECCIONADAS	171
5.1 Extracción de ADN.....	171
5.2 Purificación.....	172
5.3 Electroforesis en gel de agarosa	173
5.4 Clonación de los fragmentos de ADN.....	174
5.4.1 Protocolo para obtener un cultivo competente de células de <i>E. coli</i> DH5α	174
5.4.2 Reacción de ligación del Vector - ADN.....	176
5.4.3 Protocolo para ligar Vector y ADN	178
5.4.4 Protocolo de clonación.....	178
5.4.5 Identificación de colonias transformantes.....	179

5.5 Secuenciación de ADN.....	179
5.5.1 Determinación de la secuencia de ADN	179
5.5.2 Análisis de la secuencia	180
5.6 Crecimiento en medio salino	180
Anexo 6: Determinación de los porcentajes de humedad e hidrocarburos totales en los suelos contaminados.....	182
6.1 Determinación del porcentaje de humedad	182
6.2. Cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo mediante método gravimétrico modificado	182
Anexo 7:	185
7.1 Producción de inóculo.....	185
7.2 Obtención de biomasa por centrifugación e inoculación	186
7.3 Recuento de bacterias hidrocarburohíticas presentes en el suelo mediante técnica de NMP	186
ANEXO 8: ANALISIS CROMATOGRAFICOS DE LAS MUESTRAS DE E.E.T. S.A.	188
ANEXO 9: ANALISIS ESTADISTICOS.....	194
9.1. Analisis de varianza para volatilidad del kerosene.	194
9.2. Análisis de varianza para volatilidad del gasoil.	196
9.3. Análisis de regresión para la efectividad en la recuperación de gasoil por el método gravimétrico	198
9.4. Análisis estadístico para los resultados del ensayo I (Capítulo 8).....	199
9.5. Análisis estadístico para los resultados del ensayo II. (Capítulo 8).....	200
9.6. Análisis estadístico para los resultados del ensayo III (Capítulo 8).....	202
Bibliografía.....	204
Bibliografía referenciada	205
Bibliografía consultada.....	216

Indice de Figuras

Figura 1 a) y b) Primer pozo de extracción de petróleo en Jujuy.....	15
Figura 2 a) y b) Primeras extracciones de petróleo en Plaza Huincul.....	16
Figura 3 a) y b) Estación de trenes de Challacó.....	17
Figura 4. Principales yacimientos convencionales de la Cuenca Neuquina.....	18
Figura 5. Geolocalización del sitio de muestreo.....	34
Figura 6. Imágenes de los puntos de muestreo.....	35
Figura 7. a, b, c, d) Aspecto general de los sitios de muestreo.....	36
Figura 8. a) Fachada de la empresa E.E.T. S. A b) Biopila en funcionamiento en el predio de la empresa	37
Figura 9. a) Esquema de biopilas b) Sección transversal.....	38
Figura 10. Esquema general de obtención de cepas puras.....	40
Figura 11. a) y b) Placas de aislamiento c) y d) Repique de las cepas conservadas en glicerol	43
Figura 12. Esquema del aislamiento, selección y confección del cepario de los sitios de Plaza Huincul y Zapala.....	44
Figura 13. Coloración de Gram. a) Gram - b) Gram +.....	53
Figura 14: a) Morfología celular de la cepa Z15 b) Características de la cepa Z31.....	54
Figura 15. Resultados prueba TSI: a) Crecimiento de las cepas sobre el medio mostrando diferentes resultados b) 1- pico rojo/fondo rojo. 2- pico amarillo/fondo amarillo. 3- pico rojo/fondo amarillo	57
Figura 16. Resultados prueba TSI.....	58

Figura 17. Prueba de catalasa positiva.....	59
Figura 18. Resultados prueba de oxidasa.....	60
Figura 19. Resultados prueba de oxidasa. a) Reacción positiva b) Prueba negativa.....	60
Figura 20. Resultados prueba OF. La referencia al tubo con reacción “cerrado” significa que posee el tapón vas-par para generar un ambiente de anaerobiosis. Las letras entre paréntesis significan (A) amarillo y (G) gas.	61
Figura 21. a) Prueba de movilidad negativa en medio OF b) Prueba de movilidad en medio semisólido. Izquierda: prueba negativa, derecha: prueba positiva	62
Figura 22. Resultados prueba OF.....	62
Figura 23. a) Crecimiento de las cepas en medio con almidón 1%. b) Prueba positiva c) Prueba negativa.....	63
Figura 24. Prueba en medio cetrimide. a) Crecimiento de las cepas en el medio b) Revelado bajo luz UV	65
Figura 25. Resultados producción de SH ₂ en el medio BAM.....	66
Figura 26. Resultados de la producción de SH ₂ y fermentación de lactosa en el medio Buenos Aires Modificado.....	66
Figura 27. Resultados actividad ureasa en el medio BAM.....	67
Figura 28. Degradación de triptofano en indol y ácido pirúvico a través de la enzima triptofanasa.....	67
Figura 29. Revelado producción de indol. Tira de papel rosa: prueba positiva. Tira de papel incolora: resultado negativo.....	68
Figura 30. Resultados prueba Buenos Aires modificado. a) Fermentación de lactosa negativo, ureasa negativo b), d) y e) Fermentación de lactosa negativo, ureasa positivo c) Fermentación de lactosa positivo, ureasa negativo	68

Figura 31. a) Prueba de indol para las cepas ensayadas b) Izquierda: prueba negativa, derecha: prueba de indol +.....	69
Figura 32. Reacción rojo de metilo: a) Resultado de la prueba realizada para las cepas en estudio b) Testigos positivo y negativo de la prueba.....	70
Figura 33. a) Resultado de la prueba Vogues Proskauer para las cepas estudiadas b) Reacción positiva y negativa para la prueba	70
Figura 34. Resultados prueba de hidrolisis de la gelatina.....	71
Figura 35. Resultados utilización de citrato.....	72
Figura 36. Perfiles metabólicos del cepario analizado puestos de manifiesto por las pruebas bioquímicas realizadas.....	73
Figura 37. Estructura química de los hidrocarburos utilizados para las pruebas de capacidad hidrocarburo-líticas y de emulsificación de las cepas estudiadas.....	76
Figura 38. Reacción de reducción de la resazurina.....	79
Figura 39. Capacidad hidrocarburo-lítica. a) Resultado prueba negativa b) Resultado prueba positiva c) gama de color del indicador	79
Figura 40. Pruebas emulsificación para las cepas elegidas. a) Emulsificación para kerosene b) emulsificación para hexadecano c) Emulsificación para gasoil	86
Figura 41. Etapas del proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADN, 16S.....	92
Figura 42. Árbol filogenético de las especies de <i>Pseudomonas</i> aisladas en el presente trabajo.....	94
Figura 43. Crecimiento de las cepas H1 y H6 en medio salino. a) Con 10% de NaCl b) Con 15 % de NaCl.....	97
Figura 44. Árbol filogenético para la cepa H1 correspondiente a <i>Microbacterium sp.</i> aisladas en el presente trabajo.....	99

Figura 45. Árbol filogenético para la cepa H6 correspondiente a <i>Brevibacterium sp.</i> aisladas en el presente trabajo.....	100
Figura 46. Arbol filogenético para el orden Actinomicetales y sus subórdenes.....	101
Figura 47: Resultados prueba de volatilidad del kerosene (k) con y sin éter de petróleo (c/ETP y s/ETP).....	114
Figura 48. Resultados prueba de volatilidad del gasoil para 4% y 2.5% de hidrocarburo.....	115
Figura 49. Correlación entre el contenido inicial de contaminante y su recuperación por método gravimétrico.....	116
Figura 50. Diagrama de los sistemas para el ensayo I.....	124
Figura 51. Evolución de la biomasa del suelo (bact/ml) suelo para el ensayo I.....	127
Figura 52. Evolución %HTP para el ensayo I.....	127
Figura 53. Diagrama para el ensayo en microcosmos con suelo contaminado de campo aproximadamente al 2%.....	132
Figura 54. Evolución de la biomasa del suelo determinada por NMP bact/g suelo para el Ensayo II. Suelo arcilloso proveniente de un pasivo ambiental contaminado <i>in situ</i> con $2,2\pm 0,2\%$ de petróleo.....	134
Figura 55. Evolución %HTP para el Ensayo II. Suelo arcilloso proveniente de un pasivo ambiental contaminado <i>in situ</i> con $2,2\pm 0,2\%$ de petróleo.....	134
Figura 56. Evolución de la biomasa del suelo NMP bact/gr suelo para el ensayo III.....	139
Figura 57. Evolución %HTP para el ensayo III.....	139

Indice de tablas

Tabla I: Recuento bacteriano en cámara Thoma cultivo de enriquecimiento de las muestras del sitio Zapala.....	42
---	----

Tabla II: Caracterización de cepas aisladas de sitio contaminado en Zapala por morfología externa y coloración de Gram.....	55
Tabla III: Caracterización de cepas del Sitio Huincul por morfología externa y coloración de Gram.....	56
Tabla IV: Comportamiento de las cepas del sitio Zapala frente a diferentes hidrocarburos.....	80
Tabla V: Comportamiento de las cepas del sitio Zapala frente a diferentes hidrocarburos.....	81
Tabla VI: Capacidad degradativa de las cepas al gasoil, kerosene, antraceno, bifenilo y naftaleno.....	83
Tabla VII: Resultados identificación molecular cepas incógnita.....	93
Tabla VIII: Resultados pruebas bioquímicas realizadas a Pa41 e información recolectada en bibliografía para <i>P. putida</i>	95
Tabla IX: Resultados pruebas bioquímicas realizadas a Z8 e información recolectada en bibliografía para <i>P. aeruginosa</i>	96
Tabla X: Resultados pruebas bioquímicas realizadas e información recolectada en bibliografía para <i>Microbacterium sp</i>	102
Tabla XI: Resultados pruebas bioquímicas realizadas a H6 e información recolectada en bibliografía para <i>Brevibacterium sp</i>	102
Tabla XII: Pruebas bioquímicas para las especies seleccionadas.....	104
Tabla XIII: Resultado prueba de hidrocarburos de las cepas seleccionadas.....	104
Tabla XIV: Resultados de las pruebas de emulsificación para las cepas seleccionadas.....	105
Tabla XV: Comparación de análisis por método Gravimétrico y Cromatografía Gaseosa.....	117
Tabla XVI: Resultados extracción de hidrocarburos para cálculo de límites de detección y cuantificación.....	118

“cinco cartas, sin comodines... y el cielo es el límite”...

J. L. P.

Agradecimientos

A Alejandra, Laly y Patricia que desde el primer momento me recibieron en el laboratorio con los brazos abiertos, me dieron el espacio para poder realizar esta tesis y fueron muy pacientes durante el proceso que fue por demás accidentado. En especial a Alejandra que aceptó dirigirme.

A Gise, Sofía, Costanza, Carolina, Ayelén y Ailén por las juntadas, las risas, su empuje y energía la cual me contagiaron para seguir adelante.

A Marcela Gatti por las charlas interminables y el ánimo a seguir.

A Marcela Gatti y Andrea Lavalle por la asistencia en los análisis estadísticos sin los cuales no se podría haber completado esta tesis.

A mis amigos de la vida: Naty, Mayka y en especial a Romy, Eugenia y familia por tantos años de amistad, apoyo incondicional y su compañía en las buenas y en las malas.

A Raúl, mi pareja, mi pilar y mi refugio en cualquier situación y que siempre me dijo “vos podes”. Gracias por levantar mi ánimo, por tu fe en mí, por estar, por tu oreja paciente y por los infaltables mates detrás de la pantalla.

A mi mamá, que con su insistencia y acompañamiento, y más allá de todo, me animó a comenzar y terminar esta maestría. Gracias siempre por tu fe y tu ayuda incondicional. Sin ella, no hubiera logrado esto.

Al motor de mi vida, Fede, que me enseña todos los días que puedo superar mis propios límites y que siempre puedo ser mejor de lo que soy. Fede.... esto es para vos, tardo un poco más de lo que hubiese querido.... pero llegó.

Resumen

Toda actividad humana genera algún tipo de residuo, algunos más contaminantes que otros, tal es el caso de los derrames producidos por la actividad extractiva del petróleo crudo, de su posterior refinamiento y transporte que impacta de manera negativa en el agua o suelo y debe ser remediada de manera eficiente para beneficio del ecosistema en general.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la conveniencia de utilizar técnicas de bioaumentación frente a la bioestimulación para la biorremediación de suelos contaminados considerando diferentes variables: tipo de suelo y contaminante utilizando cepas bacterianas con capacidad hidrocarburohíticas autóctonas provenientes de sitios contaminados producto de la actividad petrolera regional.

Se seleccionaron dos sitios de muestreo en la provincia de Neuquén, aledaños a las localidades de Zapala y Plaza Huincul, a partir de los cuales se realizaron los aislamientos de cepas bacterianas con capacidad para degradar hidrocarburo, las cuales fueron posteriormente caracterizadas fisiológica y molecularmente a los efectos de seleccionar los individuos más aptos para realizar los ensayos de degradación de HTP en microcosmos a escala de laboratorio. Específicamente se realizaron 3 tipos de ensayos en microcosmos: Ensayo I: suelo Arenoso contaminado *ex situ* con 4,0% de gasoil, ensayo II: suelo arcilloso proveniente de un pasivo ambiental contaminado *in situ* con 2,0% de petróleo y ensayo III: suelo arcilloso proveniente de un pasivo ambiental contaminado *in situ* con 6,0% de petróleo. Este suelo fue usado en diferentes concentraciones según se explicita en los protocolos correspondientes. Los ensayos de bioaumentación se llevaron a cabo inoculando los microcosmos con una de las cepas autóctonas previamente aisladas y caracterizadas con comprobada actividad hidrocarburohítica o con un consorcio constituido por mezcla de las mismas cepas. Específicamente se utilizaron 4 cepas identificadas como *Microbacterium sp*, *Brevibacterium sp*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida* por separado y un consorcio formado por estas 4 especies. La concentración de los inóculos fue de aproximadamente 8×10^7 cel. /g suelo en todos los sistemas.

Los microcosmos para los ensayos de bioestimulación se prepararon utilizando los mismos tipos de suelos y concentraciones de hidrocarburos pero sin inoculación externa. Ambos sistemas fueron irrigados con agua y para mantener la humedad y fertilizados inicialmente para estimular el crecimiento bacteriano. Se monitoreó el %HTP por método gravimétrico modificado y el crecimiento de los microorganismos por la técnica del número más probable de células por gramo de suelo (NMP cel. /g suelo). La evaluación de la degradación de los HTP se continuó hasta llegar a valores de contaminación por debajo del 1%, condición establecida por la legislación vigente para suelos remediados *ex situ* para su posterior restitución al lugar de origen. Los ensayos utilizando suelo arenoso permitieron constatar la eficiencia para degradar gasoil de las cuatro cepas aisladas alcanzando valores por debajo del 1% del contaminante luego de 180 días, sin embargo no se detectó efecto sinérgico por acción metabólica conjunta de las cepas participantes del consorcio que incremente la velocidad de consumo del HC. Por otra parte en los ensayos con suelo franco arcilloso se observó que necesitaron aproximadamente 400 días para remediar los residuos contaminados hasta alcanzar valores menores al 1% de HTP para la disposición final del suelo aun partiendo de diferentes concentraciones iniciales de HTP (aproximadamente 2 y 6% de HTP inicial). En ambos suelos el comportamiento de las 4 cepas fue muy similar alcanzando valores semejantes en el %HTP y NMP (7×10^9 cel. /g suelo). El conjunto de los ensayos permitió establecer que si bien las cepas aisladas tuvieron capacidad hidrocarburofítica demostrada no fueron más eficientes que las bacterias propias ya presentes en los suelos contaminados *in situ* y por lo tanto, a pesar de haber reforzado con inoculación de bacterias activas a los sistemas con la técnica de bioaumentación, no se logró mejorar la eficiencia en la remediación de los suelos en comparación a la técnica de bioestimulación. Estos resultados se podrían atribuir a la dificultad en la implantación de los inóculos en los sistemas contaminados.

Palabras claves: biorremediación, degradación de hidrocarburos.

Summary

All human activity generates some type of waste, some more polluting than others, such is the case of spills produced by the extractive activity of crude oil, its subsequent refining and transportation that negatively impacts water or soil and must be efficiently remediated for the benefit of the ecosystem in general. The objective of this study was to evaluate the convenience of using bioaugmentation techniques versus biostimulation for the bioremediation of contaminated soils, considering different variables: type of soil and contaminant, using bacterial strains with autochthonous hydrocarbonolytic capacity from contaminated sites resulting from regional oil activity. Two sampling sites were selected in the province of Neuquén, close to the towns of Zapala and Plaza Huincul, from which the isolation of bacterial strains with the capacity to degrade hydrocarbons were made, which were subsequently characterized physiologically and molecularly at the Effects of selecting the most suitable individuals to carry out HTP degradation tests in microcosms on a laboratory scale. Specifically, 3 types of tests were carried out in microcosms: Test I: Sandy soil contaminated ex situ with 4.0% diesel, Test II: Clay soil from an environmental liability contaminated in situ with 2.0% oil, and Test III: clay soil from an environmental liability contaminated in situ with 6.0% oil. This soil was used in different concentrations as explained in the corresponding protocols. The bioaugmentation tests were carried out by inoculating the microcosms with one of the autochthonous strains previously isolated and characterized with proven hydrocarbonolytic activity or with a consortium made up of a mixture of the same strains. Specifically, 4 strains identified as *Microbacterium* sp, *Brevibacterium* sp, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* were used separately and a consortium formed by these 4 species. The concentration of the inocula was approximately 8×10^7 cells. /g soil in all systems. Microcosms for biostimulation trials were prepared using the same soil types and hydrocarbon concentrations but without external inoculation. Both systems were irrigated with water and to maintain humidity and initially fertilized to stimulate bacterial growth. The %HTP was monitored by the modified gravimetric method and the growth of the microorganisms by the technique of the most probable number of cells per gram of

soil (NMP cel. /g soil). The evaluation of the degradation of the PTH was continued until contamination values below 1% were reached, a condition established by the current legislation for ex situ remediated soils for their subsequent restitution to the place of origin. The tests using sandy soil allowed to verify the efficiency to degrade diesel of the four isolated strains, reaching values below 1% of the contaminant after 180 days, however, no synergistic effect was detected due to the joint metabolic action of the participating strains of the consortium that increased HC consumption rate. On the other hand, in the tests with clay loam soil, it was observed that they needed approximately 400 days to remediate the contaminated residues until reaching values of less than 1% of HTP for the final disposal of the soil, even starting from different initial concentrations of HTP (approximately 2 and 6 % of initial HTP). In both soils, the behavior of the 4 strains was very similar, reaching similar values in %HTP and NMP (7×10^9 cells/g soil). The set of tests made it possible to establish that although the isolated strains had demonstrated hydrocarbonolitic capacity, they were not more efficient than the own bacteria already present in the contaminated soils in situ and therefore, despite having reinforced with the inoculation of active bacteria to the systems with the bioaugmentation technique, it was not possible to improve the efficiency in soil remediation compared to the biostimulation technique. These results could be attributed to the difficulty in implanting the inocula in the contaminated systems.

Keywords: bioremediation, hydrocarbon degradation.

PARTE A: INTRODUCCION Y MARCO TEORICO

CAPITULO 1: INTRODUCCION

1.1 Introducción

Toda actividad humana genera algún tipo de residuo, algunos más contaminantes que otros, tal es el caso de los derrames producidos por la actividad extractiva del petróleo crudo, de su posterior refinamiento y transporte; este último, en particular, genera contaminación en agua o suelo en eventuales derrames accidentales. Existen numerosos antecedentes de lo antedicho: naufragio del Exxon Valdez en Alaska en 1989 (Prabowo, A. y Bae, D. 2019), contaminación por derrame en las costas de Karachi en Pakistán en el año 2003 (Kahkashan y col.; 2019), explosión de la plataforma Deepwater Horizon en el Golfo de México en el año 2010 (Beyer y col; 2016), entre otras.

Actualmente el petróleo es considerado una de las fuentes de energía más importante en el mundo, pero debido a la toxicidad de las sustancias que lo componen su contacto con los ecosistemas acuáticos o terrestres produce un gran perjuicio en ellos, lo que lleva al desarrollo de diferentes técnicas de remediación como medidas mitigatorias de la contaminación para recuperar, en la medida que sea posible, la calidad ambiental del recurso afectado (Quintella y col; 2019).

Existen reportes de cepas bacterianas con capacidad hidrocarburofítica: *Pseudomonas sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Ralstonia sp.*, *Alteromonas sp.*, *Arthrobacter sp.*, entre otros (García Gonzalez y col; 2019). Estos microorganismos son ecológicamente aceptables y con capacidad metabólica para degradar hidrocarburos. Es por ello que las investigaciones científicas se centran cada vez más en el uso de estos microorganismos, la caracterización de los mismos y los mecanismos que llevan a cabo para realizar la degradación del contaminante.

Por todo lo antedicho, surge la inquietud por la cual se plantea el siguiente trabajo de tesis cuya estructura se detalla en los siguientes párrafos.

En la parte A del trabajo se presentan los capítulos 1 y 2 donde se realiza una breve introducción teórica del mismo, los fundamentos teóricos en los que se basa el trabajo y los objetivos generales y específicos planteados.

En la parte B se desarrollan los capítulos 3 y 4 donde se describen detalladamente la condición inicial de los sitios de muestreo indicando la cantidad de muestras extraídas de cada sitio así como también las técnicas de aislamiento de cepas hidrocarburofíticas para la obtención de cultivos puros y posteriormente describir las consideraciones para la construcción y conservación de ceparios.

La parte C del trabajo, en sus capítulos 5 y 6, se recurre a técnicas de microbiología clásica (coloración de Gram, observación morfológica de colonias y cultivos líquidos, pruebas bioquímicas etc.) y de biología molecular (extracción, amplificación, clonación y secuenciación del ADN, etc.) para caracterizar fisiológica y molecularmente a las bacterias que constituyen los ceparios obtenidos en los capítulos anteriores para luego seleccionar a partir de los resultados obtenidos aquellos cultivos que presenten las capacidades metabólicas más convenientes para la degradación de hidrocarburos y utilizarlos en los ensayos de remediación de suelos.

La parte D corresponde a los ensayos de biodegradación de contaminantes provenientes de la industria del petróleo, específicamente se desarrollan los capítulos 7 y 8. En el primero se presenta una serie de ensayos preliminares para la selección del método de extracción y del contaminante a utilizar así como también la puesta a punto de las técnicas de extracción y cuantificación de los hidrocarburos en los microcosmos tanto en microcosmos con suelo contaminado en el laboratorio como con suelo contaminado a campo y en el capítulo 8, se muestran el armado de los microcosmos de bioestimulación y bioestimulación/bioaumentación en suelo contaminado en laboratorio y suelo contaminado de campo, la producción y cuantificación del inóculo y el seguimiento de los microcosmos respecto del remanente de hidrocarburos en el sistema y la cuantificación de las bacterias por la técnica del número más probable de bacterias por gramo de suelo.

En la parte E se destacan las conclusiones generales y las perspectivas que surgen del desarrollo del presente trabajo mientras que la parte F agrupa la bibliografía referenciada y consultada como así también los anexos que fueron necesarios para detallar muchos de los materiales, métodos y técnicas analíticas que

acompañaron al desarrollo experimental llevado a cabo para cumplimentar el plan de trabajo propuesto.

La importancia de la realización de este trabajo reside en el estudio de bacterias para aprovechar la capacidad natural de estas en la degradación de un contaminante recalcitrante como es el petróleo y sus derivados al entrar en contacto con recursos naturales como el suelo o el agua. El conocimiento de estas bacterias permite diseñar una mejor estrategia de remediación de los recursos contaminados.

1.2 Hipotesis

- ✚ La bioaumentación de suelos contaminados con hidrocarburos, utilizando bacterias cultivadas en laboratorio inoculadas de forma individual o en consorcio, es más eficiente que aplicar técnicas de bioestimulación de la flora microbiana autóctona de estos suelos. La biodegradación del hidrocarburo presente se logra en menor tiempo (menos de un año) y el hidrocarburo remanente luego del proceso se encuentra en porcentajes menores al 1%.

1.3 Objetivo general

- ✚ Evaluar y comparar la bioaumentación con bacterias inoculadas en suelos contaminados con hidrocarburos con la bioestimulación de las bacterias autóctonas de los suelos contaminados.

1.4 Objetivos específicos

- ✚ Obtener consorcios bacterianos o cepas aisladas con capacidad hidrocarburofítica a partir de diferentes ambientes contaminados con hidrocarburos
- ✚ Caracterizar el comportamiento de aquellos microorganismos para diseñar un consorcio bacteriano optimizado para la degradación de hidrocarburos en suelos.

- ✚ Evaluar la degradación de hidrocarburos mediante la técnica de bioaumentación en microcosmos con suelo contaminado utilizando los microorganismos previamente aislados
- ✚ Comparar la eficiencia en la remoción de hidrocarburo en los microcosmos inoculados con las cepas aisladas respecto de la degradación alcanzada con la técnica de bioestimulación en microcosmos preparados para tal fin.

CAPITULO 2: MARCO TEORICO

2.1 Un poco de historia.....

2.2.1 Algunos antecedentes

A lo largo de la segunda mitad del siglo XIX, Argentina trazó las líneas principales de su organización política y económica. La economía principalmente se desarrollaba en torno a una explotación agrícola ganadera. Los hidrocarburos no estaban en el centro de atención de los gobiernos nacionales o provinciales en ese entonces; más aún, existía un considerable desconocimiento respecto de ellos. Es por eso que las referencias más antiguas a la existencia de betún, brea o alquitrán en territorio rioplatense, de mediados del siglo XIX, corresponden a relatos de viajeros y misioneros que recorrieron lo que por entonces eran las provincias confederadas poco antes de la unificación política. Aunque hay algunas menciones de fines del siglo XVIII y primeros años del siguiente, es particularmente a partir de 1857 que estos relatos se multiplican y hacen referencia a la presencia de manantiales petrolíferos y asfaltos en la región Alto Aguaragüeña en Salta, Jujuy, en la zona de Cacheuta en Mendoza; y en lo que desde 1884 sería el Territorio Nacional de Neuquén.

En el año 1865 un grupo en Jujuy constituyó la Compañía Jujeña del Kerosene S.A., con el propósito de explotar y elaborar el betún mineral existente en los depósitos naturales de la provincia (Figura 1). Esta vez sí, el Congreso Nacional aprobó a la empresa la concesión del privilegio exclusivo para explotar y elaborar el betún de la provincia de Jujuy, por el término de quince años. Esta podría ser considerada la primera empresa petrolera argentina. (Blanco G y col. 2018)

2.1.2 Primer pozo de petróleo

El 13 de diciembre de 1907, una cuadrilla de empleados del Ministerio de Agricultura de la Nación que perforaba un pozo en Comodoro Rivadavia descubrió la existencia de hidrocarburos a 539 metros de profundidad. Pero aquella no era la primera vez que el petróleo fluía a la superficie.

Desde finales del siglo XIX, varios emprendedores habían intentado desarrollar una explotación petrolera para destilar kerosene y atender el creciente mercado de iluminación en Buenos Aires y otras grandes ciudades. Los primeros petroleros

argentinos se dirigieron a aquellas regiones en las que había alguna referencia de la existencia de hidrocarburos. En sus relatos sobre expediciones y viajes por la Argentina, comerciantes, militares y geólogos habían dejado constancia sobre afloraciones de hidrocarburos en zonas de Mendoza, Salta, Jujuy y Neuquén. En aquellos años, no había una legislación específica para las actividades petroleras, que se regían por el Código de Minería de 1886. El Código indicaba de manera muy clara que la explotación del petróleo le correspondía a empresas privadas del sector pero no al estado.

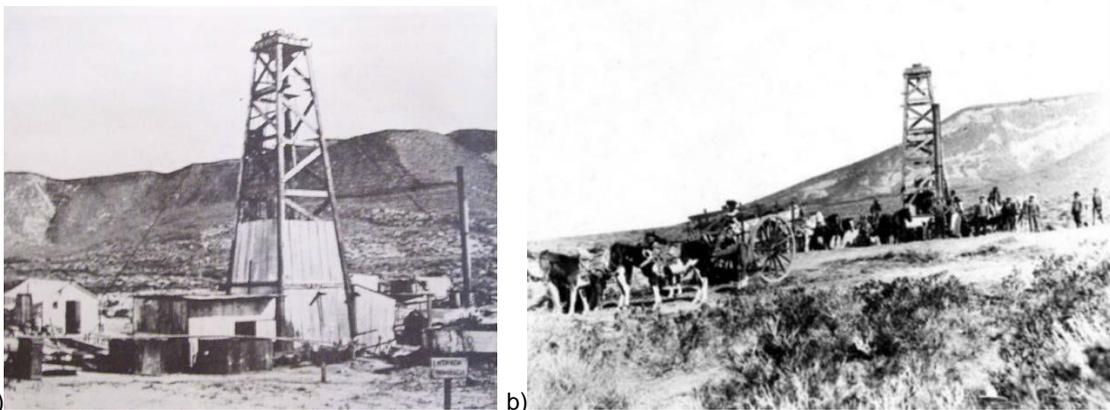


Figura 1: a) y b): Primer pozo de extracción de petróleo en Jujuy (Vergani, G y col. 2018).

Más adelante, a principios del siglo XX, el estado Argentino comenzó a perforar regularmente el subsuelo. Los trabajos de perforación se distribuían por todo el país. En el sur, en la costa patagónica, Comodoro Rivadavia era en esos años una pequeña población que funcionaba como precario puerto de salida de los productos de la zona.

En 1907 hacia fines del año y luego de varios intentos de perforación en el territorio, se confirmó la existencia de hidrocarburos, por lo que se comunicó oficialmente el descubrimiento de un yacimiento de petróleo en Comodoro Rivadavia.

La magnitud del descubrimiento y su ubicación respecto al mar, dado la ausencia de ferrocarriles, significaban una ventaja significativa en cuanto a los costos de transporte convirtiendo a Comodoro Rivadavia en el punto de partida para la explotación petrolera en el país.

Pero las carencias de infraestructura provocaron que el grueso del petróleo producido nunca fuera consumido. Más de un tercio de la producción se perdía por filtración o evaporación. Desde Buenos Aires, la explotación de Comodoro era vista como un proyecto experimental, casi como una excentricidad. Pocos eran conscientes de que estaban construyendo lo que luego sería la primera empresa petrolera estatal del mundo. (Blanco G. y col. 2018)

2.1.3 El petróleo en Neuquén

El descubrimiento de petróleo en Comodoro Rivadavia reactivó trabajos exploratorios en la cuenca neuquina, registrándose en 1907 varias compañías, con nulos resultados.

Luego, en 1913, los geólogos recomendaron, por los antecedentes y los estudios preexistentes, que el área más propicia para explorar en busca de petróleo era la zona de Plaza Huincul donde se observaba la presencia de manaderos de petróleo, la existencia de estructuras anticlinales para producir entrampamientos, una escasa profundidad del mineral y la existencia del ferrocarril como medio para unir la zona potencialmente productora con la consumidora.

Esta línea de acción en Comodoro Rivadavia y en Plaza Huincul (Figura 2), extendiéndose luego, en el caso neuquino, a Cutral Co y en menor medida a Rincón de los Sauces.

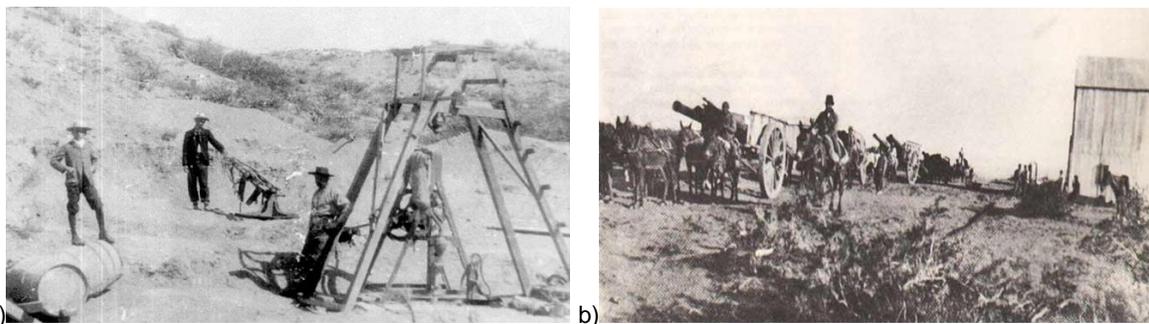


Figura 2: a) y b): Primeras extracciones de petróleo en Plaza Huincul (Vergani, G. y col. 2018).

En 1914, un informe geológico sobre el yacimiento petrolífero de Challacó sostenía que había en profundidad, tanto yacimientos secundarios como primarios, siendo las condiciones geológicas generales muy favorables. La región de Challacó se prestaba bien para explorarla racionalmente con perforaciones.

Para comprobar estas deducciones se propone ejecutar los trabajos pertinentes a una perforación y exploración del mismo aunque finalmente no se llevó a cabo dicho procedimiento.

Cuando la declinación de la producción de los pozos de Plaza Huincul se produjo en diciembre de 1941, el hallazgo de Petróleo en Challacó. Ello reactivó las operaciones y fortaleció la presencia de las empresas del estado y todo lo que se controlaba en las poblaciones de Plaza Huincul y Cutral Có, surgidas al calor de ese recurso. El paraje tuvo a partir de entonces una parada del ferrocarril, que permitiría la evacuación de la producción de los yacimientos Challacó, El Sauce, Cerro Bandera y Aguada Baguales (Figura 3).

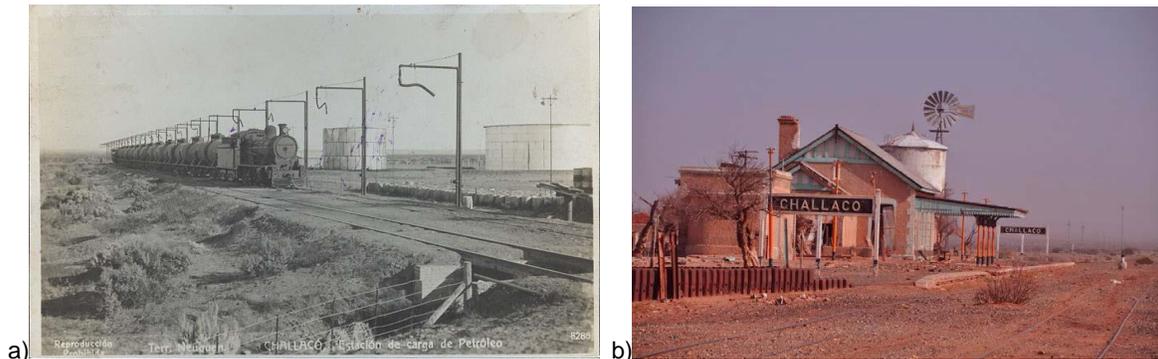


Figura 3: a) y b) Estacion de trenes de Challacó (Vergani, G. y col. 2018).

Más adelante se descubrieron los yacimientos de Entre Lomas, El Caracol, Medianera, El Medanita, Piedras Blancas, Señal Picada y Charco Bayo; y sobre fines de la década con la prolongación del yacimiento Medanita hacia el sudeste, dentro de la Provincia de La Pampa, motivando el descubrimiento del yacimiento 25 de Mayo, en 1968.

Más adelante y luego de una extensa exploración del territorio, se desarrollaron las zonas de Loma de la Lata, Rincón de los Sauces y Puesto Hernández.

2.1.4 Situación actual

Las innovaciones tecnológicas que hicieron de los hidrocarburos no convencionales recursos económicos potencialmente explotables a comienzos del siglo XXI, revolucionaron a un mundo que veía declinar la producción y las

reservas al tiempo que aumentar exponencialmente la demanda de petróleo y gas. La cuenca neuquina se transformó, a partir del conocimiento del altísimo potencial de reservas de recursos no convencionales en la misma, en el epicentro del interés provincial, nacional e internacional por desarrollar las áreas mayoritariamente comprendidas en la formación Vaca Muerta (Figura 4). Por otra parte, en la década fueron también descubiertos, en relación a avances tecnológicos en la perforación, estimulación y recuperación mejorada, los yacimientos de El Trapial en 1991, Sierra Chata en 1993, Chihuido de la Salina en 1995 y Anticlinal Campamento de 1998, entre los más significativos. Rincón de los Sauces crecía a un ritmo significativo.

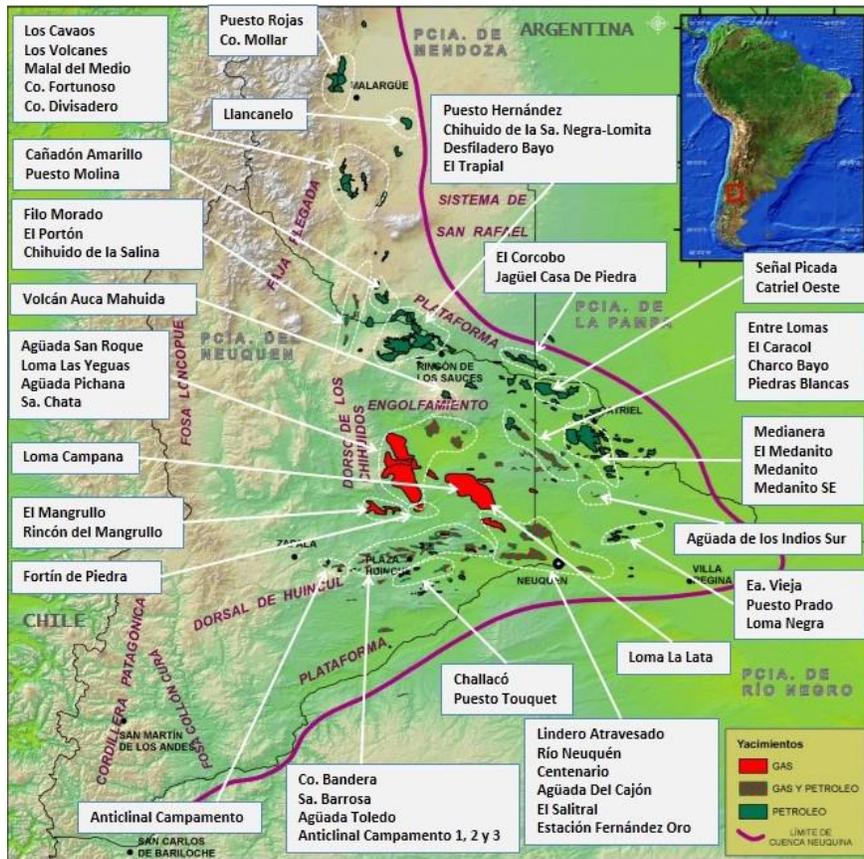


Figura 4: Principales yacimientos convencionales de la Cuenca Neuquina (Vergani, G. y col. 2018).

Con estudios superficiales de las rocas madres desde 2007 y el primer pozo no convencional en 2010, se identificó la zona denominada Loma Campana como una de las de mayor potencial a nivel nacional. Cabe destacar, sin embargo, que

el conocimiento acerca de la existencia de este recurso data de las décadas de 1960 y 1970, cuando se descubrieron los yacimientos de Puesto Hernández y Loma La Lata y perforó las formaciones de Vaca Muerta y Los Molles. En ese entonces ni los precios ni la tecnología permitían su extracción.

Argentina es un país con tradición petrolera que lleva explotando sus reservas de hidrocarburos convencionales desde hace más de cien años. Sin embargo, en las últimas dos décadas ha sufrido un descenso no sólo de producción, sino también de sus reservas explotables. La tasa natural de declinación de los yacimientos en explotación y el incremento de la demanda energética, entre otras variables, han terminado por convertir a Argentina en un importador neto.

En este contexto, el desarrollo de la formación Vaca Muerta en la región petrolera de Neuquén en particular, ha centrado en esta región las expectativas de recuperar la independencia energética en el mediano plazo.

Para julio de 2013, ya se habían perforado 64 pozos, cincuenta de ellos estimulados. El área elegida cuenta con una superficie de 395 km², o el 1,4% de la medialuna petrolera de Vaca Muerta. Se ubica al norte de la localidad de Añelo y los embalses Mari Menuco y Los Barreales.

En La Amarga Chica, otra de las locaciones de Vaca Muerta, se desarrolla un proyecto que contempla la explotación de un área de 187 km² para extraer petróleo. Otra exploración se trata de operar en una superficie de 45 km² en el área de El Orejano para la extracción de gas. Junto a Pampa Energía se comenzó a trabajar en el desarrollo de un área de 183 km² en Rincón de Mangrullo, que no pertenece a Vaca Muerta sino a la formación Mulichinco, también no convencional. (Blanco G. y col. 2018).

Actualmente, luego de un 2020 con rendimientos discretos por la fuerte caída en la demanda energética, el año 2021 marcó un punto de inflexión para Vaca Muerta. Durante ese año la actividad volvió a crecer en la formación, logrando una recuperación de la producción.

En 2021 se afianzaron las exportaciones de petróleo desde Vaca Muerta al tiempo que se delinearon nuevas relaciones comerciales en el sector energético con países de la región como Chile. Si bien quedó la pendiente la resolución de temas

centrales a la explotación de la formación, como la nueva ley petrolera y la licitación del gasoducto troncal hacia Buenos Aires y Santa Fé, sobre el final del año se obtuvieron importantes logros en materia productiva. En octubre la producción diaria en Vaca Muerta fue de 190.000 barriles de petróleo y 42 Mm³ de gas, según datos de *Regional Investment Consulting (RICSA)* (<https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo>).

Gracias a la actividad en Vaca Muerta, la producción de petróleo también creció en el mes de octubre a nivel nacional, logrando 542.000 barriles diarios, una marca que no se alcanzaba desde octubre del 2015 según la Secretaría de Energía de la Nación (<https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo>).

2.2 Contaminación del suelo con hidrocarburos

La contaminación de los suelos con hidrocarburos en las áreas de extracción en nuestro país se deben principalmente a derrames de tipo locales, de instalaciones fijas como destilerías de petróleo, tanques subterráneos de estaciones de servicio, etc., o producidos por siniestros en rutas con derrame de derivados del petróleo (Coria, 2007).

Estos contaminantes en el suelo, no solo provocan efectos nocivos en plantas animales y el hombre, sino que provocan alteraciones en las microbiota y el ecosistema del suelo disminuyendo la variabilidad y la cantidad de especies presentes en el seno del mismo.

A simple vista estas alteraciones pueden observarse en la vegetación induciendo su degradación, la reducción del número de especies presentes en ese suelo, mientras que en el hombre, los efectos se restringen a la ingestión, inhalación y al contacto dérmico.

En general, los efectos sobre un suelo contaminado son:

- ✚ Degradación paisajística: la presencia de vertidos y acumulación de residuos en lugares no acondicionados, generan una pérdida de calidad del paisaje, a la que se añadiría en los casos más graves el deterioro de la vegetación y la desaparición de la fauna.

- ✚ Pérdida de valor del suelo: económicamente, y sin considerar los costos de recuperación de un suelo, la presencia de contaminantes en un área supone la desvalorización de la misma, derivada de las restricciones de usos que se impongan a este suelo (www.ingenieroambiental.com, 2005).

En la cuenca neuquina, las tareas de explotación, extracción, transporte y transformación de los hidrocarburos, no sólo cobran importancia por la dependencia económica de la región respecto de estas actividades, sino también por el cambio drástico en la naturaleza y deterioro de ecosistemas generadores de otras actividades productivas capaces también de generar empleos e ingresos. Es así que surgen normativas en las que se exigen prácticas de minimización de la degradación y la dilapidación de los ecosistemas, con un fuerte compromiso del Estado y las empresas en la protección ambiental que garantice la calidad de vida de la población. (Rodríguez López D. y Burucua A., 2015).

2.3 Marco legal

Los residuos de petróleo y cualquiera de sus derivados que son derramados se encuentran en el marco de la ley nacional de residuos peligrosos 24.051 Anexo 1 donde se detalla la generación y las normas de manipulación, transporte y tratamiento de los mismos. Las mismas consideraciones son contempladas en la provincia del Neuquén donde actualmente existe una normativa que regula la actividad petrolera con el fin de mantener un control del impacto ambiental generado por la actividad industrial. La mencionada normativa es la ley 1875, aplicable a todas las actividades industriales, fija los principios rectores para la preservación, conservación, defensa y mejoramiento del ambiente en todo el territorio de la Provincia del Neuquén para mantener una óptima calidad de vida de sus habitantes.

En particular, en lo referido a la actividad hidrocarburífera, se encuentra en vigencia la Ley 2600 que pretende extremar las medidas de resguardo y protección ambiental aplicables a todas las actividades de reconocimiento, perforación, explotación, almacenamiento y/o transporte de hidrocarburos líquidos

o gaseosos otorgando un Certificado de Aptitud Ambiental de la actividad hidrocarburífera por parte de la Subsecretaria de Medio Ambiente (SMA).

En cuanto a los límites máximos permitidos para la disposición final de hidrocarburos, podemos comparar las normativas vigentes en la provincia con las correspondientes a México y Bolivia. En México, estos valores se rigen por medio de la NOM-138 que establece como límite máximo permisible de hidrocarburos en el suelo un valor de 0,6% (6000 mg/kg), mientras que Bolivia se rige por el Decreto Supremo N° 26171 estableciendo un valor máximo de 0,5% (5000 mg/kg). En comparación, la Provincia de Neuquén, por medio de la Disposición SMA N° 759/09 de la Subsecretaria de Estado y Desarrollo Sustentable, establece el máximo valor en 1% (10.000 mg/kg).

2.4 Tecnologías de remediación de suelos

Las técnicas de remediación de suelo han sido desarrolladas con el fin de remediar, dentro de lo posible, aquellos suelos que por alguna razón han sido afectados por los contaminantes. Si bien es sabido que estas técnicas no logran revertir del todo los efectos de la contaminación, estas solo pueden disminuir la carga de contaminante de manera que la disposición final de esos suelos sea lo menos nocivo posible para el ambiente. Estas técnicas de remediación destruyen contaminantes o los modifican a fin de que dejen de ser peligrosos, además pueden reducir la cantidad de material contaminado presente en un lugar, retirar el componente de los desechos que los hace peligrosos o inmovilizar el contaminante en los desechos. (Volke Sepúlveda, T. y Velasco Trejo, J.A. 2002)

Las actuales tecnologías de remediación de suelos contaminados se clasifican de acuerdo a tres premisas principales como son: la estrategia de remediación, el sitio donde se llevara cabo la metodología y el tipo de tratamiento.

Estrategia de remediación: Son tres estrategias básicas que se pueden usar tanto separadas como en conjunto, para remediar los sitios contaminados y se mencionan a continuación:

- ✚ Destrucción o modificación de los contaminantes: En este tipo de estrategia se busca alterar la estructura química del contaminante de manera de volverlo más inocuo para el ambiente.
- ✚ Extracción o separación: Los contaminantes se extraen y/o separan del medio contaminado, haciendo uso de sus propiedades físicas o químicas como la volatilización, la solubilidad y/o la carga eléctrica.
- ✚ Aislamiento o inmovilización del contaminante: Los contaminantes son estabilizados, solidificados o contenidos con el uso de métodos físicos o químicos.

Sitio donde se llevara cabo la metodología: En general, se distinguen dos tipos de tecnología:

- ✚ *In situ*: Son las tecnologías que se llevan a cabo en el sitio de la contaminación sin necesidad de excavar el mismo.
- ✚ *Ex situ*. La realización de este tipo de tecnologías, requiere de excavación, dragado o cualquier otro proceso para remover el suelo contaminado antes de su tratamiento en un sistema controlado.

Tipo de tratamiento: Esta clasificación se basa en el principio de la tecnología de remediación y se divide en tres tipos de tratamiento:

- ✚ Tratamientos biológicos (biorremediación). Utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos (Cambarieri, L. y col. 2021).
- ✚ Tratamientos fisicoquímicos. Este tipo de tratamientos, utiliza las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación.
- ✚ Tratamientos térmicos. Utilizan calor para incrementar la volatilización (separación), quemar, descomponer o fundir (inmovilización) los contaminantes en un suelo.

A continuación se hará hincapié en las técnicas de biorremediación, objeto del siguiente trabajo.

Técnicas de biorremediación:

Son tratamientos biológicos que utilizan microorganismos capaces de degradar hidrocarburos presentes en el suelo contaminado. Estas tecnologías han sido y son muy estudiadas, gracias a las ventajas que estas ofrecen tanto económicas como ambientales por su bajo impacto. En la aplicación de estas técnicas se estimula el crecimiento de los microorganismos del suelo encargados de la remediación de distintas formas. Las diferencias que puede haber entre técnicas básicas varían en la disposición del suelo a tratar y la técnica que se utiliza para la aireación. Pueden ser *in situ* o *ex situ* dependiendo donde se realiza el tratamiento del suelo.

Una técnica que puede aplicarse es el Landfarming. En esta técnica *ex situ* de remediación de suelos, el suelo contaminado es retirado del sitio y es llevado a otro donde se dispone de forma superficial y por medio de arados se incorpora aire para que quede disponible para los microorganismos degradadores. El terreno donde se dispone el suelo contaminado debe poseer buenas características de laboreo agrícola: ausencia de piedras, fácilmente removible, pH cercano a la neutralidad, facilidad de aireación y poseer un contenido adecuado de nitrógeno y fósforo. El terreno debe poseer en profundidad, un revestimiento de arcillas de manera de evitar la migración de los contaminantes a las napas de agua subterráneas. (Volke Sepúlveda, T. y Velasco Trejo, J.A. 2002)

Otra técnica muy utilizada son las biopilas, técnica que se desarrollará más extensamente ya que es objeto del siguiente trabajo. La biopila es una técnica *ex situ* que consiste en formar pilas con el suelo contaminado y estimular la actividad microbiana, aireando el sistema y/o adicionando nutrientes y humedad. La actividad microbiana aumenta de forma inversamente proporcional a la disminución de las concentraciones del contaminante. Una vez formadas o construidas las pilas, se les puede colocar una cubierta de plástico para evitar la volatilización de HTP y pérdida de calor en el proceso. El tiempo necesario para la remediación puede ser alto (meses a años) y el bajo costo.

Las biopilas deben tener una serie de características para su correcto funcionamiento:

🌱 Población microbiana:

Normalmente, el suelo contiene un gran número de diversos microorganismos entre los que se encuentran bacterias, algas, hongos, protozoos y actinomicetos. Éstos en su mayoría suelen ser organismos aerobios y las bacterias son el grupo más numeroso y más activo bioquímicamente, especialmente en un ambiente con bajo nivel de oxígeno.

El proceso metabólico que usan las bacterias para producir energía requiere un aceptor de electrones para oxidar la fuente de carbono a dióxido de carbono. Los microorganismos son clasificados según la fuente de carbono y el aceptor de electrones que utilizan para llevar a cabo sus procesos metabólicos. A las bacterias cuya fuente de carbono son los compuestos orgánicos, se las denomina heterótrofas, mientras que las que utilizan compuestos inorgánicos son autótrofas. Las bacterias que utilizan al oxígeno como aceptor de electrones, son las llamadas aeróbicas, en cambio las que tienen otro aceptor de electrones, como pueden ser nitratos o sulfatos, son anaeróbicas.

Están también las que pueden utilizar ambos tipos de aceptores de electrones, a estas se las denomina facultativas. Para el proceso de degradación de hidrocarburos, se necesita la presencia de bacterias que sean heterótrofas y aeróbicas (o facultativas).

Para evaluar la presencia de bacterias en el suelo, se debe realizar un análisis en laboratorio de una muestra del mismo. Este análisis debe incluir la determinación del total de bacterias heterótrofas mediante un recuento en placa o por la determinación del número más probable en medio líquido. En el primer caso, este valor se informa como unidades formadoras de colonia por gramo de suelo seco (UFC/gr. suelo seco). La densidad de población bacteriana en un suelo se encuentra típicamente en el rango que va de 10^6 a 10^9 UFC/gr. suelo seco. Para que una biopila sea efectiva se precisará que el suelo cuente con un mínimo de 10^5 UFC/gr. suelo. Valores menores a éste pueden estar hablando de concentraciones tóxicas de compuestos orgánicos o inorgánicos (por ej. metales). Si esa es la situación, se debe acondicionar el suelo a tratar para reducir esas

concentraciones hasta niveles que permitan el desarrollo microbiano (USEPA, 1994).

La tecnología de biopilas y landfarming se llevan a cabo fuera del sitio afectado, utilizan el oxígeno contenido en el aire y estimulan el crecimiento de bacterias aerobias, las cuales degradan los constituyentes del petróleo adsorbido por el suelo. Una diferencia importante en el landfarming reside en la forma de aireación del suelo. Mientras en landfarming la aireación se realiza mediante el arado del suelo, en biopilas, se puede airear mediante tuberías ranuradas conectadas a un inyector o extractor de aire, o sin este dispositivo, permitiendo la entrada y salida de aire naturalmente. Otra diferencia importante es que en el landfarming hay una mayor superficie de contacto del contaminante con el ambiente, entonces la actividad microbiana se verá afectada directamente por la temperatura predominante del ambiente, en cambio en biopilas se puede obtener, mediante el calor generado por el propio metabolismo de las bacterias, una temperatura óptima en el interior de la pila. Esto permitiría que, incluso en ambientes fríos, se pueda mantener una buena actividad microbiana.

Factores que condicionan el normal funcionamiento de una pila:

Características del suelo:

- ✚ pH: entre 6 y 8 con un óptimo de 7. Se deben realizar medidas de corrección de estos valores en caso de presentarse valores por encima o debajo del mencionado rango.
- ✚ Contenido de humedad: Los microorganismos necesitan agua para su desarrollo, por ello el suelo debe estar húmedo pero no en exceso. El óptimo se encuentra entre 40% y 85% de la capacidad de campo, o lo que sería equivalente, del 12% al 30% en peso (USEPA, 1994). Para contrarrestar los efectos de la evaporación, la pila debe ser humectada periódicamente. En el caso de que la biopila este situada en zonas con altas precipitaciones anuales, se debe proteger con algún tipo de cobertura impermeable.
- ✚ Temperatura: el crecimiento bacteriano, también está ligado a la temperatura de manera que existe para cada especie un óptimo de

temperatura donde el crecimiento es más rápido y las funciones celulares son óptimas también. Los microorganismos degradadores de hidrocarburos pertenecen al grupo de microorganismos mesófilos y su óptimo de crecimiento se encuentra en el rango de 20 a 37 °C, muestran una disminución en su actividad cuando la temperatura sobrepasa los 45 °C o si es inferior a 10 °C y cesa por encima de los 50°C o por debajo de los 5°C. (USEPA, 1994). Para el óptimo funcionamiento de la biopila, se debe garantizar las temperaturas adecuadas al crecimiento teniendo en cuenta el clima donde se encuentra y sus amplitudes térmicas estacionales y diarias.

✚ Concentración de nutrientes: Los microorganismos requieren nutrientes inorgánicos para su crecimiento celular y para llevar adelante el proceso degradativo. Los nutrientes pueden estar en cantidades suficientes en el suelo, pero es más frecuente que estos deban ser agregados a la biopila. Estos nutrientes deben ser incorporados en cantidades suficientes sin estar en exceso de manera de que no se vea inhibido el crecimiento o que se produzca la muerte de los mismos por toxicidad. La relación óptima carbono:nitrógeno:fósforo es de aproximadamente 100:10:1 a 100:10:0,5, dependiendo del contaminante y de los microorganismos involucrados en el proceso de biodegradación (USEPA, 1994). Una aproximación conservativa de la cantidad de nitrógeno y fósforo requerida para la óptima degradación puede ser calculada asumiendo que la masa total de hidrocarburos en el suelo representa la masa de carbono disponible para la biodegradación.

✚ Textura: La textura de un suelo se define por los porcentajes de limo, arcilla y arena que contiene un suelo. La textura afecta directamente la permeabilidad, la humedad y la densidad del suelo. Aquellos suelos que tienen un alto porcentaje de arcillas, suelen aglutinarse, acumular agua y nutrientes en su matriz y de esa manera no permiten una buena disponibilidad de ellos para los microorganismos. También se ve afectada la disponibilidad de oxígeno. En el caso de que el suelo contenga un muy alto porcentaje de arena, el efecto por lavado será más alto debido a la no retención de agua por parte del suelo.

Características del contaminante:

- ✚ Volatilidad: los componentes volátiles del contaminante, tienden a evaporarse de la biopila en lugar de ser biodegradados. Para que estos vapores no migren a la atmosfera, se deben tomar precauciones para evitarlo, sobre todo si la pila cuenta con algún sistema de aireación.
- ✚ Estructura química: este factor toma importancia ya que dependiendo de la estructura química del contaminante, será el tiempo o la capacidad del microorganismo de llevar a cabo el proceso de degradación. En términos generales, a mayor complejidad de la molécula, mayor será la dificultad y el tiempo en la degradación. Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (nueve átomos de carbono o menos) y monoaromáticos son más fáciles de degradar que aquellos alifáticos de alto peso molecular y poliaromáticos.
- ✚ Concentración y toxicidad: Altas concentraciones de hidrocarburos o de metales pesados en el suelo contaminado puede ser tóxica o inhibitoria del crecimiento y reproducción de los microorganismos responsables de la degradación. Contrariamente, concentraciones muy bajas de materia orgánica resultan en una disminución de la actividad microbiana. Concentraciones de metales pesados mayores a 2500 ppm o concentraciones de HTP (hidrocarburos totales del petróleo) mayores a 50000 ppm, son consideradas inhibitorias y/o tóxicas para la mayoría de los microorganismos. El rango óptimo de concentración de HTP es de 10000 ppm a 50000 ppm (USEPA, 1994). En el caso de que las concentraciones sean mayores a las permitidas por la legislación vigente para este tipo de tratamiento, se deberá proceder a disminuir su concentración por alguna técnica pertinente.

Condiciones climáticas.

- ✚ Temperatura ambiente: La temperatura ambiente es importante porque determina la temperatura del suelo la cual influirá directamente en el desarrollo.
- ✚ Lluvia: La lluvia influye directamente en la humedad de la biopila. En zonas más húmedas se suele cubrir la biopila con algún film para evitar el

anegamiento de la misma y tener control sobre la humedad que contiene. En zonas más secas, este control no es necesario ya que la evaporación mayor, por lo que la humedad suele ser incorporada a través de algún sistema de riego.

- ✚ Viento: El viento puede causar la erosión de la biopila. La humectación o la cobertura de la biopila, ayudan a evitar este fenómeno sobre la misma.

PARTE B: DESCRIPCIÓN DE LOS
SITIOS DE MUESTREO - SELECCIÓN Y
AISLAMIENTO DE BACTERIAS CON
CAPACIDAD HIDROCARBUROLITICA -
CONSTRUCCION DE CEPARIOS

CAPÍTULO 3: DESCRIPCIÓN DE LOS SITIOS DE MUESTREO

3.1 Introducción

Es ampliamente conocido en el área de microbiología y ecología, el papel importante que cumplen algunas bacterias con capacidades para degradar ciertos contaminantes de origen antrópico; es el caso de la degradación de agroquímicos en el suelo (Moreno-Ávalos, L. y Suyon-Solorzano, N. 2020), la degradación de contaminantes como el cianuro provenientes de la industrias de tratamientos térmicos (Carreño Parrado Y., 2018) o la biodegradación de hidrocarburos alifáticos saturados (Ordoñez Burbano D. y col. 2017).

La actividad extractiva del petróleo crudo es el principal contaminante en los pozos de extracción y los combustibles como naftas y gasoil generan inconvenientes en sitios de derrames por mal manejo o inadecuado almacenamiento. Existen numerosos antecedentes que dan reporte de esas catástrofes ambientales: naufragio del Exxon Valdez en Alaska en 1989 (Prabowo, A. y Bae, D. 2019), contaminación por derrame en las costas de Karachi en Pakistán en el año 2003 (Kahkashan y col.; 2019), explosión de la plataforma Deepwater Horizon en el Golfo de México en el año 2010 (Beyer y col; 2016) entre otras.

En todos los ambientes contaminados existen en mayor o menor medida, microorganismos adaptados que soportan esas condiciones extremas y son capaces de permanecer y reproducirse. Tanto el análisis de poblaciones microbianas resistentes a los contaminantes como el conocimiento de las especies que las componen y sus capacidades metabólicas para degradar sustancias tóxicas son temas de relevante interés, específicamente cuando se trata de recuperar ambientes contaminados de manera eficiente, bajando costos y tiempos de operación.

A continuación, se describirá exhaustivamente los sitios de muestreo ya que el conocimiento de los mismos permite un mejor análisis de las condiciones de cultivo que se deberán tener en cuenta al momento de la propagación de cepas para el posterior análisis de sus capacidades hidrocarburoclíticas.

3.2 Sitios de muestreo y muestras de suelos para extracción del material biológico

Con la finalidad de aislar un conjunto de cepas bacterianas con capacidades metabólicas para la degradación de hidrocarburos se seleccionaron muestras de suelo contaminado procedentes de dos sitios de muestreo que están directamente relacionados con la actividad hidrocarburofítica regional.

El primero de ellos, denominado “Sitio ZAPALA” está localizado en un paraje natural donde se llevó a cabo prospección y extracción de petróleo hace más de 50 años y esas instalaciones abandonadas constituyen en sí mismas un pasivo ambiental. En este sitio se tomaron muestras de agua y lodos contaminados

El segundo lugar seleccionado, denominado “Sitio HUINCUL” está localizado en una empresa que se dedica a remediación de suelos contaminados con hidrocarburos y está actualmente operando en la región. En este sitio se colectaron muestras de suelos contaminados.

A continuación se describirá en detalle la localización geográfica y las características de cada sitio de muestreo, como también las cantidades de muestras colectadas en campo para los aislamientos.

3.3 Localización y descripción de los sitios de muestreo

3.3.1 Sitio Zapala

El primer sitio de muestreo se localizó en un pasivo ambiental remanente de la industria petrolera neuquina. Para efectivizar la toma de muestras se seleccionó un área rural con registro de actividad petrolera en el pasado pero que en la actualidad se encuentra abandonada y sin grandes perturbaciones antropogénicas (no estar ubicado en las proximidades de una localidad o en zona con mucho tránsito por trashumancia, ni ser zona de explotación minera). Estas características hacen presuponer que es posible encontrar desechos antiguos de petróleo en vías de degradación las cuales conformarían un nicho ecológico para consorcios microbianos biodegradadores de hidrocarburos.

El sitio de muestreo está localizado en el Paraje denominado “Mallin del Muerto” en el departamento Zapala de la provincia de Neuquén. Las coordenadas del sitio

del muestreo son $38^{\circ}48'03,91''$ S y $70^{\circ}00'34,54''$ O con una altitud sobre nivel del mar de 809 m. (Figura 5). Para acceder al sitio de muestreo se puede llegar por dos rutas, para realizar la primera se debe tomar como referencia la ruta provincial N° 14 (Zapala-Covunco Arriba) y desde la intersección de esta con el camino consolidado que conecta la localidad de Covunco Abajo, que se denomina cruce de Tres Piedras. En línea recta desde este cruce, que se encuentra hacia el este da unos 1830 metros. El otro camino, que fue el usado en oportunidad de realizar el muestreo, se debe transitar la ruta provincial N° 14 a la altura del paraje La Americana. Se toma hacia la izquierda por camino consolidado que se dirige al Mallín del Muerto y se toma hacia la derecha por camino consolidado habiendo recorrido unos 2165 m en dirección oeste, el que se dirige hacia la laguna de Mariano Moreno. Luego de recorrer unos 2600 m en dirección norte se llega a un nuevo cruce a mano derecha (bajo salitroso) y se recorren unos 500 m donde se dejan los vehículos y se camina en dirección este unos 1100 m siguiendo la traza del arroyo que desagua en el bajo.

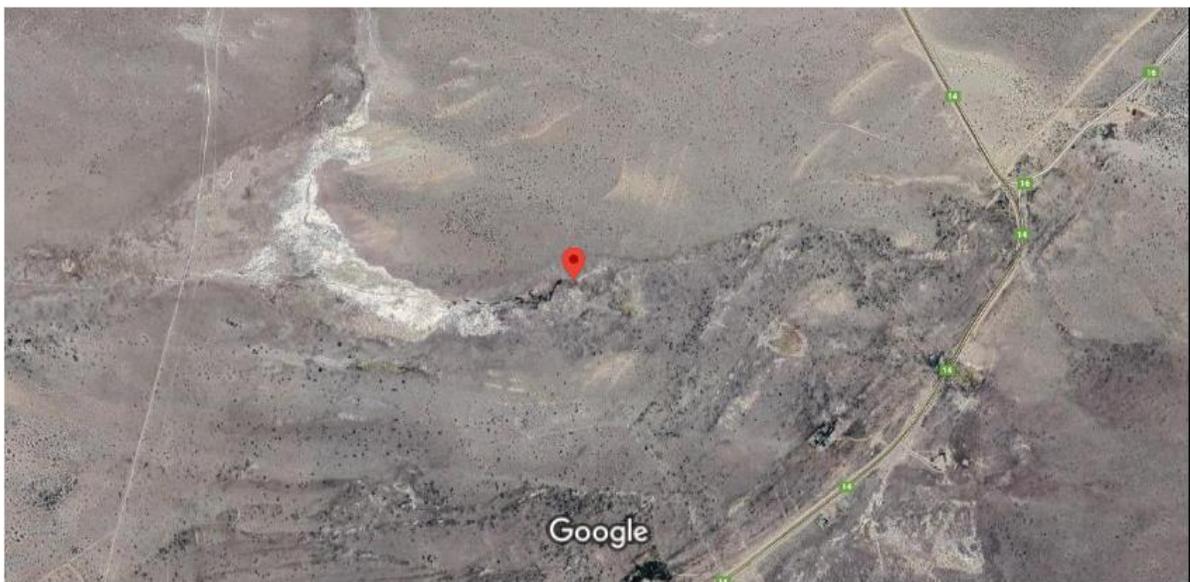


Figura 5: Geolocalización del sitio de muestreo. Nótese la zona de color oscura que denota contaminación del lugar. Fuente: Google maps.

En la zona se pudo apreciar tanto el abandono del sitio luego del proceso de extracción petrolífera como también la contaminación remanente. Los cursos de agua presentaban restos de petróleo, formaciones similares a algas cloróticas y manchones de color rosado remanentes de algún proceso de degradación biológica. En algunos lugares se podía apreciar también zonas con aspecto de tapiz de cianobacterias de color verde o pardo verdoso (Figura 6 a, b y c).

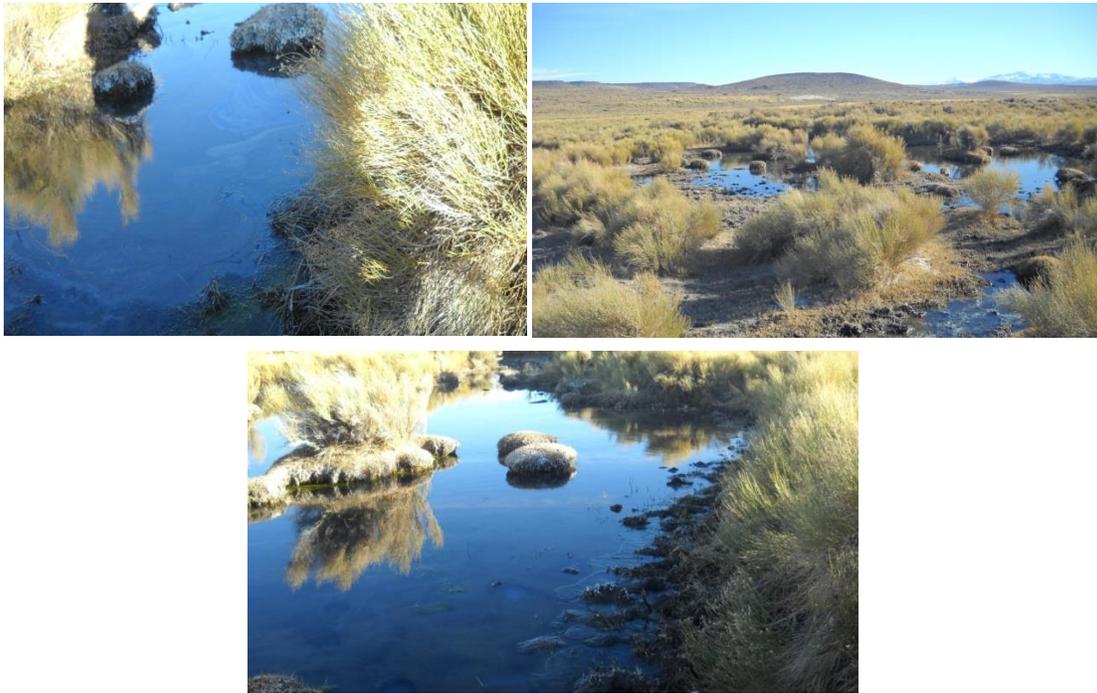


Figura 6: Imágenes de los puntos de muestreo.

Se designaron 7 puntos de muestreo y se tomaron 7 muestras, una por sitio, que consistieron en una mezcla de agua y lodo con restos de petróleo.

Los restos de petróleo podían apreciarse sobre las muestras como goterones de color oscuro y de consistencia espesa (Figura 7 a, b, c y d).

Las muestras fueron llevadas posteriormente al laboratorio para su enriquecimiento.

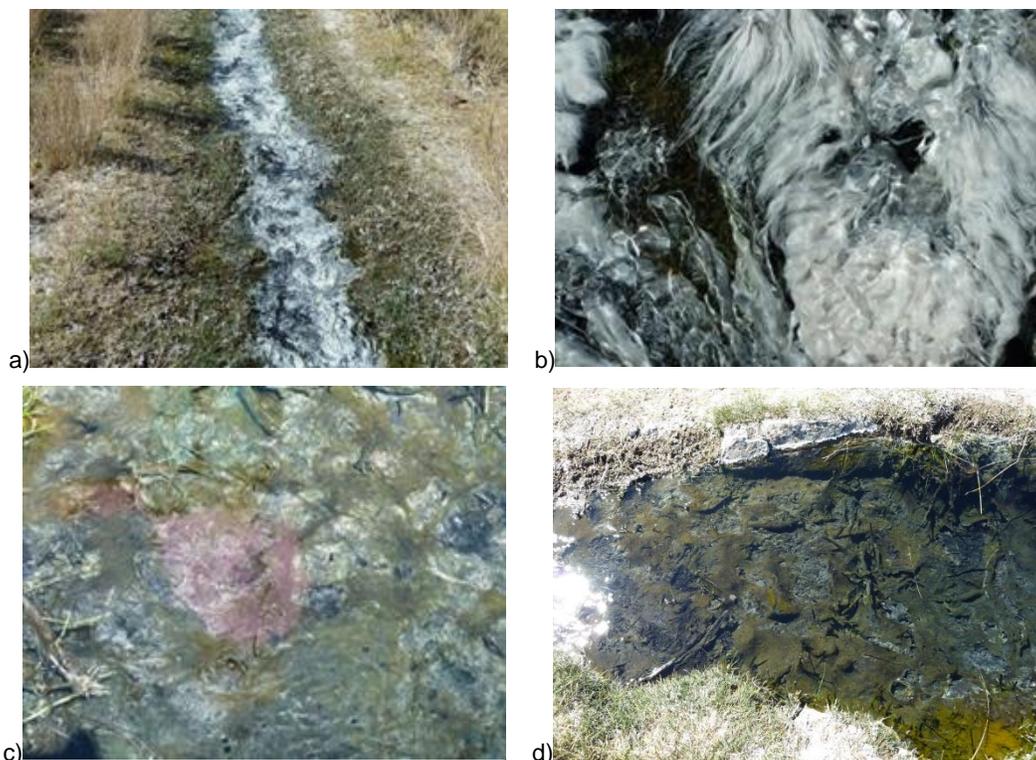


Figura 7: a, b, c, d) Aspecto general de los sitios de muestreo.

3.3.2 Sitio Plaza Huincul

El segundo sitio de muestreo para obtener cepas hidrocarburofílicas se localizó en una empresa regional, más específicamente en la empresa “EET S.A. Servicios Ambientales” ubicada en el Parque Industrial Químico-Petroquímico, Plaza Huincul, Prov. de Neuquén (Figura 8 a). EET S.A. Esta compañía mantuvo su actividad desde el año 2001 hasta el 2016 donde cesaron sus operaciones después de que un incendio desbastara sus instalaciones. Esta empresa fue la primera en su tipo que se instaló en la zona, con el fin de llevar a cabo una gestión ambientalmente viable de los pasivos generados por diferentes industrias de la región. EET S.A. empleó la tecnología de biopilas para reducir los constituyentes del petróleo en suelos contaminados estimulando la actividad microbiana aeróbica a través de la aireación y/o adición de nutrientes y humectación.



Figura 8 a) Fachada de la empresa E.E.T. S. A. b) Biopila en funcionamiento en el predio de la empresa.

Al momento del muestreo había en el predio de la empresa EET S.A. varias biopilas en condiciones operativas en diferentes estadios de degradación (Figura 8 b). Cada biopila estaba conformada por material contaminado con hidrocarburos (suelos provenientes de zonas con derrames accidentales de petróleo, productos de solidificación de lodos, recortes de perforación base oíl con arcillas, material de desgaste de la perforación de pozos petroleros, tierras contaminadas con gasoil, aceites livianos y distintos aditivos orgánicos e inorgánicos no determinados) mezclados convenientemente con suelo no contaminado hasta alcanzar una concentración inicial de los contaminantes en el suelo que variara de 4 a 6 % m/m. Estos suelos se encontraban dispuestos sobre el terreno en un volumen aproximado de 300 m^3 de material para cada biopila (alrededor de 400 tn de suelo cada una, con una densidad de $1,35 \text{ tn/m}^3$), con una sección transversal semejante a un trapecio recto con base mayor de 6 m y base menor de 2 m, con una altura de 2 m aproximadamente, y una longitud de aproximadamente 30-40 m para cada pila. Durante el proceso de biorremediación el material de las biopilas era rotado en forma mecánica cada 20 días para asegurar la aireación, mientras que la humectación del suelo, se mantuvo alrededor del 12%, y la adición de nutrientes se garantizó mediante operaciones de riego.

Para obtener muestras de suelo representativas del proceso y que resultaran adecuadas para el posterior aislamiento de cepas hidrocarburoliticas, se seleccionó una la biopila activa siguiendo los consejos de los operarios a cargo de la plata de biorremediación ya que contaban con gran experiencia en el trabajo de

campo. Se conformaron tres muestras compuestas, tomadas según criterio de muestreo del gráfico que se presenta en la Figura 9. En cada subsector (tercio longitudinal de la biopila) se tomó el esquema de puntos indicado para la sección transversal, para componer cada muestra con 5 porciones. Estas se obtuvieron abriendo la biopila transversalmente con equipo vial excavadora y luego utilizando una pala manual en cada punto, a fin de extraer el suelo no alterada por efecto de la máquina vial. Las tres muestras resultantes fueron homogenizadas e individualmente almacenadas en bolsas impermeables y trasladadas al laboratorio para los análisis físico químicos y microbiológicos.

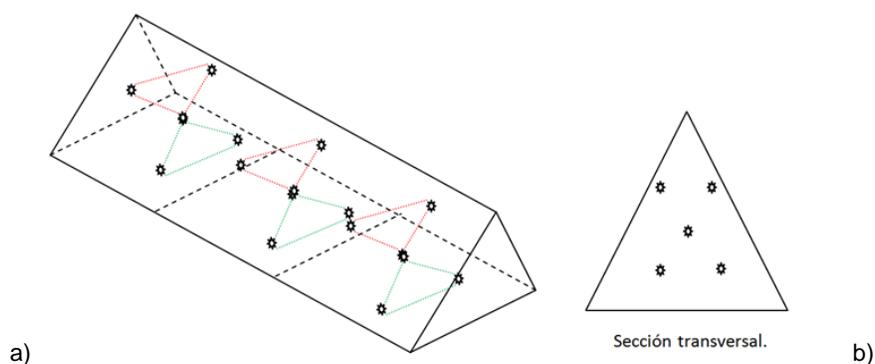


Figura 9 a) Esquema de biopilas. b) Sección transversal.

Se muestran, entonces en este capítulo una descripción detallada de los 2 sitios de muestreo. Respecto del sitio Zapala se muestra la geolocalización del sitio de muestreo y se detalla a través de fotografías el estado ambiental al momento de la toma de muestras. Respecto del sitio Huincul se detalla la localización de la empresa de servicios ambientales, el estado de las pilas encontradas allí al momento de la visita, como así también el procedimiento para la toma de muestras.

Una vez recolectadas las muestras del sitio Zapala, se procedió al aislamiento y selección de bacterias con capacidades hidrocarburoclíticas y se diseñó un cepario único para trabajar, procedimiento que se describe en el capítulo 4.

CAPITULO 4: SELECCIÓN Y
AISLAMIENTO DE BACTERIAS CON
CAPACIDAD HIDROCARBUROLITICA -
CONSTRUCCION DE CEPARIOS

4.1 Obtención de cultivos puros de cepas hidrocarburohíticas

El aislamiento de cepas degradadoras de hidrocarburos para la posterior obtención de cultivos puede realizarse mediante los métodos más conocidos y utilizados en la microbiología. (Saranya, K. y col. 2016).

En el caso de estas especies en particular, se debe hacer al inicio del proceso de aislamiento y selección, un enriquecimiento en un medio de cultivo de tipo selectivo para favorecer el crecimiento de aquellas cepas de interés y evitar el crecimiento de la flora acompañante.

Este procedimiento tiene la finalidad de aislar cada una de las cepas para posteriormente llevar a cabo distintos análisis para su identificación y selección de acuerdo a la capacidad que poseen de degradar diferentes hidrocarburos

En la Figura 10 se presenta el esquema general que se llevó a cabo para obtener las cepas puras:

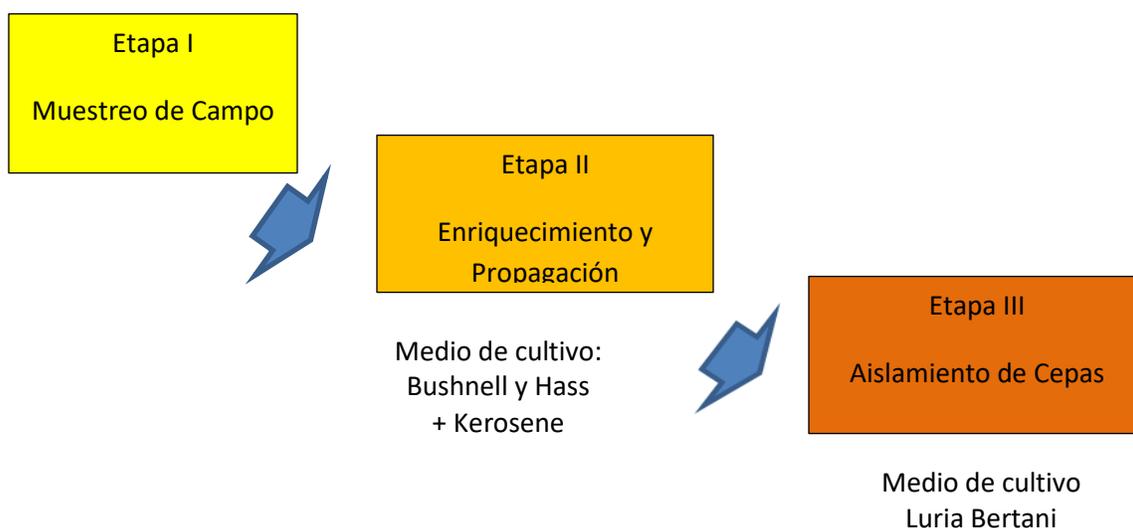


Figura 10: Esquema general de obtención de cepas puras.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Enriquecimiento y propagación de las muestras

A partir de las muestras colectadas en el campo se prepararon sub-muestras. Si la fracción original se encontraba en estado líquido se tomaron 10 ml de agua y si era sólida (lodo, suelo) se usó 1g de muestra. En ambos casos, las porciones

fueron transferidas a sendos Erlenmeyers para continuar con el protocolo para el enriquecimiento y propagación de los cultivos utilizando Medio Bushnell y Haas (BH ver Anexo 1.1) y kerosene como fuente de carbono y energía para enriquecimiento y propagación de los microorganismos según los protocolos que se detallan en del Anexo 1.3.

4.2.2 Aislamiento de bacterias hidrocarburohíticas

Luego de la etapa de enriquecimiento se procedió a realizar el aislamiento de cultivos puros a través de la técnica de agar volcado en placa. Utilizando medio Luria Bertani (LB, ver Anexo 1.2) según los protocolos que se detallan en del Anexo 1.4

4.2.3 Conservación de cepas hidrocarburohíticas aisladas

Para garantizar la conservación de cada cultivo puro obtenido en la etapa de enriquecimiento se realizó el protocolo descrito en el anexo 1.5 para la preservación de las cepas en solución de glicerol al 10% en refrigerador a una temperatura de -20°C

4.2.4 Conteo de las muestras en cámara de recuento

El procedimiento para realizar el recuento celular se efectuó por microscopía óptica con aumento de 40X utilizando para la cuantificación una cámara Thoma. El protocolo completo se encuentra detallado en el Anexo 2.1.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Construcción del cepario

Tanto las muestras de aguas y lodos provenientes del sitio Zapala como las de suelo contaminado proveniente del Sitio Plaza Huincul fueron utilizadas en las etapas de *Enriquecimiento y propagación de los cultivos mixtos en medio BH* con kerosene como fuente de carbono, según técnica descrita en sección 4.2.2 para promover el crecimiento bacteriano de aquellas especies con capacidad para degradar hidrocarburos. Transcurrido el tiempo de incubación establecido por la técnica se procedió al recuento celular en cámara de Thoma (anexo 2.1) para

evaluar la carga microbiana de cada una de las muestras expresada en bact/ml. A modo de ejemplo se presentan en la Tabla I los resultados obtenidos después de la etapa de enriquecimiento al tratar las 7 muestras procedentes del sitio Zapala.

Tabla I: Recuento bacteriano en cámara Thoma cultivo de enriquecimiento de las muestras del sitio Zapala

Muestras Zapala	1	2	3	4	5	6	7
Bacterias/ml X 10 ⁷	1,35	No detectadas	5,05	6,47	3,47	6,12	2,75

A partir de los recuentos obtenidos se decidió seleccionar las muestras 3, 4, 5 y 6 ya que presentaron la mayor carga bacteriana que indicaría una biomasa más activa, mientras que las muestras 1 y 7 se descartaron. Lamentablemente, la muestra 2 no se pudo evaluar debido a la gran cantidad de hidrocarburo presente en la misma que le infería muy alta viscosidad, lo que oscurecía el campo y obstaculizaba el conteo.

Posteriormente se realizó la etapa de *Aislamiento de bacterias hidrocarburofílicas* según técnica descrita en 4.2.2. Los microorganismos sembrados en placa con medio LB se dejaron incubar hasta que las colonias alcanzaron un tamaño apreciable como se muestra en la Figura 11 a y b. De cada placa se seleccionaron aquellas colonias que estaban completamente separadas de sus vecinas y se fueron eligiendo en función de sus características morfológicas externas teniendo en cuenta el color, la forma, el brillo y la elevación de cada una.

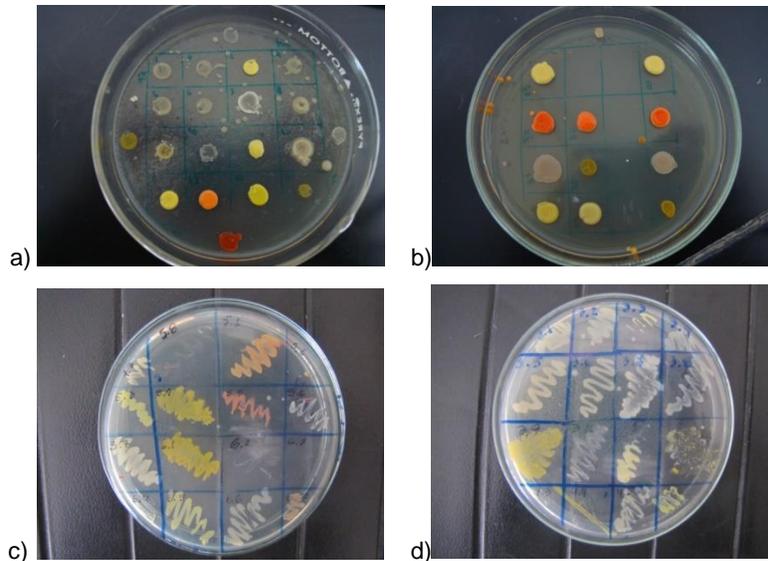


Figura 11: a) y b) Placas de aislamiento. Puede observarse la diferencia de colores en las distintas cepas y en algunos casos la morfología de las mismas. c) y d) Repique de las cepas conservadas en glicerol.

La Figura 11 muestra la variabilidad en la morfología de las colonias aisladas y las diferentes pigmentaciones de las mismas indicando una amplia diversidad en ellas.

Se seleccionaron la mayor cantidad de cepas con características diferentes de manera de asegurarse en alguna medida la variabilidad del grupo pero teniendo la precaución de incluir en el mismo y a modo de respaldo, más de un individuo de cada una. Cada colonia fue transferida a una nueva placa para generar biomasa se conservaron en glicerol según apartado *4.2.3 Conservación de cepas aisladas* (Figura 11 c y d).

La Figura 12 muestra un esquema de los procedimientos que se llevaron a cabo para la confección de los ceparios de Plaza Huincul y Zapala.



Figura 12: Esquema del aislamiento, selección y confección del cepario de los sitios de Plaza Huincul y Zapala.

Con las muestras provenientes del Sitio Huincul se llevó a cabo el mismo procedimiento hasta la obtención de un conjunto de cepas aisladas. Sin embargo *cabe consignar que el procedimiento de toma de muestras, procesamiento de las mismas, y selección de cepas para conformar el cepario de Plaza Huincul estuvo a cargo de los tesisistas Martín Navarro, Sebastián Petricio, Gimena Vázquez y Gisella Alessandróni, que realizaron sus tesis finales de grado. A partir de esta selección, se continuó trabajando con estas cepas en etapas posteriores tomando aquellas con mejores características metabólicas para la degradación de hidrocarburos.*

El cepario finalmente quedó constituido por: 36 cepas procedentes del sitio Zapala y 20 cepas procedentes del sitio Huincul.

Cepas deL Sitio Zapala
Z1 Z2 Z3 Z4 Z5 Z6 Z7 Z8 Z9 Z10 Z11 Z12 Z13 Z14 Z15 Z16 Z17 Z18 Z19 Z20 Z21 Z22 Z23 Z24 Z25 Z26 Z27 Z28 Z29 Z30 Z31 Z32 Z33 Z34 Z35 Z36
Cepas del Sitio Huincul
H1 H2 H3 H4 H5 H6 H7 H8 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16 H17 H18 H19 H20

PARTE C: CARACTERIZACION
MORFOLOGICA, FISIOLOGICA Y
MOLECULAR DE LAS CEPAS
SELECCIONADAS POR SU MEJOR
CAPACIDAD HIDROCARBUROLITICA

CAPITULO 5: AGRUPAMIENTO DE LAS
CEPAS BACTERIANAS SEGÚN SUS
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y
FISIOLÓGICAS

5.1 Agrupamiento de las cepas bacterianas hidrocarburolíticas según sus características morfológicas y fisiológicas

Para obtener un perfil metabólico de los microorganismos que conforman el cepario, se realizaron diferentes ensayos bioquímicos propuestos en el manual de Bergey (1957), segunda edición (2005). Los ensayos incluyeron, entre otras, las siguientes pruebas: tinción de Gram, para determinar su morfología e identificación de las bacterias positivas y negativas; actividad de catalasa y oxidasa y comprobación de presencia de enzimas. Este conjunto de técnicas analíticas son utilizadas usualmente en la clasificación e identificación taxonómica de los géneros más representativos de bacterias y tiene como utilidad el agrupamiento de algunas especies bacterianas con propiedades metabólicas similares según sus características morfológicas y tróficas. El pool de pruebas bioquímicas para la determinación de especies bacterianas puede llevarse a cabo utilizando kits comerciales como por ejemplo el kit API Biomerux. Los sistemas miniaturizados API® son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Estos sistemas consisten en un dispositivo de plástico con varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados o diferentes sustratos de enzimas de acuerdo al tipo de prueba que se requiere montar. Entre algunas de las pruebas bioquímicas que pueden realizarse con estos sistemas están las pruebas de fermentación de carbohidratos, la determinación de la producción de H₂S, la determinación de la hidrólisis de la gelatina, entre otras. En el mercado existe una variedad de galerías para ser utilizadas en la identificación de diferentes tipos de microorganismos, por ello aunque todos estos sistemas tienen el mismo fundamento, difieren en el número y tipo de pruebas que permiten realizar, ya que su selección está directamente relacionada con la actividad metabólica del género al que pertenece el microorganismo a identificar (http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_SistemasAPI.pdf). Estos kits comerciales son más modernos y rápidos que las técnicas convencionales para desarrollar las pruebas bioquímicas pero son mucho más onerosos.

Teniendo en cuenta que en este trabajo de tesis las pruebas bioquímicas no se realizaron con el objetivo de obtener una identificación exhaustiva de las especies sino que fue tener una aproximación del perfil metabólico y poder así realizar un primer agrupamiento de manera de detectar especies con capacidades hidrocarburoclíticas potencialmente interesantes para llevar adelante los ensayos en microcosmos a escala de laboratorio y sabiendo que, por otra parte, se disponía de los reactivos necesarios para la realización de gran parte de los ensayos requeridos se decidió no utilizar los kits comerciales y efectuar las pruebas para la identificación por vía convencional.

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Coloración de Gram

Esta técnica permite agrupar a las bacterias en función del tipo de pared celular que poseen. Las bacterias que resultan Gram positivas (+) se tiñen de color azul y poseen una pared celular que consta de una gruesa capa de péptido-glicano mientras que las bacterias Gram negativas (-), con una capa mucho más fina de péptido-glicano en su pared celular se tiñen de color rosado.

Las tinciones se realizaron sobre los cultivos celulares puros previamente aislados y se utilizó un kit comercial (Merck cod. 111885) que es habitualmente usado para obtener la coloración de Gram. El protocolo realizado requirió preparar un frotis (gota del cultivo a analizar sobre portaobjeto y fijada con calor). Luego se colocó el portaobjeto sobre un soporte para tinciones y se cubrió con solución de cristal violeta y se dejó actuar 1 min. Se lavó suavemente con agua de la canilla. Posteriormente, se cubrió el preparado con reactivo de Lugol (solución de I_{Na} o I_K) y se dejó actuar 1 min. Se lavó de la misma manera y se realizó luego la decoloración usando una mezcla de etanol 95%-acetona. Se dejó 30s moviendo suavemente la lámina y se continuó lavando con el decolorante hasta que este no arrastre más colorante y se enjuagó con agua. Finalmente, se cubrió el portaobjeto con solución de safranina y se dejó actuar 15s y se procedió a enjuagar y dejar secar para su posterior observación en microscopio óptico con objetivo de inmersión.

5.2.2 Caracterización morfológica de las colonias

Se realizó la observación al microscopio y se clasificaron las bacterias como Gram + o Gram – de acuerdo a su estructura celular y se observó también la morfología de cada muestra como coco o bacilo. Este análisis se acompañó de una observación de la colonia elegida y se las clasificó según sus características morfológicas (color, forma, contorno, textura, brillo, opacidad, etc.).

5.2.3 Pruebas bioquímicas para caracterización fisiológica

A todos los cultivos que resultaron positivos para degradar algún hidrocarburo se les realizó una caracterización fisiológica de cada una de las cepas elegidas y se determinó así su tipo trófico y sus características enzimáticas, lo que permitió tener una primera aproximación a su identificación. Las pruebas que se realizaron se mencionan a continuación y el detalle de las mismas se encuentra en el Anexo 3.

- 5.2.3.1 Tsi: se determinó la capacidad de fermentar de glucosa, lactosa y o sacarosa y producción de SH₂
- 5.2.3.2 Catalasa: se determinó la presencia de la enzima catalasa por burbujeo en agua oxigenada.
- 5.2.3.3 Oxidasa: se detectó la presencia de la enzima citocromo- c- oxidasa presente en organismos aeróbicos.
- 5.2.3.4 OF: permitió diferenciar la capacidad de fermentar y oxidar de carbohidratos (glucosa).
- 5.2.3.5 Hidrólisis de almidón: detectó y determinó la acción de la enzima amilasa sobre el almidón
- 5.2.3.6 Cetrimide: es un medio de cultivo selectivo que permitió detectar la presencia de especies del género *Pseudomonas sp.*
- 5.2.3.7 BAM: se utilizó para detectar movilidad, producción de indol, producción de SH₂, fermentación de lactosa y actividad ureasa.
- 5.2.3.8 Producción de indol: se usó para detectar la presencia de triptofanasas para la degradación del triptofano y la consecuente producción de indol.

5.2.3.9 MRVP (reacción de rojo de metilo y Vogues Proskauer): permitió detectar la capacidad de un microorganismo para formar productos ácidos a partir de la fermentación de la glucosa y mantenerlos en el tiempo, venciendo la capacidad amortiguadora del sistema y la incapacidad de producir acetimetilcarbinol como producto final de dicha fermentación

5.2.3.10 Hidrólisis de gelatina: se determinó la presencia de la exoenzima gelatinasa, la cual hidroliza la gelatina presente en el medio liberando polipéptidos y aminoácidos.

5.2.3.11 Citrato: Se determinó la utilización del citrato, un ácido orgánico como única fuente de carbono.

5.2.4 Ensayo para determinar capacidad hidrocarburofítica sobre diferentes hidrocarburos

Los cultivos puros seleccionados con kerosene como fuente de carbono, aislados y conservados en frío, que conformaron el cepario descrito en el capítulo 4, fueron utilizados como inóculo para comprobar su capacidad de degradar diferentes tipos de contaminantes: gasoil, kerosene, naftaleno, antraceno y bifenilo. Se tomó una muestra del cultivo a ensayar y se realizó una suspensión celular en tubos con agua destilada de manera tal de lograr una suspensión celular de concentración aproximada a 10^3 bact /ml. De esa suspensión celular se tomaron 0,5 ml y se los sembró en tubos que contienen 5 ml de medio Bushnell-Haas (BH) y 0,05 ml del hidrocarburo a ensayar. Posteriormente, se llevaron a incubación a 30 °C por un período de hasta 21 días como máximo durante el cual se fueron leyendo los resultados cada 2 o 3 días. La degradación de los hidrocarburos seleccionados se determinó por el viraje del indicador de azul a rosa indicando un proceso de oxido reducción.

5.2.5 Prueba de hidrofobicidad

Esta es una técnica que permitió observar la adherencia o afinidad de ciertas bacterias a los hidrocarburos. Se midió la absorbancia de una suspensión celular en base acuosa, antes (A_0) y después (A_f) de ponerla en contacto con diferentes

hidrocarburos y se usaron los valores de absorbancia para calcular el porcentaje de adherencia como se indica en la ecuación: $A\% = \frac{(A_0 - A_f)}{A_0} \times 100$

Teóricamente, a mayor valor de absorbancia, mayor cantidad de células en la suspensión acuosa y menor capacidad de adherencia al hidrocarburo ensayado. Se sembraron en una placa de Petri con medio LB sólido, una ansada de los microorganismos conservados en frío y se incubaron a 30 °C. Luego de 24 h, si se verificó crecimiento se sembró ese cultivo fresco en 30 ml de medio LB líquido y se dejó incubar 24 h a 30°C. Para dar inicio a la prueba de adherencia se tomaron, 2 ml del cultivo líquido y se trasvasaron a un tubo eppendorf y se centrifugó por 90 s a 8000 rpm. Posteriormente, se procedió al lavado del pellet para remover todo el medio LB, se resuspendió el pellet obtenido con buffer PUM (lavado) y se lo centrifugó nuevamente 90 s a 8000 rpm. Este procedimiento se realizó 2 veces. Finalmente, se resuspendió el pellet en el buffer y se midió la absorbancia a 400nm. Se tomaron 1,5 ml de la suspensión celular, se la colocó en un tubo de ensayo y se añadió un volumen conocido de un hidrocarburo. Se mezcló enérgicamente durante 2 minutos y se dejó reposar aproximadamente durante 20 minutos hasta que se produjo la separación de fases. Se extrajo la fase acuosa y se tomaron nuevamente valores de absorbancia a 400 nm. Se repitió el procedimiento con un cultivo de 48 h. En cada caso se calcularon los porcentajes de adherencia con un margen de error de ± 1 .

5.3 Resultados y discusión

Clasificación y agrupamiento de las cepas bacterianas hidrocarburohíticas según sus características morfológicas y fisiológicas.

5.3.1 Características morfológicas del cepario y Tinción de Gram

Una vez construido el cepario se llevaron a cabo algunas pruebas tendientes a lograr un agrupamiento entre los diferentes microorganismos aislados a fin de lograr tener una visualización de sus características principales en función de obtener los mejores representantes de cada grupo para llevar a cabo los ensayos de biorremediación que se plantearán en futuras etapas de este trabajo.

La primera prueba realizada sobre todas las cepas aisladas fue la coloración de Gram. La coloración de Gram es utilizada para diferenciar las bacterias de acuerdo a las características químicas de la pared celular. Es una coloración diferencial dado que intervienen dos colorantes con un paso intermedio de decoloración, que pone de manifiesto dichas diferencias. Es la coloración más usada en bacteriología, dado que divide a las bacterias en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas. Recibe su nombre del bacteriólogo danés Christian Gram quien la elaboró en 1884 (Figura 13).

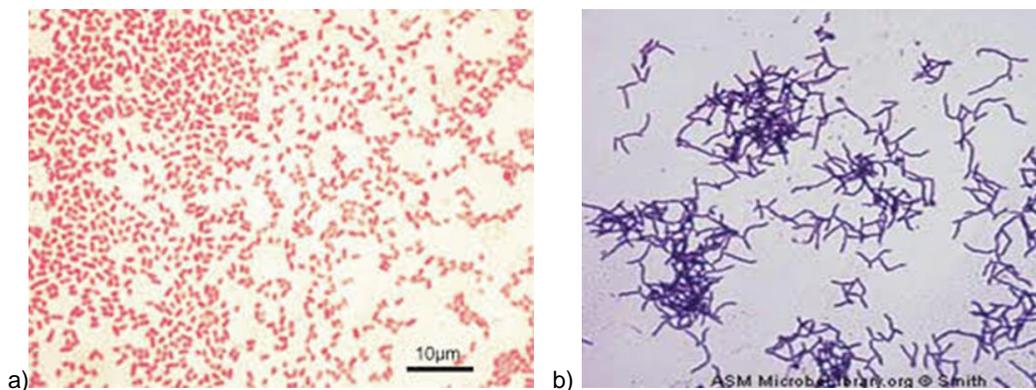


Figura 13: Coloración de Gram. a) Gram -. b) Gram +.

La coloración de Gram dio como resultado tanto especies Gram + como Gram – y bacilos y cocos. En el sitio de Zapala, se encontraron 17 cepas Gram -, 8 Gram +, 1 contaminada (se veían cocos Gram + y -) y 10 al momento de sacarlas de la conservación, no crecieron, por lo tanto no pudo realizarse la coloración. Respecto a la forma se encontraron 14 especies con forma de bacilos y 12 con forma de cocos. Pudo observarse también, algunas especies con características diferentes y llamativas a la mayoría, como por ejemplo la cepa Z15 que forma filamentos largos y la coloración de Gram no es clara o como la cepa Z31 que posee sobre el extremo de la célula una formación a modo de espora interna (Figura 14).

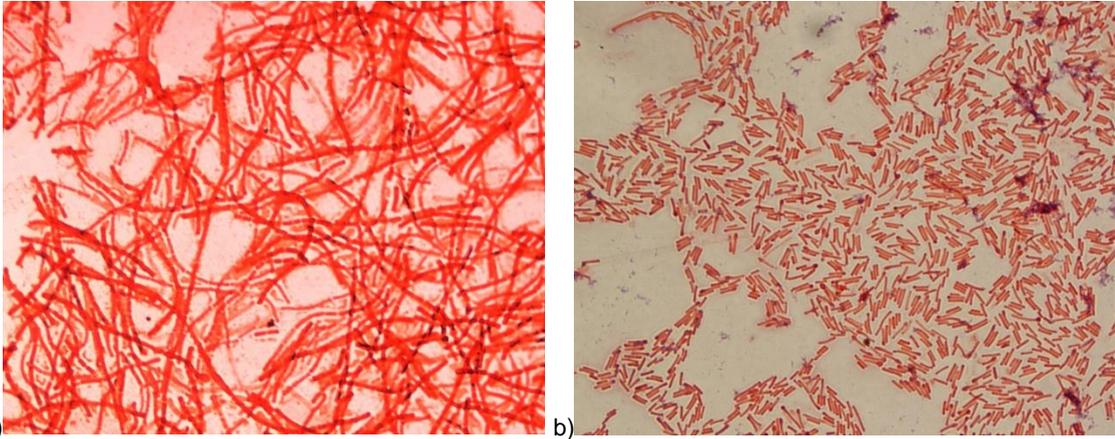


Figura 14: a) Morfología celular de la cepa Z15. Nótese la formación tipo filamento. b) Características de la cepa Z31, nótese en el extremo de las células la formación a modo de espora.

En el sitio de Plaza Huincul, se observaron 10 Gram -, 7 Gram + y 3 contaminadas presentándose ambas formas y coloraciones.

En cuanto a la forma se pudieron observar 12 especies con forma de bacilo y 4 con forma de coco. El resto de las cepas se encontraban contaminadas.

Tanto el resultado de cada microorganismo ante la coloración Gram como las características físico-estructurales particulares de las colonias, son propiedades valiosas que ayudan a realizar la identificación de las especies al momento de realizar estudios basándonos en criterios morfológicos.

A continuación se presentan las Tablas II y III con todas las características de todas las cepas que componen el cepario en estudio.

Tabla II: Caracterización de cepas aisladas de sitio contaminado en Zapala por morfología externa y coloración de Gram.

Cepa	Morfología de la colonia	Coloración de Gram	Observaciones
Z1	Brillante, cremosa, redonda, borde regular, crema	-	Bacilos grandes
Z2	Brillante, cremosa, redonda, borde regular, crema	-	Bacilos grandes
Z3	Cremosa, redonda, opaca, borde regular, amarilla	+	Cocos grandes, de a 4 o 2
Z4	Brillante, cremosa, redonda, borde regular, crema	-	Bacilos pequeños.
Z5	De borde semiirregular, cremosa, brillante crema	-	Bacilos pequeños
Z6	De borde semiirregular, cremosa, brillante, crema	-	Bacilos pequeños
Z7	De borde irregular, estriado, brillante, crema	-	Bacilos angostos, alargados y grandes, solitarios
Z8	De borde irregular, lisa, brillante, crema	-	Bacilos angostos, alargados grandes, solitarios o de a dos
Z9	Borde estriado, discontinuo, opaco, amarillas	-	Bacilos. Se ven de 2 tipos. Posible contaminación
Z10	Cremosa, semiopaca, borde liso, blancas	+/-	Cocos
Z11	Opaca, redonda, borde liso, amarillas claras	-	Cocos pequeños agrupados
Z12	Redonda, de borde irregular, opaca, amarillas	Sin datos	No creció
Z13	Redonda, lisa, de borde regular, semiopaca, rosas	Sin datos	No creció
Z14	Redonda, opaca, de borde liso, blancas	Sin datos	No creció
Z15	Redonda, brillante, de borde liso, crema	-	Bacilos, forman filamentos largos
Z16	Redonda, de borde liso, opaca, amarillas	+	Cocos grandes agrupados de a 2 o 4
Z17	Redonda, opaca, de borde liso, blancas	Sin datos	No creció
Z18	Redonda, brillante, de borde irregular, rosa y crema	+	Cocos muy pequeños, agrupados
Z19	Redonda, opaca, borde liso, amarillas	Sin datos	No creció
Z20	Redonda, brillante, borde liso, amarillas claras	-	Cocos muy pequeños, agrupados
Z21	Redonda, brillante, borde irregular, amarillas	-	Bacilos muy pequeños, agrupados
Z22	Redonda, opaca, de borde liso, rosas	+	Cocos grandes agrupados
Z23	Redonda, opaca, de borde liso, blancas	+	Cocos grandes, agrupados 2-4
Z24	Redonda, opaca, borde estrella y estriado, blancas	+	Bacilos agrupados pequeños
Z24	Redonda, opaca, de borde regular, blancas/gris	Sin datos	No creció
Z26	Redonda, brillante, irregular, amarillas	Sin datos	No creció
Z27	Redonda, opaca, borde liso, amarillas	Sin datos	No creció
Z28	Redonda, brillante, borde liso, blancas	Sin datos	No creció
Z29	Redonda, brillante, de borde algo irregular, blancas	Sin datos	No creció
Z30	Redonda, opaca, de borde liso, amarillas	-	Cocos muy pequeños, agrupados
Z31	Redonda, brillante, borde regular, crema	-	Bacilos en forma de "fosforo"
Z32	Redonda, brillante, borde regular, rosas	-	Cocos grandes, agrupados
Z33	Redonda, opaca, bordes lisos, amarillas	+	Cocos grandes agrupados 2-4
Z34	Redonda, brillante, de borde liso, blancas	+	Cocos grandes agrupados 2-4
Z35	Redonda, opaca, borde irregular, amarillas	-	Bacilos pequeños, solitarios
Z36	Redonda, opaca, borde irregular, rosas	-	Cocos muy pequeños, solitarios

Tabla III: Caracterización de cepas del Sitio Huincul por morfología externa y coloración de Gram.

Cepa	Morfología de la colonia	Coloración de Gram	Observaciones
H1	Rosa clara, circular con bordes redondeados, cremosa brillante	-	Bacilos pequeños
H2	ocre, rugosa, opaca, circular bordes irregulares	+	Bacilos pequeños
H3	Amarilla, circular bordes lisos, opaca, lisa, cremosa	+/-	Cocos y bacilos. Contaminada
H4	Ocre, irregular, cremosa, translúcida	+/-	Bacilos grandes y pequeños. Contaminada
H5	Naranja irregular, rugosa, brillante	-	Bacilos pequeños
H6	Naranja, circular con bordes irregulares, cremosa	-	Cocos grandes Contaminada
H7	Naranja amarillento, circular de bordes lisos, cremosa	+	Cocos grandes
H8	Amarillo claro, irregular, translúcida, rugosa	+/-	Cocos y bacilos. Contaminada
H9	Naranja, circular con bordes lisos, translúcida	-	Bacilos pequeños
H10	Naranja claro, redonda con borde irregular, cremosa	+	Bacilos pequeños
H11	Naranja, circular de bordes lisos, brillante, translúcida	+	Cocos
H12	Rosada, circular de bordes lisos, cremosa	-	Bacilos
H13	Beige con centro translúcido, circular cremosa	-	Bacilos
H14	Naranja circular con bordes redondeados	+	Cocos
H15	Beige circular con bordes redondeados	+	Bacilos
H16	Naranja intenso irregular con elevación en el centro	-	Bacilos
H17	Ocre claro circular brillante	-	Bacilos
H18	Amarilla irregular	-	Bacilos pequeños
H19	Amarilla circular con bordes irregulares y difusos	-	Bacilos pequeños
H20	Rosado circular con bordes redondeados Brillante	+	Cocos

5.3.2 Características metabólicas o fisiológicas del cepario (Pruebas Bioquímicas)

Como se ha explicitado en apartado 5.2.3 de Materiales y Métodos se realizaron una serie de pruebas bioquímicas para conocer algunas de las capacidades fisiológicas de las cepas en estudio. Las características tróficas resultado de las pruebas bioquímicas realizadas se encuentran tabuladas en el *Anexo 3: Pruebas bioquímicas*. Las pruebas realizadas mostraron una amplia variedad en los tipos tróficos. A continuación se hará una reseña de los resultados más destacados en relación a cada prueba.

5.3.2.1 TSI

Este es un medio universal empleado para la diferenciación de bacterias, en base a la su capacidad de fermentar glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico. El medio de cultivo contiene el extracto de carne y pluripeptona,

las cuales aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables. Contiene tiosulfato de sodio, el cual es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio. Es la fuente de iones Fe^{3+} , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Como producto de la fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

La Figura 15 muestra los resultados posibles para esta prueba. Se utilizaron *Escherichia coli* como testigo positivo y *Pseudomonas aeruginosa* como testigo negativo. En este caso, no se evidenció la producción de SH_2 por ennegrecimiento del medio.

Con respecto a la utilización de azúcares, 14 cepas pueden fermentar lactosa, glucosa y sacarosa (58%); 7 de ellas pueden fermentar solo glucosa (29%) y solo 3 no fermentan ningún azúcar (12%) (Figura 16). Como queda reflejado en los resultados, existe una gran adaptabilidad de las cepas en función al azúcar presente pudiendo utilizar glucosa y lactosa por ser azúcares sencillos y sacarosa que es fácilmente desdoblada en fructosa y glucosa para su utilización.

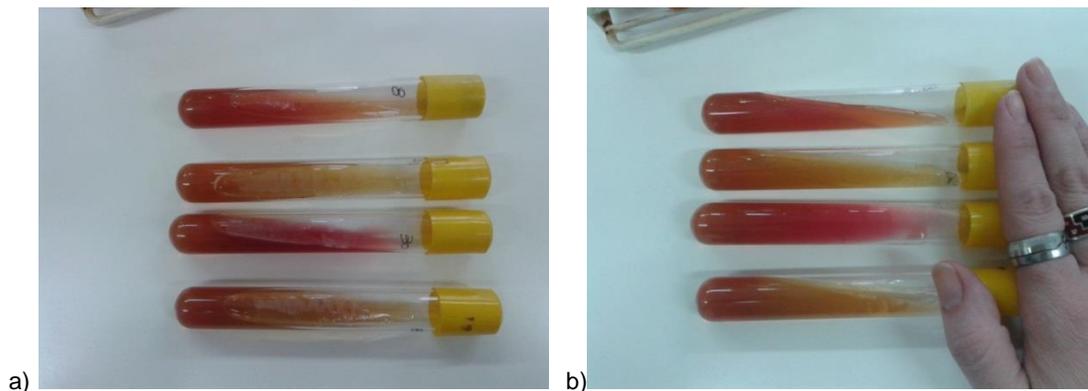


Figura 15: Resultados prueba TSI: a) Crecimiento de las cepas sobre el medio mostrando diferentes resultados. b) 1- pico rojo/fondo rojo: el microorganismo es no fermentador de azúcares. 2- pico amarillo/fondo amarillo: el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa. 3- pico rojo/fondo amarillo: el microorganismo solamente fermenta la glucosa.

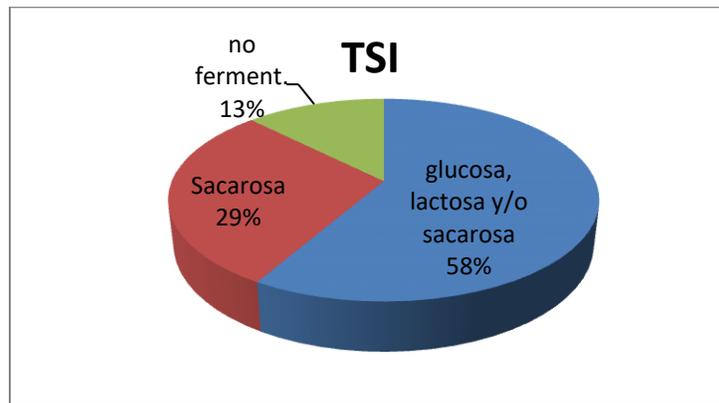


Figura 16: Resultados prueba TSI

5.3.2.2 Catalasa

Esta prueba permite comprobar la presencia de la enzima catalasa, la cual gracias a su carácter detoxificante es muy importante para las células porque participa en la eliminación de sustancias tóxicas como el peróxido de hidrógeno que se producen durante el metabolismo bacteriano. Esta enzima está presente generalmente en bacterias aerobias y en la mayoría de las anaerobias facultativas que poseen el sistema citocromo. La enzima catalasa desdobla el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. (<https://www.lifeder.com/prueba-catalasa/#Fundamento>)

Se ensayaron todos los cultivos puros provenientes de los ceparios de Zapala y Plaza Huincol y se pudo comprobar la presencia de la enzima catalasa en el 100% de las cepas ensayadas. Por lo tanto todas las bacterias pudieron desdoblar el agua oxigenada en agua y oxígeno gaseoso, que se manifestó en un intenso burbujeo tal como se observa en el portaobjeto de la Figura 17.

La presencia de catalasa se relaciona positivamente con la fermentación de azúcares ya que las cepas que pueden hacerlo, serían capaces de eliminar los productos tóxicos producidos por el proceso de dicha fermentación.

Como testigo positivo de la prueba se utilizó *Pseudomonas aeruginosa*



Figura 17: Prueba de catalasa positiva burbujeo sobre la gota de agua oxigenada.

5.3.2.3 Oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo. La presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica como se expresó en la prueba anterior.

Del total de muestras ensayadas se pudo verificar que solo el 56% de ellas poseen enzimas oxidasa mientras que el 44% no lo posee (Figura 18). Por lo tanto y teniendo en cuenta que el 100% de bacterias son catalasa positiva implicaría que las bacterias que no poseen oxidasa tendrían otro mecanismo por el cual podrían detoxificarse ante la presencia de peróxido de hidrógeno.

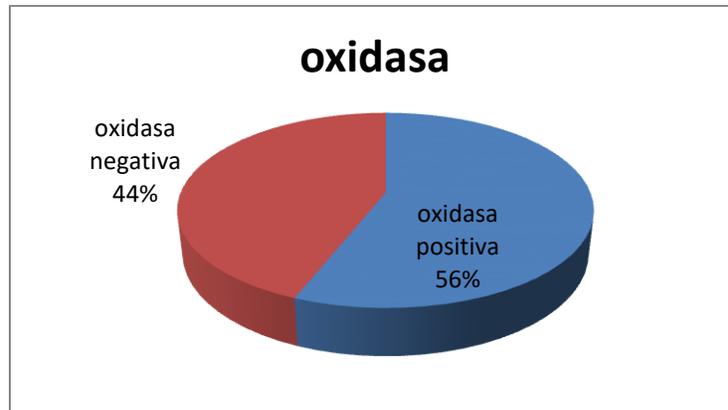


Figura 18: Resultados prueba de oxidasa.

En la Figura 19 puede verse la diferencia entre el positivo y el negativo de la prueba realizada. En el caso positivo ante la presencia de la enzima se produce el acople de la misma al sustrato oxalato de dimetil-para-fenilendiamina contenida en los discos y se produce un cambio de color rosa oscuro o fucsia. En el caso de la prueba negativa, no se produce esa coloración. Se utilizó para la prueba *Pseudomonas aeruginosa* como testigo positivo y *Escherichia coli* como testigo negativo.

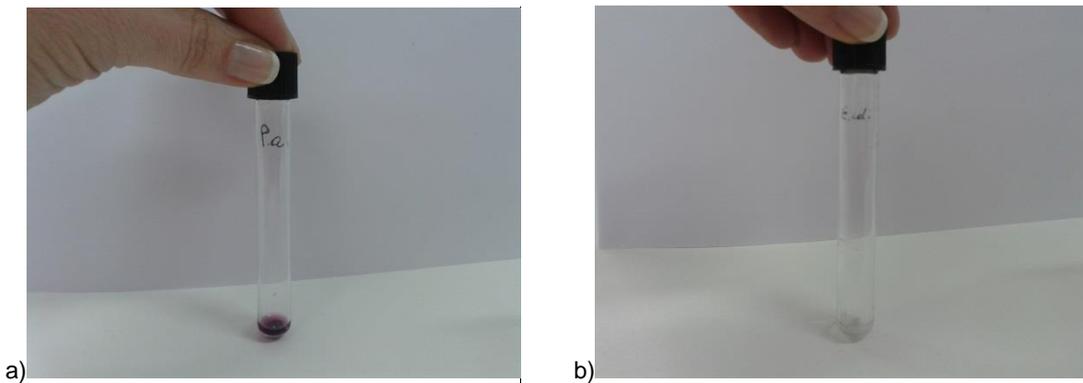


Figura 19: Resultados prueba de oxidasa. a) Reacción positiva, color rosa del indicador. b) Prueba negativa.

5.3.2.4 OF (Oxidación/Fermentación)

La fermentación es un proceso anaeróbico mediante el cual en un primer paso una molécula de glucosa es fosforilada, dando ácido pirúvico como producto intermedio cuya transformación da lugar a varios productos. Mientras que la oxidación de la glucosa es un proceso aeróbico y los microorganismos capaces de

llevarlo a cabo son, en general, aerobios estrictos. En este proceso se oxida el grupo aldehído de la glucosa a ácido glucurónico. Para esta prueba se utilizó el medio de cultivo semisólido Hugh y Leifson, con azul de bromo timol como indicador. Se determinó el metabolismo oxidativo o fermentativo de un microorganismo frente a un hidrato de carbono: glucosa. En la puede verse la lectura de la prueba. Se evaluó la movilidad de las cepas, observando el crecimiento de los microorganismos por fuera de zona de punción, como una forma adicional para diferenciar entre oxidación y fermentación mediante (Figura 21).

REACCIÓN	TUBOS CON REACCIÓN	TUBO ABIERTO	TUBO CERRADO
Oxidación	Abierto	Amarillo (A) (+)	Verde (-)
Fermentación	Cerrado	(+) Amarillo	(+) Amarillo (A)
	Cerrado	(+) Amarillo (AG)	(+) Amarillo (AG)
Sin oxidación o fermentación	Ninguna	Azul o Verde (-)	Verde (-)

Figura 20: Resultados prueba OF. La referencia al tubo con reacción “cerrado” significa que posee el tapón vas-par para generar un ambiente de anaerobiosis. Las letras entre paréntesis significan (A) amarillo y (G) gas.

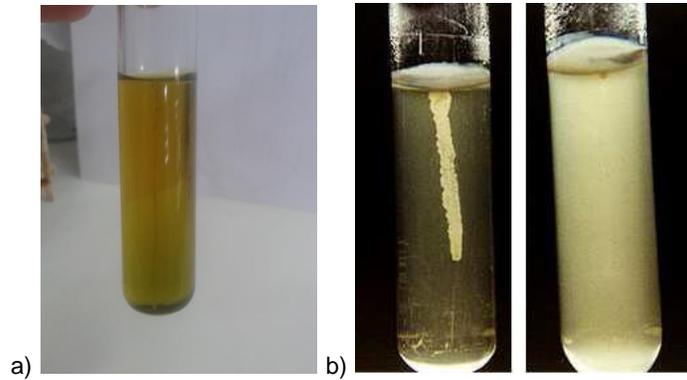


Figura 21: a) Prueba de movilidad negativa en medio OF. Nótese el crecimiento del microorganismo sobre la línea de punción y siembra. b) Prueba de movilidad en medio semisólido. Izquierda: prueba negativa, derecha: prueba positiva.

Los resultados demuestran que 12 cepas son capaces de oxidar glucosa (50%), 5 de ellas solo fermentan glucosa (21%) y 7 ni fermentan ni oxidan glucosa, tomando energía y carbono de otras fuentes (29%) (Figura 22).

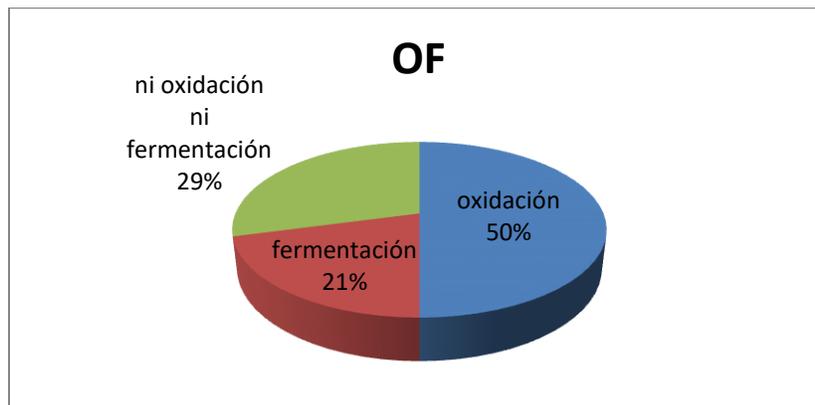


Figura 22: Resultados prueba OF.

5.3.2.5 Hidrólisis del almidón

Esta prueba determinó la presencia y la acción de la enzima amilasa sobre el almidón, que es un polisacárido complejo compuesto por 2 polímeros de la glucosa (amilosa y amilopectina) que al hidrolizarse produce dextrina, maltosa y glucosa. La Figura 23 muestra los resultados obtenidos para la prueba. La Figura a) muestra el crecimiento sobre el medio del cultivo mientras que la Figura b) muestra cómo se vería un resultado positivo luego de poner el medio de cultivo frente al reactivo de Lugol. Nótese en este caso la zona transparente alrededor del

crecimiento de la cepa sobre la línea de siembra. Esto sucede gracias a que cuando el Lugol se pone en contacto con el almidón del medio, se forma un complejo coloreado de color azul o pardo oscuro. Si la bacteria tiene las enzimas y es capaz de degradar y consumir el almidón, no se produce el complejo y se ve la zona transparente. En la Figura c) se puede ver el resultado negativo para la degradación de almidón.

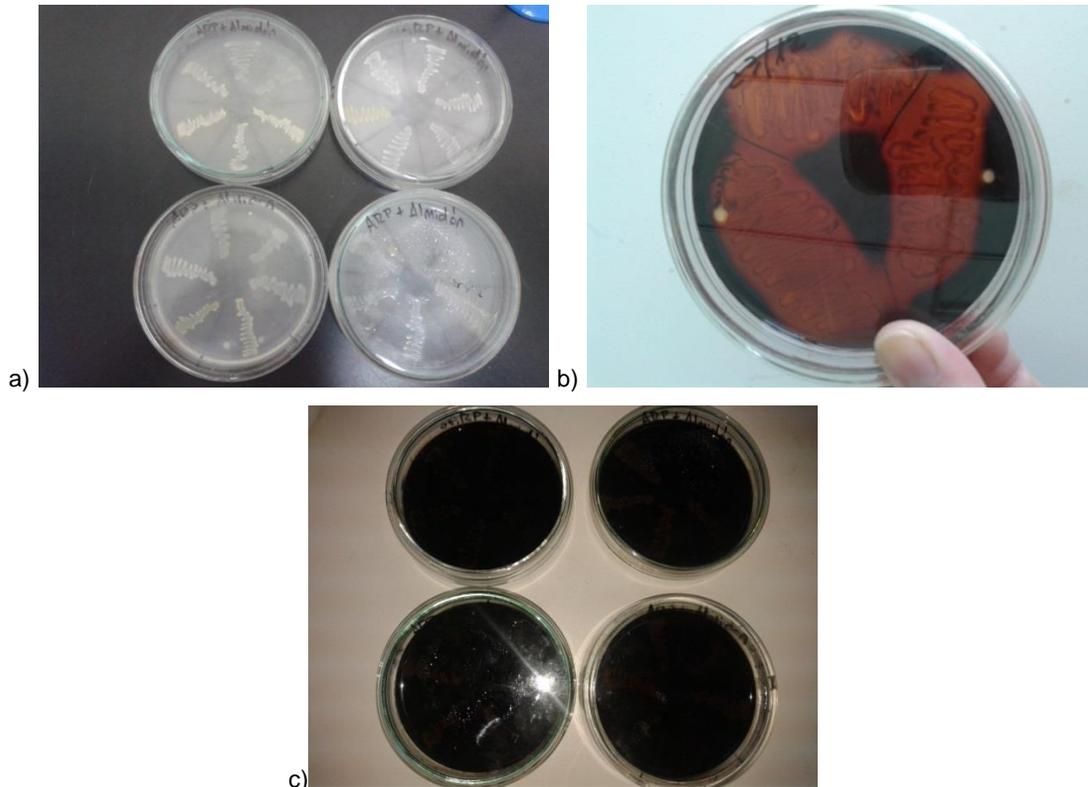


Figura 23: a) Crecimiento de las cepas en medio con almidón 1%. b) Prueba positiva. Nótese el halo de transparente alrededor de la colonia indicando hidrólisis del almidón. c) Prueba negativa.

El interés en evaluar la capacidad de degradación del almidón se debe a que éste es el polisacárido de reserva más abundante en los vegetales y que cabría la posibilidad de utilizar distintos desechos de la industria agrícola para enmendar suelos contaminados con hidrocarburos de las biopilas en futuras experiencias de biorremediación y favorecer así el desarrollo de los microorganismos degradadores. Los resultados obtenidos respecto de la degradación del almidón fueron negativos para todas las cepas ensayadas, por lo que se infiere que los

microorganismos aislados al estar adaptadas a sitios contaminados con hidrocarburos, tienen el mecanismo metabólico y enzimático para degradar otros hidrocarburos complejos, pero no poseen la enzima alfa - amilasa para la degradación de este polímero.

5.3.2.6 Cetrimide

El agar cetrimide es un medio de cultivo específico para poner en evidencia la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* y otras especies del género. Tiene en su composición “Bromuro de cetil-trimetil-amonio” (cetrimida), que inhibe notablemente la flora acompañante y permite que *Pseudomonas sp.* se desarrolle en el medio y produzca el pigmento piocianina que es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. La prueba de cetrimide se realizó a la totalidad de las cepas estudiadas. De las 25 cepas ensayadas se encontraron 8 cepas con crecimiento positivo en la Figura 24 muestra los resultados positivos para las cepas. Sin embargo en la prueba de cetrimide confirmatoria solo, se comprobó para la cepa Z8 la presencia de piocianina bajo luz U.V. por lo que se estaría en este caso frente a la presencia de *Pseudomonas sp.* El resto de las cepas positivas para la prueba y luego de la observación al microscopio, se confirmó que estaban contaminadas y si bien se intentó su aislamiento, este no fue posible por lo que se descartaron de análisis posteriores. Como testigo positivo se utilizó una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* y como testigo negativo una cepa *Proteus sp.* Este resultado favorable para la cepa Z8 caracterizándola como *Pseudomonas aeruginosa* fue prometedor ya que, esta especie es conocida por su excelente performance en la remediación de suelos contaminados por hidrocarburos (Liporace F. y col 2019). Por otra parte, la cepa Pa41, facilitada por la cátedra de Microbiología industrial, también evidenció crecimiento y fluorescencia, por lo que se clasificó dentro del mismo género que la cepa Z8.

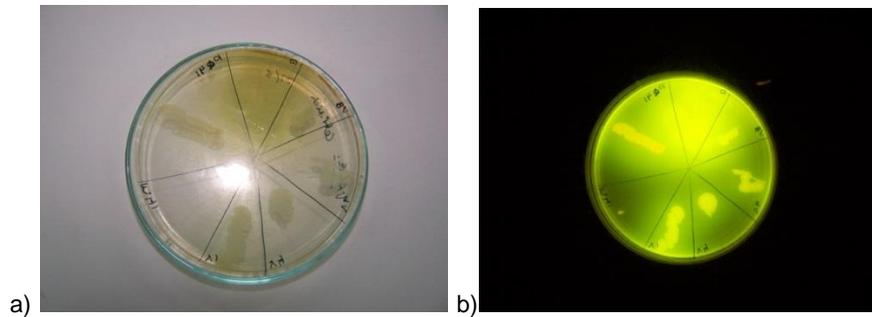


Figura 24: Prueba en medio cetrímide. a) Crecimiento de las cepas en el medio. b) Revelado bajo luz UV. Nótese la fosforescencia de la piocianina liberada al medio.

5.3.2.7 BAM

La prueba BAM (Buenos Aires Modificado) se realizó para poner de manifiesto varias características de los microorganismos en estudio, como son: producción de SH_2 , movilidad de la cepa, actividad de la enzima ureasa, degradación de lactosa y producción de indol.

5.3.2.7.1 Movilidad

Las pruebas para determinar movilidad dieron negativa para todas las cepas menos 2 correspondientes a Z8 y Pa41 las cuales evidencian movilidad por el crecimiento de la colonia por fuera de la línea de punción. En el caso de las cepas sin movilidad, el microorganismo debería tener a su alcance las fuentes de carbono, energía y nutrientes para poder utilizarlas. Esto se evidencia por el crecimiento por sobre de la línea de punción en los medios BAM.

5.3.2.7.2 Producción de SH_2

La producción de SH_2 en este caso arrojó resultados positivos para 9 de las cepas (36%) evidenciándose por el ennegrecimiento del papel de filtro impregnado en una solución de sales de plomo (Figura 25). La Figura 26 muestra el aspecto de los tubos con el resultado positivo para esta prueba.

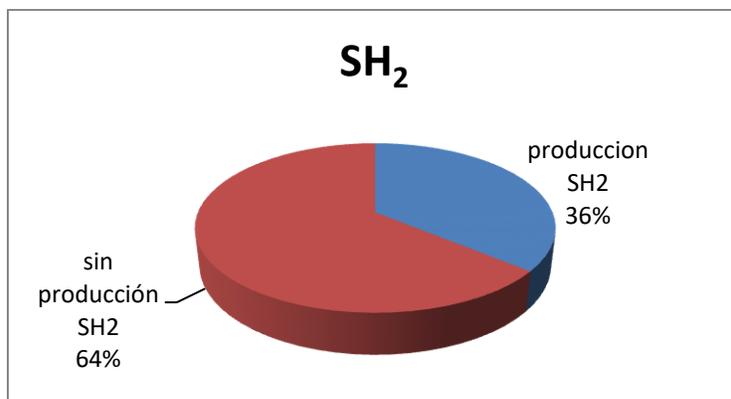


Figura 25: Resultados producción de SH₂ en el medio BAM.



Figura 26: Resultados de la producción de SH₂ y fermentación de lactosa en el medio Buenos Aires Modificado.

Si observamos los datos obtenidos en esta prueba para la actividad de la enzima ureasa, podemos ver que esta actividad se presenta en solo 8 cepas representando el 32% el total de cepas (Figura 27). La presencia de esta enzima permite que las bacterias puedan desdoblarse la urea y así utilizar el nitrógeno de dicho compuesto.

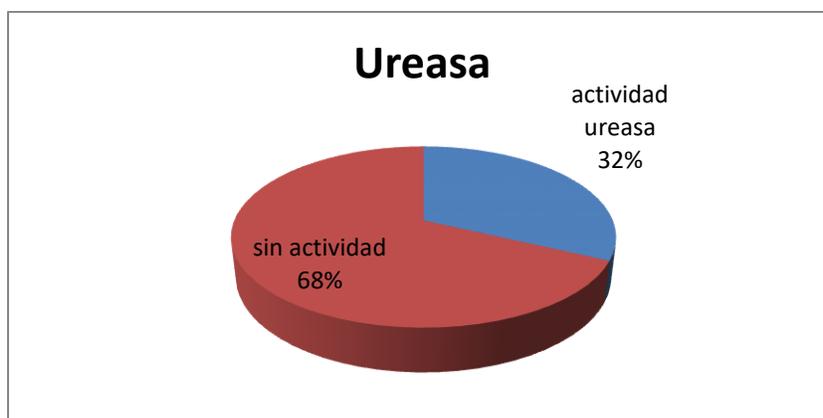


Figura 27: Resultados actividad ureasa en el medio BAM.

La fermentación de lactosa se puede ver también a través del BAM. Las bacterias que fermentan la lactosa acidifican el medio, produciendo un viraje al color anaranjado (Figura 26).

Este medio introduce una variante en la concentración de la lactosa, ya que es de 0,3% de manera que permite detectar la fermentación del carbohidrato simultáneamente con la producción de indol sin que la acidez afecte a la enzima triptofanasa.

Los resultados arrojados por la prueba demostraron que solo el 8% (2 cepas) son capaces de fermentar lactosa.

Otra de las características que se pueden manifestar a través de este medio múltiple es la producción de indol. El indol es un compuesto nitrogenado que se forma en la degradación del aminoácido triptófano. Esta reacción es realizada por varias bacterias y las enzimas involucradas reciben el nombre genérico de triptofanasas. Además de indol, también producen escatol que da las mismas reacciones que el indol pero no es volátil y ácido indolacético (Figura 28).

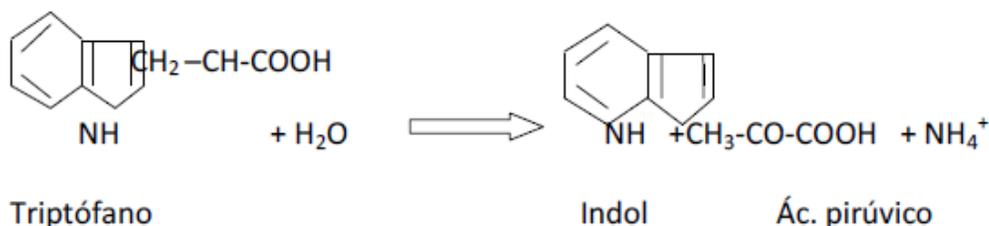


Figura 28: Degradación de triptófano en indol y ácido pirúvico a través de la enzima triptofanasa.



Figura 29: Revelado producción de indol. Tira de papel rosa: prueba positiva. Tira de papel incolora: resultado negativo.

Los resultados demostraron que las bacterias de este cepario no posee la enzima, por lo tanto no fueron capaces de degradar el triptofano (Figura 29).

La Figura 30 muestra los posibles resultados a esta prueba.

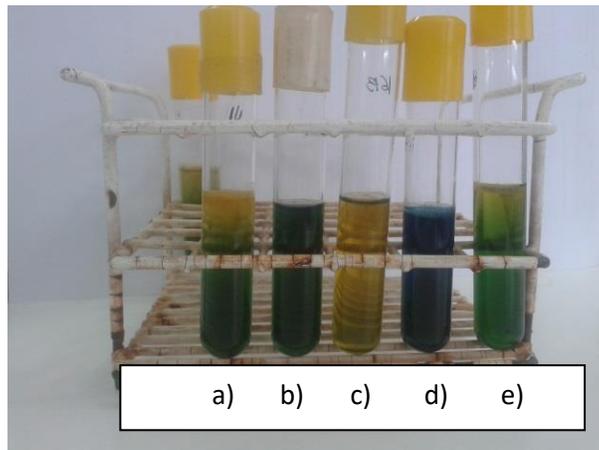


Figura 30: Resultados prueba Buenos Aires modificado. a) Fermentación de lactosa negativo, ureasa negativo. b), d) y e) Fermentación de lactosa negativo, ureasa positivo. c) Fermentación de lactosa positivo, ureasa negativo.

5.3.2.7.3 Producción de Indol

En cuanto a la prueba de indol, explicada anteriormente, esta también dio negativa en la totalidad del lote, por lo que no está presente la enzima triptofanasa para la degradación del triptófano. En la Figura 31 pueden corroborarse los resultados

obtenidos a partir de la prueba del BAM donde todas las cepas, respecto de la producción de indol dieron negativas.

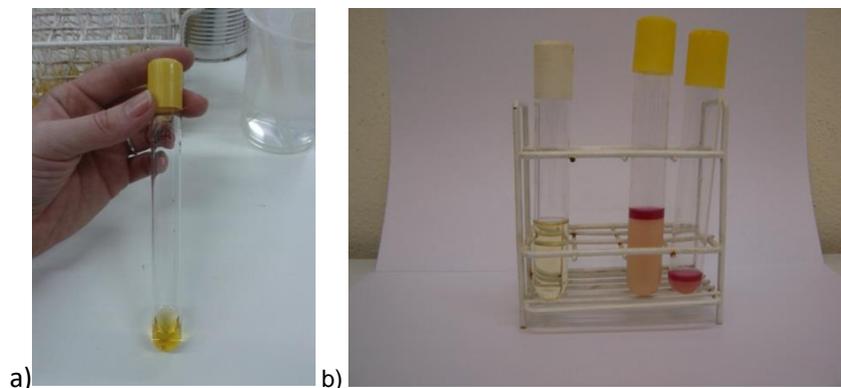


Figura 31: a) Prueba de indol para las cepas ensayadas. b) Izquierda: prueba negativa, derecha: prueba de indol +

5.3.2.8 MRVP (*reacción de rojo de metilo y Vogues Proskauer*)

Esta prueba constó de dos reacciones, la reacción del rojo de metilo (Figura 32) y la de Vogues Proskauer (Figura 33) La reacción de rojo de metilo se utilizó para determinar la capacidad de un microorganismo de formar productos ácidos a partir de la fermentación de la glucosa y mantenerlos, venciendo la capacidad amortiguadora del sistema. La reacción de Vogues Proskauer determinó la capacidad de un microorganismo de producir acetilmetilcarbilol como producto final de la fermentación de la glucosa. Los productos finales fueron compuestos neutros como el 2,3-butanodiol y el etanol, produciéndose además acetoína (acetilmetilcarbilol) como intermediario. En presencia de oxígeno atmosférico estos productos neutros se oxidaron a diacetilo que fue en definitiva el compuesto responsable de la reacción colorimétrica de reconocimiento.

En la prueba de MRVP la totalidad de las pruebas dio negativa denotando la incapacidad del microorganismo de producir productos ácidos a partir de la fermentación de la glucosa y mantener estables dichos productos modificando la capacidad amortiguadora del sistema y la incapacidad de producir acetimetilcarbinol como producto final de dicha fermentación.

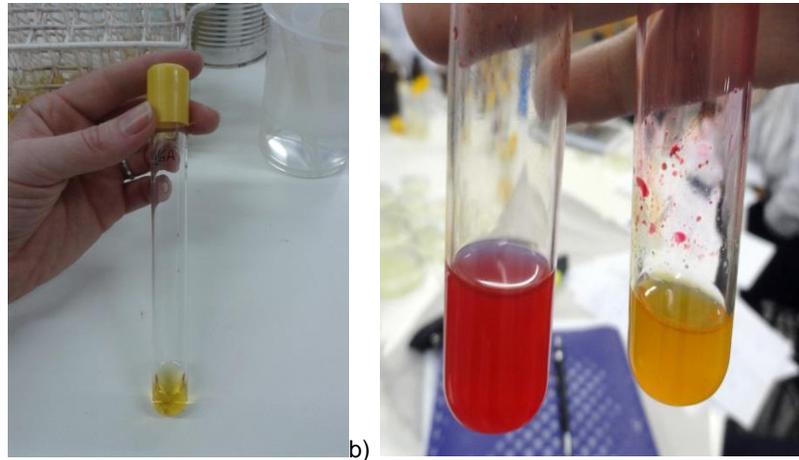


Figura 32: Reacción del rojo de metilo: a) Resultado de la prueba realizada para las cepas en estudio. b) Testigos positivo y negativo de la prueba

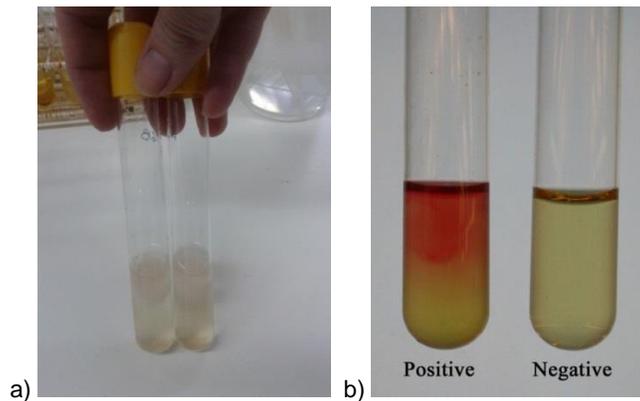


Figura 33: a) Resultado de la prueba Voges Proskauer para las cepas estudiadas. b) Reacción positiva y negativa para la prueba.

5.3.2.9 Hidrólisis de gelatina

La gelatina es una proteína que se obtiene por hidrólisis parcial del colágeno, que es un componente del tejido conectivo y tendones de los animales. Las enzimas capaces de hidrolizarla se denominan gelatinasas. Son exoenzimas secretadas por ciertas bacterias para poder desdoblar moléculas de proteínas, que por su tamaño no pueden entrar en la célula bacteriana. El catabolismo de las proteínas se cumple en 2 etapas y el resultado final es una mezcla de aminoácidos (Ecuaciones 1 y 2).



Luego de esta prueba los resultados obtenidos pueden observarse en la Figura 34. Las cepas que no pudieron degradar un medio con gelatina a través de la enzima gelatinasa correspondieron al 44% del cepario, mientras que las que tuvieron esa capacidad fueron el 56%.

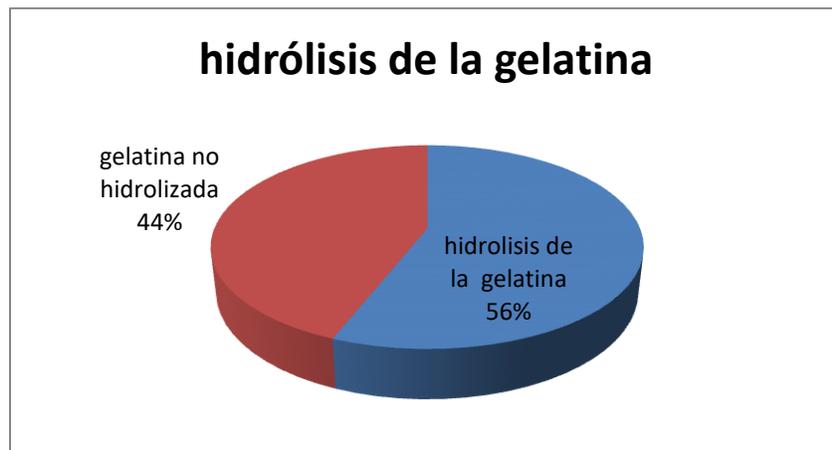


Figura 34: Resultados prueba de hidrólisis de la gelatina.

5.3.2.10 Citrato

Determina la capacidad de un microorganismo para utilizar el citrato como única fuente de carbono. En presencia de la enzima transportadora específica, la utilización de compuestos aniónicos del medio hacen a esta más alcalino debido a que se liberan cationes, como por ejemplo sodio que forman con el CO_2 sales muy alcalinas tales como Na_2CO_3 o NaHCO_3 .

Además de la enzima transportadora, las bacterias que emplean el citrato poseen la enzima citratasa o citrato desmolasa, que actúa originando los productos oxalacetato, acetato y piruvato.

Los medios usados son el medio citrato de Simmons y el medio citrato de Koser. En este caso se utilizó el medio citrato de Simmons el cual es un medio sólido que tiene como indicador azul de bromo timol. Si la prueba resulta positiva, se

manifiesta desarrollo de colonias en el medio y viraje del indicador al azul intenso como se muestra en la Figura 35.

Del total de cepas analizadas, el 62,5% arrojaron resultado positivo confirmando la utilización del citrato como única fuente de carbono, mientras que las restantes (9 cepas) dieron resultado negativo.



Figura 35: Resultados utilización de citrato.

Cepa	Almidón	OF	Citrato	TSI	MRVP		SH ₂	BAM			Indol	Gelatina	Oxidasa	Catalasa	Cetrimide	
					MR	VP		movilidad	Indol	Lactosa						Ureasa
Z8	-	Oxid.	+	Ferm. G, L y S	-	-	-	movil	-	-	-	-	+	+	+	+
Z33	-	Oxid.	-	Ferm. G.	-	-	-	No movil	-	-	-	-	+	-	+	-
H17	-	Oxid	-	Ferm G.	-	-	NR	No movil	-	-	+	-	+	+	+	+
H1	-	Oxid.	+	Ferm. G.	-	+	+	movil	dudoso	+	-	dudoso	+	-	+	-
Pa41	-	Oxid	+	Ferm. G	-	-	-	movil	-	-	-	-	+	+	+	+
H4	-	Oxid.	+	Ferm. G, L y S	-	-	-	No movil	-	-	+	-	-	+	+	-
H13	-	Oxid.	+	Ferm. G, L y S	-	-	+	No movil	-	-	-	-	-	+	+	+
H12	-	Oxid	-	Ferm. G, L y S	-	-	-	No movil	-	-	+	-	-	+	+	-
H9	-	oxid.	-	Ferm. G, L y S	-	-	+	No movil	-	-	-	-	+	-	+	-
H10	-	Oxid.	-	Ferm. G, L y S	-	-	+	No movil	-	-	-	-	-	+	+	-
H18	-	Oxid.	+	Ferm G.	-	-	NR	No movil	-	-	-	-	+	-	+	+
H19	-	Oxid.	+	No ferm. de az.	-	-	NR	No movil	-	-	+	-	+	-	+	+
H20	-	Ni f ni o	+	Ferm G.	-	-	NR	No movil	-	-	+	-	+	-	+	-
H6	-	Ni f ni o	-	Ferm. G	-	-	+	No movil	dudoso	-	-	dudoso	+	-	+	-
Z30	-	Ni f ni o	+	Ferm. G, L y S	-	+	-	No movil	-	-	-	-	-	-	+	-
H14	-	Ni f ni o	+	No ferm. de az.	-	-	+	No movil	-	-	-	-	+	-	+	+
H15	-	Ni f ni o	+	No ferm. De az.	-	-	+	No movil	-	-	-	-	+	+	+	-
H5	-	Ni f ni o.	+	Ferm. G, L y S	-	-	+	No movil	-	-	-	-	-	-	+	-
H8	-	Ni f ni o	-	Ferm. G, L y S	-	-	+	No movil	-	+	-	-	-	+	+	-
H11	-	Ferm.	+	Ferm. G, L y S	-	-	-	No movil	-	-	+	-	-	+	+	-
H3	-	Ferm.	+	Ferm. G, L y S	-	-	-	No movil	-	-	-	-	-	+	+	-
H2	-	Ferm.	-	Ferm. G, L y S	-	-	-	No movil	-	-	-	-	-	+	+	-
H7	-	Ferm.	-	Ferm. G, L y S	-	-	-	No movil	-	-	+	-	+	+	+	-

-	Negativo	Oxid.	Oxida	Ferm. G, L y S	Fermenta glucosa sacarosa y lactosa	movil	Móvil
+	Positivo	Ni f ni o	Ni fermenta ni oxida	Ferm G.	Fermenta glucosa	dudoso	Dudoso
		Ferm.	Fermenta	No ferm. de az.	No fermenta azucares	No movil	No móvil
NR	No Realizado						

Figura 36: Perfiles metabólicos del cepario analizado puestos de manifiesto por las pruebas bioquímicas realizadas.

En la Figura 36 se muestra un pool de bacterias contenidas en el cepario analizado a las que se les pudieron hacer la mayor cantidad de las pruebas bioquímicas que se detallaron anteriormente y se puede ver en ese cuadro los perfiles metabólicos que presenta cada una de ellas y como se van agrupando en relación a algunas características específicas por ejemplo su capacidad para oxidar o fermentar ciertos sustratos. Lamentablemente los perfiles completos de cada una de ellas no se repitieron en su totalidad como para poder organizar grupos de cepas. Por otra parte como las pruebas bioquímicas realizadas no coincidían exactamente con las mencionadas en los kits comerciales tampoco se pudo ingresar estos resultados a las bases de datos para lograr una identificación

de las especies presentes y si bien no era el objetivo primordial nos hubiera permitido conocer en parte la biodiversidad de los sitios muestreados. Por lo tanto a esta altura de los ensayos solo se pudo confirmar la presencia concreta de *Pseudomonas* una especie que es frecuentemente encontrada en sitios contaminados con hidrocarburos como se cita a continuación. Llanco Palomino y col. (2007) realizaron la identificación de bacterias degradadoras de petróleo en un ecosistema acuático impactado por actividad hidrocarburífera en el distrito de Callería, Provincia de Coronel Portillo, Región Ucayali. Luego del aislamiento y posterior identificación a través de pruebas bioquímicas realizadas lograron la identificación de 24 cepas de las cuales 58% pertenecía al género *Pseudomonas sp.* También se detectó la presencia de los géneros *Serratia sp.*, *Enterobacter sp.*, *Citrobacter sp.* y *Acinetobacter sp.* Esta última junto con *Pseudomonas* son muy utilizadas en programas de biorremediación de suelos. Asimismo, Guzman V. y col en 2016 estudiaron la flora microbiana en la ciudad de Santa Fe, específicamente en estaciones expendedoras de combustible y zonas aledañas detectando focos de contaminación por derrames de combustible tanto nafta como diesel como también grasas y aceites. Sus estudios a partir de pruebas bioquímicas demostraron la presencia de bacterias degradadoras de estos compuestos con predominancia del género *Pseudomonas* en un 96% de los aislados y otros géneros como *Bacillus sp.*, especie reportada también como eficiente consumidora de hidrocarburos contaminantes de suelos. Quiliche-Duran y col (2016) hicieron lo propio en suelos pertenecientes a talleres mecánicos en la ciudad de Lima, Perú. En este caso se buscó identificar, a partir de pruebas bioquímicas *Pseudomonas aeruginosa* específicamente. Los resultados arrojados en esta experiencia demuestran la presencia de esta especie incluso en este tipo de sitios que recibe contaminantes de todo tipo de hidrocarburos. La identificación de las especies en estos trabajos se basaron en pruebas bioquímicas, que si bien, son determinaciones menos exactas que las identificaciones realizadas por técnicas moleculares, dan una primera aproximación del pool de especies presentes en suelos contaminados con potencial para llevar adelante una posterior biorremediación.

5.3.3 Ensayo para determinar capacidad hidrocarburofítica sobre diferentes hidrocarburos.

Para determinar la capacidad hidrocarburofítica de las cepas seleccionadas en el cepario frente a diferentes hidrocarburos, se llevó a cabo una prueba más específica según la técnica descrita en materiales y métodos, sección 5.2.4. Cabe consignar que, como se explicó, todas las cepas fueron aisladas de un ambiente contaminado con hidrocarburos y llevadas a un medio de enriquecimiento con kerosene. Sin embargo la selección posterior (etapa de aislamiento) se llevó a cabo en un medio sólido más rico, como es el medio LB, el cual permite el crecimiento de una amplia variedad de bacterias y por lo tanto pudieron haberse desarrollado algunas especies que, por las condiciones adversas de su ambiente de origen, se encontraban en estado de latencia y frente al medio más propicio pudieron crecer y tal vez no son degradadoras de los contaminantes sino que constituyen una flora asociada que puede subsistir en el ambiente natural a expensas de metabolitos excretados por el resto de los microorganismos de ese nicho ecológico. Por lo tanto se realizó esta prueba adicional para evaluar la capacidad hidrocarburofítica frente a distintos hidrocarburos presentes en el petróleo crudo, como los de estructura cíclica y también algunos alifáticos ya refinados y utilizados comercialmente como el gasoil y el kerosene para poner en evidencia aquellas cepas con capacidad hidrocarburofítica y descartar del cepario el resto.

Los hidrocarburos utilizados en esta etapa fueron antraceno, bifenilo, gasoil, kerosene y naftaleno cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura 37.

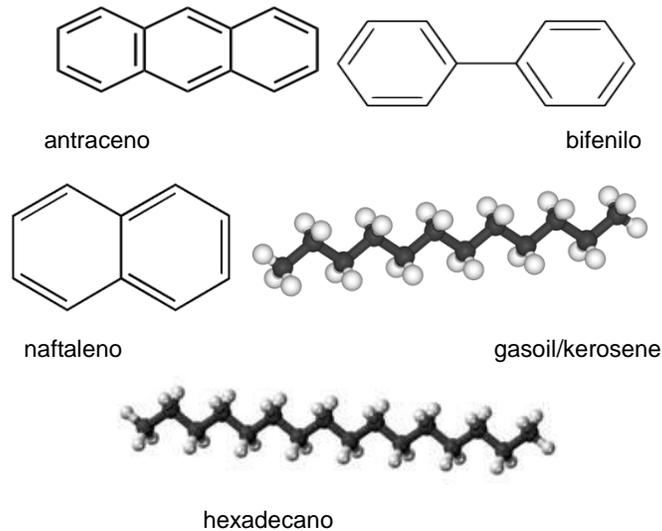


Figura 37: Estructura química de los hidrocarburos utilizados para las pruebas de capacidad hidrocarburofíticas y de emulsificación de las cepas estudiadas.

A continuación se describen brevemente los compuestos testeados de acuerdo a sus características fisicoquímicas y su toxicidad.

El bifenilo (difenilo, fenilbenceno o 1,1'-bifenilo) es un hidrocarburo aromático con una fórmula molecular $C_{12}H_{10}$. Es conocido por ser un producto inicial en la producción de bifenilos policlorados (PCB) y es utilizado ampliamente como fluido dieléctrico y agente de transferencia de calor, como intermediario para la producción de otros compuestos orgánicos como emulsificantes, iluminadores ópticos, productos insecticidas y plásticos (Alvarez, J. 2017).

El antraceno es un hidrocarburo aromático policíclico. Su solubilidad en agua es de 0,00013 gr/100 ml (ICSC: 0825 de la OMS) y se disuelve bien en benceno caliente. Se descompone al calentarla intensamente, en contacto con la luz solar o bajo la influencia de oxidantes fuertes, produciendo humos tóxicos pudiendo causar incendios o explosiones. Su fórmula química es $C_{14}H_{10}$. La molécula de antraceno está formada por tres anillos aromáticos en el que el anillo central es más fácilmente oxidable o reducible, debido a la acción de los dos átomos centrales que conservan dos anillos fenílicos con su sistema aromático intacto.

Puede ser una sustancia peligrosa para el medio ambiente. En la cadena alimentaria puede haber bioacumulación, concretamente en organismos acuáticos

y plantas (<http://www.prtr-es.es/Antraceno,15648,11,2007.html>) En el medio acuático es muy tóxico. (Nava Solis, G. 2017)

El diesel, también denominado gasoil, es una mezcla de hidrocarburos compuesto fundamentalmente por parafinas, su número de átomos de carbono varía desde 14 a 18 y su gravedad API esta por encima de 40°C. Es un líquido blancuzco o verdoso con densidad de 0,850 g/cm³ y utilizado principalmente como combustibles (motores diesel de camiones de carga, autos, autobuses, embarcaciones y otros tipos de maquinaria) y en calefacción. Su poder calorífico es de 8800 kcal/kg. Tiene un punto de ebullición que se encuentra entre 250°C - 325°C. Como ventaja de su uso esta su bajo precio frente a combustibles de tipo nafta y es capaz de suministrar energía suficiente para mover grandes maquinarias por su gran valor energético. Químicamente, a medida que aumenta su cadena carbonada, disminuye su volatilidad. No presenta grupos funcionales polares como carbonilos, carboxilos o amidas en su estructura. Son compuestos organicos de poca reactividad que pertenecen a la familia de los alcanos de cadena lineal cada uno con propiedades físicas y químicas diferentes. (Gomez Oviedo, A. 2012)

El kerosene químicamente pertenece a la misma familia que el gasoil (mezcla de hidrocarburos compuesto fundamentalmente por parafinas) (<https://www.empresascarbone.com/pdf>). Tiene entre 14 y 18 átomos de carbono. Es un líquido incoloro levemente amarillo, inflamable que se obtiene de la destilación del petróleo natural. Tiene un punto de inflamación mínimo de 38°C y una temperatura de autoignición de alrededor de 257°C. La presión de vapor es menor que 6,9 Kpa (1 [psi]) y su densidad es de 0,80 [kg/l] (15°C) y es insoluble en agua. (<https://www.javeriana.edu.co/documents>)

Se usa como combustible para calefactores, cocinas económicas y heladeras de campo. Su balanceada composición química y poder calorífico aseguran una excelente combustión (más limpia), lo cual reduce la formación de depósitos y, como consecuencia directa, prolonga la vida útil de los sistemas de combustible (<https://edicion.ypf.com/productosyservicios/Descargas/Kerosene.pdf>).

El naftaleno pertenece al grupo de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Son compuestos bencenoides condensados se caracterizan por tener dos o más anillos bencénicos fusionados o superpuestos en posiciones orto, de modo tal que cada par de anillos comparte dos carbonos. Es un hidrocarburo sólido cristalino incoloro, con punto de fusión 80 °C, que sublima fácilmente y se aísla en cantidad a partir del alquitrán de hulla. Es una clase importante de contaminante o xenobióticos que persiste en suelos, sedimentos y material particulado suspendido en el aire. Es liposoluble y se forma como productos de la combustión del petróleo y residuos del procesamiento del carbón. Puede decirse que son contaminantes ubicuos, derivados de la utilización del petróleo y del carbón, y sus consecuencias en el ambiente son nocivas, ya que tienen propiedades tóxicas, mutagénicas o cancerígenas. Su efecto cancerígeno y liposolubilidad implican que estas sustancias representan un riesgo para la salud humana y para el equilibrio ecológico. (Pila, M. y col. 2020)

El hexadecano (antiguamente también denominado cetano) es un hidrocarburo de la familia de los alcanos (sin anillos ni enlaces múltiples) cuya fórmula química es $C_{16}H_{34}$. Su estructura consiste en una cadena lineal de 16 átomos de carbono.

En los ensayos realizados para detectar el crecimiento bacteriano en presencia de estos hidrocarburos, se utilizó la solución salina Bushnell y Hass (BH) cuya composición se encuentra detallada en el Anexo 1.1 y se adicionó a la preparación, un indicador de óxido reducción llamado resazurina ($C_{12}H_7NO_4$) que es un colorante azul, débilmente fluorescente y que se reduce de forma irreversible a un compuesto fluorescente y de color rosa (resazurina). La Figura 38 muestra el mecanismo de reducción de la resazurina. Esta molécula se reduce a resofurina a expensas de la oxidación de NADPH o NADH en presencia de las enzimas NADPH-deshidrogenasa o NADH-deshidrogenasa. Por lo tanto, este indicador se puede utilizar para detectar cualquier actividad bioquímica o enzima que esté implicada en reacciones metabólicas de generación de NADH o NADPH, que son muy comunes y están presentes cuando los cultivos celulares están activos.

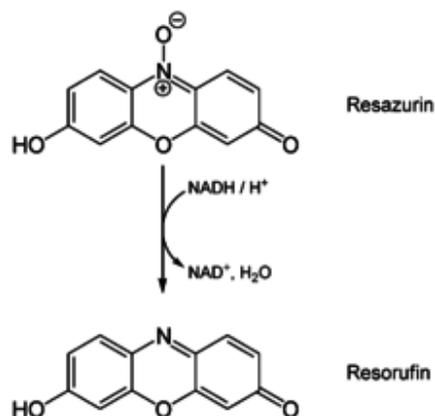


Figura 38: Reacción de reducción de la resazurina.

La Figura 39 se muestran el comportamiento de las cepas al crecer en el medio BH con resazurina. En la Figura 39a se muestran los resultados negativos y en la Figura 39b el resultado positivo. En la Figura 39c se muestra la gama de colores que se va dando en tubos con resultado final positivo desde el momento de su inoculación hasta los 21 días al finalizar la prueba. Algunos tubos pueden quedar con un viraje parcial del indicador, que se denomina prueba débil ya que puede deberse a una degradación parcial del hidrocarburo por oxidación del mismo.

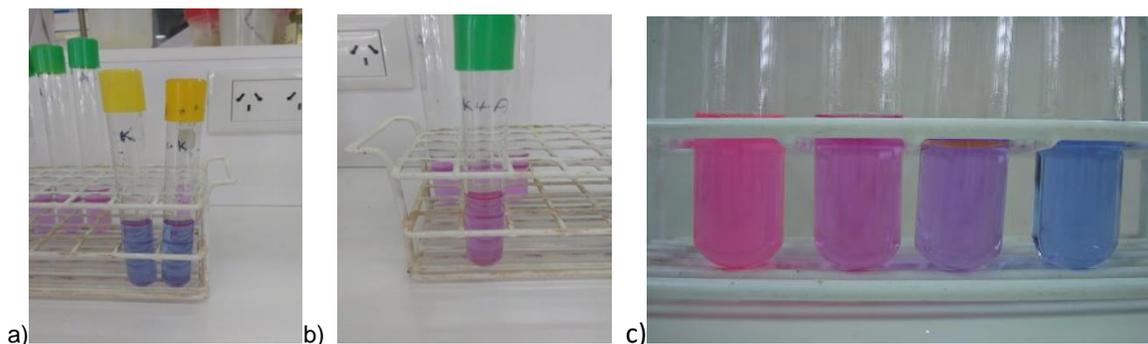


Figura 39: Capacidad hidrocarburofítica. a) Resultado prueba negativa. b) Resultado prueba positiva. Nótese el viraje del indicador rezarsurina de azul a rosa. c) Gama de color del indicador. Los dos tubos centrales muestran un cambio parcial del indicador, lo que se traduce como un resultado débil.

Es entonces que, para conocer la capacidad hidrocarburofítica frente a diferentes hidrocarburos, se llevó a cabo un ensayo descrito en la sección 5.2.3 *Ensayo para determinar capacidad hidrocarburofítica sobre diferentes hidrocarburos*. En

este ensayo se probó la capacidad de las cepas de utilizar los compuestos descriptos como fuente de carbono.

En la Tabla IV se presentan los resultados obtenidos cuando se evaluaron las capacidades hidrocarburolicas de las cepas asiladas del sitio Zapala. Los ensayos se realizaron por triplicado, obteniendo siempre los mismos resultados. Solo se informan 27 de las 36 cepas originales porque algunas especies que no crecieron en las placas de Petri luego de la conservación en frío y se perdieron.

Tabla IV: Comportamiento de las cepas del sitio Zapala frente a diferentes hidrocarburos.

Cepa	Kerosene	Antraceno	Bifenilo	Gasoil	Naftaleno
Z1	-	+	-	+	-
Z2	+	-	-	+	-
Z3	+	-	-	+	-
Z4	-	+	-	+	-
Z5	-	-	-	+	-
Z6	-	+	-	+	-
Z7	+	-	-	-	-
Z8	-	+	-	+	-
Z9	-	-	-	-	-
Z10	-	-	-	-	-
Z11	+	-	-	-	-
Z15	-	-	-	-	-
Z16	+	+	-	+	-
Z18	+	-	-	+	-
Z20	-	-	-	-	-
Z21	-	-	-	+	-
Z22	+	-	-	-	-
Z23	-	+	-	+	-
Z24	-	-	-	-	-
Z26	+	-	-	+	-
Z30	+	+	-	+	-
Z31	+	-	+	-	-
Z32	+	-	-	-	-
Z33	+	-	+	+	-
Z34	+	-	-	-	-
Z35	-	-	-	+	-
Z36	+	-	-	+	-

Referencias: +) viraje de color de la resazurina de azul a rosa. -) sin viraje de indicador. +d) viraje parcial del indicador.

Las cepas que más hidrocarburos degradaron son Z16, Z30 y Z33. Estos resultados indican que las cepas mencionadas son potencialmente aptas para procesos de biorremediación ya que no solo degradan el kerosene y el gasoil sino también degradan antraceno o bifenilo que son hidrocarburos cíclicos más recalcitrantes debido a su alta persistencia y su baja degradabilidad (Dominguez, M. 2017). Mayoritariamente, el resto de las cepas mostró capacidad para degradar kerosene y gasoil siendo que estos hidrocarburos contienen mayormente en su composición química compuestos alifáticos más fácilmente degradables. Los hidrocarburos naftaleno, antraceno y bifenilo son hidrocarburos aromáticos policíclicos, cuya estructura química es muy estable. Las cepas Z1, Z4, Z6, Z8, Z16 y Z23 pueden degradar el antraceno y las cepas Z31 y Z33 pueden degradar bifenilo. En el caso del naftaleno ninguna de las cepas ha podido utilizarlo. Las cepas Z9, Z10, Z15, Z20 y Z24 no son capaces de degradar ningún hidrocarburo. Resultado que se corresponde con la prueba anterior. Estas últimas cepas fueron descartadas de posteriores análisis ya que no cumplían con las características deseadas para este trabajo.

Las cepas aisladas del sitio Huincul se trabajaron de manera análoga al grupo de Zapala y los resultados se encuentran tabulados en la Tabla V.

Tabla V: Comportamiento de las cepas del sitio Huincul frente a diferentes hidrocarburos.

Cepa	Kerosene	Antraceno	Bifenilo	Gasoil	Naftaleno
H1	+	+	+	+	-
H2	+	+d	-	+	-
H3	+	-	-	+d	-
H4	+	+	+	+	-
H5	+	+	+d	+	-
H6	+	+	+	+	-
H7	+d	+d	+d	+	-
H8	+	+	+	+	-
H9	+	+	+	+	-
H10	+d	+	+	+	-
H11	+	+d	+d	+	-
H12	+d	+	+	+	-
H13	+d	+d	-	+	-
H14	+	+	+d	+	-
H15	+d	+	-	+	-

H16	+d	+	+	+	-
H17	+	+d	+d	+	-
H18	+d	+	-	+	-
H19	+	+	+d	+	-
H20	+	+	+	+	-

Referencias: +) viraje de color de la resazurina de azul a rosa. -) sin viraje de indicador. +d) viraje parcial del indicador.

Puede apreciarse una excelente performance de las cepas H1, H4, H6, H8, H9 y H20. H12 y H14 si bien son muy buenas en general, dieron débil la pruebas para kerosene la cepa H12 y para bifenilo la cepa H14.

El resto de las cepas fueron buenas degradadoras para 2 o 3 de los hidrocarburos y la generalidad del grupo degradó muy bien el gasoil.

Comparando el grupo Huincul con el grupo Zapala, ambos no fueron capaces de degradar naftaleno pero si antraceno.

Las diferencias observadas en la biodegradación del naftaleno y antraceno podrían ser atribuidas a las diferencias en la estructura de los compuestos aromáticos policíclicos testeados o en su biodisponibilidad de estos compuestos en el medio acuoso. Sin embargo esta reportado en bibliografía que los hidrocarburos con menos de 10 átomos de carbono o con tres o menos anillos aromáticos tienden a ser fáciles de degradar, mientras que prácticamente todos los HAP con menos de 5 anillos son al menos parcialmente biodegradables por una variedad de microorganismos tanto aerobios como anaerobios. (Riojas González, H. y col. 2010). A su vez, teniendo en cuenta la solubilidad de estos compuestos, el naftaleno tiene una solubilidad en agua de 31 mg/L siendo esta mayor que la del el antraceno, siendo este de es 0,045 mg/L. (Cortes Miranda, P. 2015) favoreciéndose así la biodisponibilidad del naftaleno frente al antraceno en contradicción de los resultados experimentales obtenidos Por ello, la no degradación del naftaleno en esta prueba no puede ser explicada en función de los parámetros químicos mencionados ni por las diferencias en sus estructuras moleculares. Es probable que dichas diferencias radiquen en las reacciones metabólicas, la actividad enzimática y los mecanismos de acción utilizados para la degradación por las diferentes especies bacterianas presentes que no fueron

abordadas en el desarrollo de esta tesis y que deberían constituirse como línea de investigación a futuro.

La Tabla VI muestra los resultados obtenidos resumidos para la prueba anterior.

Tabla VI: Capacidad degradativa de las cepas al gasoil, kerosene, antraceno, bifenilo y naftaleno.

Cepas	Cant. Total de cepas hidroc.	Hidrocarburos				
		Gasoil	Kerosene	Antraceno	Bifenilo	Naftaleno
Sitio Zapala	27	16 (59,2%)	14 (51,8%)	7 (25,9%)	2 (7,4%)	0 (0%)
Sitio Huincul	20	20 (100%)	20 (100%)	19 (98%)	15 (75%)	0 (0%)
Total (%)	100	76,6	72,3	55,3	36,1	0

En la Tabla VI se observa que en el sitio Zapala el número de cepas hidrocarburofíticas aisladas fue mayor que el sitio Huincul sin embargo, esas cepas presentaron menor eficiencia para degradar simultáneamente diferentes hidrocarburos, habiendo cepas que no degradaron o tuvieron dificultad con los compuestos alifáticos pero degradaron sustancias más complejas. Este comportamiento podría asociarse a que el sitio Zapala es considerado un pasivo ambiental donde la actividad petrolera aconteció hace muchos años y probablemente la calidad de los hidrocarburos remanentes corresponden a fracciones más pesadas y recalcitrantes del petróleo como se apreciaba en las muestras de suelo y agua extraídas en el campo. En el caso del sitio Huincul, las muestras provenían de pilas activas donde se estaba llevando a cabo un proceso de biodegradación y los microorganismos estaban en contacto con fracciones más livianas de petróleo con gran cantidad de componentes alifáticos como lo muestran los análisis de hidrocarburos realizados sobre esos suelos mostrados en el anexo 8.

Teniendo en cuenta el metabolismo microbiano, la degradación de los hidrocarburos dependerá de la biodisponibilidad de estos para ser utilizado por la célula. Por ello, aquellas moléculas más simples, lineales de tipo alifáticas de corta o mediana longitud y sin muchas ramificaciones cuyas uniones entre átomos se encuentran saturadas, resultan ser las más fácilmente degradadas por lo tanto son las primeras moléculas en ser utilizadas, mientras que aquellas con estructura aromática son más difíciles. Las moléculas de tipo alifáticas son incorporadas al lumen celular y oxidadas por las enzimas celulares a compuestos secundarios, que son utilizados para la generación de energía y la consecuente producción de biomasa, pero la acumulación de estos compuestos intermedios dentro de la célula puede causar toxicidad a la misma rompiendo estructuras celulares (Cecotti, M. y col. 2015).

Los compuestos aromáticos, en cambio, son degradados afuera de la célula por enzimas extracelulares debido a que por su alto peso molecular no pueden ser ingresados a la célula para su mineralización. Por la complejidad de la molécula y su tamaño, suelen ser los que se degradan con mayor dificultad y en una segunda instancia (Jiménez Hernández, V. 2018).

Del total de cepas ensayadas se seleccionaron las mejores de acuerdo a su capacidad de utilizar más de 2 hidrocarburos. Se eligieron las cepas Z8, Z30, H1, H4, H6, H8, H9, H17 y H20 para pruebas posteriores.

Se incorporó en este punto una cepa conocida de *Pseudomonas sp.* facilitada por la cátedra de Microbiología Industrial de Fain – UNCo. Esta especie es conocida y reportada en la bibliografía repetidamente por sus capacidades respecto a la remediación de suelos contaminados especialmente por petróleo (Zhao F. y col. 2018, García González y col; 2019, De La Rosa Martinez, D., 2020).

5.3.4 Pruebas de hidrofobicidad

La prueba de hidrofobicidad es una técnica que permitió observar la adherencia o afinidad de ciertas bacterias a los hidrocarburos. Se midió la absorbancia de una suspensión celular luego de ponerla en contacto con diferentes hidrocarburos. Teóricamente, a mayor valor de absorbancia, mayor cantidad de células en la

suspensión. La técnica se describe con detalle en la sección 5.1 *Prueba de hidrofobicidad*. La no adherencia al hidrocarburo se tradujo en un valor de absorbancia de 0 el cual correspondió al 100% de las células que se mantuvieron en la suspensión del buffer. A medida que el valor de absorbancia disminuyó, significó que las células se adhirieron más al hidrocarburo migrando al mismo y formando una emulsión.

Los hidrocarburos testeados fueron gasoil, kerosene y hexadecano (Figura 37) los ensayos se realizaron por duplicado y los volúmenes utilizados fueron de 0,025 0,05 0,1 y 0,2 ml. Se utilizó *Escherichia coli* como testigo negativo ante su incapacidad de adherencia a cualquier hidrocarburo según esta reportado en la bibliografía. (Rosemberg, M. y col. 1980; Rosemberg, M. 2006)

Se muestran a continuación (Figura 40) los resultados arrojados luego de aplicada la técnica para las cepas H1, H6, Pa41 y Z8 cuyos valores de emulsificación han sido mayores que el resto de las cepas, por los que se las seleccionó para continuar con las siguientes etapas.

En todos los casos puede verse que a medida que aumenta el volumen del hidrocarburo, mayor es la adherencia de los microorganismos a ellos.

En la Figura 40a se muestran los resultados de hidrofobicidad para el kerosene puede apreciarse un comportamiento muy bueno de la cepa H6 respecto de la emulsificación de este, obteniéndose valores de 15% de absorbancia lo que indicaría una muy alta afinidad de la cepa por este hidrocarburo. Además, esto podría indicar que no solo tiene la capacidad de adherirse al kerosene, sino también tiene una alta capacidad de degradarlo como se comprueba en el ensayo de determinación de capacidad hidrocarburofítica frente a distintos hidrocarburos. El resto de las cepas se distribuye en el gráfico con mayores valores de absorbancia por encima del 50% siendo del 60% para el caso de Pa41; 70% para Z8 y 91% para H1. Si bien son valores superiores, estas cepas son buenas hidrocarburofíticas por lo que muestra el ensayo frente a distintos hidrocarburos, por lo tanto el mecanismo de degradación en estas cepas podría ser diferente a la cepa H6. Frente al kerosene H6 fue la más eficiente

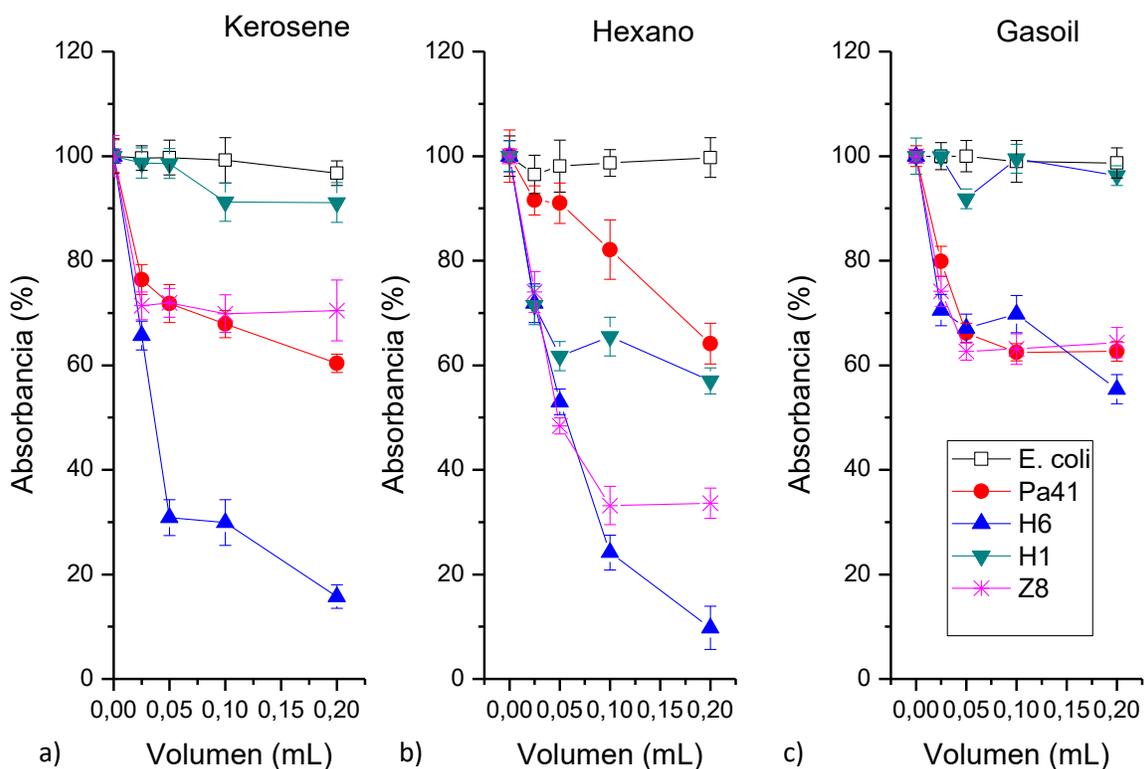


Figura 40: Pruebas de emulsificación para las cepas elegidas. a) Emulsificación para kerosene. b) Emulsificación para hexadecano. c) Emulsificación para gasoil.

En la Figura 40b) muestra los resultados para la emulsificación del hexadecano. Nuevamente la cepa H6 se destacó por sobre las demás con valores de absorbancia del 9,8% siendo mucho más bajo que el valor para el kerosene, por lo que tendría más afinidad por este hidrocarburo. Los valores para la cepa Pa41 son muy similares al kerosene (64%), para la cepa H1 el porcentaje obtenido fue del 57,0% mostrando una mayor emulsificación que para el kerosene y para la cepa Z8 los valores fueron del 33%, también más bajo que para el kerosene.

En la Figura 40c se muestran los resultados de la técnica, en este caso, para el gasoil. Nuevamente la cepa H6 muestra los mejores valores con un porcentaje de absorbancia del 55%. Los valores para las demás cepas fueron superiores al 50% siendo 62% para Pa41; 64% para Z8 y 96% para H1.

En general la cepa H6 mostró los valores más bajos de absorbancia, lo que demuestra una alta adherencia al hidrocarburo sobre todo al hexadecano. La cepa Pa41 no muestra valores muy diferentes para los tres hidrocarburos, son valores

por arriba del 50% pero considerados medios (entre 60 y 64%) y tiene una mayor afinidad hacia el kerosene. La cepa H1 y Z8 son las que mostraron una mayor variabilidad en los datos. La cepa H1 tuvo mayor afinidad por hexadecano (57%) mientras que el resto de los valores rondaron el 90% de absorbancia, y la cepa Z8 mostro mejores resultados sobre hexadecano (33%) y valores del 60 – 70% aproximadamente para el resto de los hidrocarburos.

Los mejores valores para adherencia que se obtuvieron, fueron de las cepas en presencia de hexadecano. Esto puede deberse a que el hexadecano utilizado es una droga pura, no siendo así en el caso del gasoil y el kerosene que eran productos comerciales y cuyos aditivos podrían interferir en la actividad bacteriana.

Respecto a este último punto, considerando solo los hidrocarburos comerciales y comparando los valores de hidrofobicidad, la cepa H6 es afin a ambos hidrocarburos (gasoil y kerosene), la cepa Z8 presenta valores altos de adherencia al gasoil y la cepa Pa41 sobre kerosene, los que las vuelve de interés para remediaciones a campo con derrames con estos combustibles ya que se adaptarían muy bien pese a los aditivos que estos poseen.

Estas 4 especies fueron finalmente elegidas para la etapa posterior de ensayos en microcosmos luego de analizar los datos recolectados de degradación de distintos hidrocarburos y de emulsificación.

La cepa Pa41, si bien tuvo valores mas bajos de adherencia a los hidrocarburos y no degrada todos, se la incluyo en este grupo ya que pertenece al género *Pseudomonas sp.*, el cual es reportada ampliamente en sitios contaminados con hidrocarburos y se la utiliza para procesos de biorremediación (Guzman V. 2016; Quiliche Duran, J. y col. 2016; Llanco Palomino, R. y col. 2020).

5.4 Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para esta sección se puede decir que:

- ✚ Se analizó la morfología y las características fisiológicas de bacterias aisladas (36 cepas provenientes del sitio Zapala y 20 cepas del sitio

Huincul) mediante la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Si bien el mayor porcentaje de individuos compartieron las características fisiológicas correspondientes a bacterias degradadoras de hidrocarburos no se pudo establecer grupos diferenciados en especies debido a que la cantidad de pruebas realizadas no permitió realizar esa discriminación.

- ✚ Se corroboró la capacidad hidrocarburofítica del 100% de las cepas provenientes del sitio Huincul analizadas anteriormente. Mientras que el ensayo para las cepas provenientes del sitio Zapala determinó que solo el 61% de las cepas inicialmente aisladas presentaron capacidad hidrocarburofítica. Adicionalmente se discriminó el tipo de hidrocarburo (kerosene, gasoil, antraceno bifenilo, naftaleno) que podrían ser utilizados por cada cepa.
- ✚ Se destaca la presencia de cepas del género *Pseudomonas sp.* en base a los resultados obtenidos de la prueba en medio Cetrimide, especie reportada ampliamente como excelente degradadora de hidrocarburos.
- ✚ La variedad y proporción de hidrocarburos degradados por el cepario del sitio Huincul fue mayor que por el cepario del sitio Zapala posiblemente asociado a las características de los residuos de petróleo encontrados en cada sitio estudiado. No obstante, en ningún caso las cepas pudieron utilizar el naftaleno como fuente de carbono.
- ✚ De acuerdo a las características evaluadas en la presente sección, se seleccionaron las cepas H1, H6, Pa41 y Z8 para ser utilizadas en las etapas siguientes de identificación molecular y ensayos de biorremediación en microcosmos. Estas cepas presentaron mayor capacidad hidrocarburofítica frente a diferentes hidrocarburos y mayor afinidad y adherencia a los mismos.

CAPITULO 6: CARACTERIZACION
MOLECULAR DE LAS CEPAS
SELECCIONADAS POR SU MEJOR
CAPACIDAD HIDROCARBUROLITICA

6.1 Caracterización molecular de las cepas hidrocarburolíficas seleccionadas

La identificación de las especies es importante ya que conociendo su identidad y en particular la presencia de determinado gen asociado a una determinada ruta metabólica pueden predecirse sus capacidades metabólicas así como la posibilidad de adaptación en consorcios diseñados para la degradación de hidrocarburos en suelos.

Las técnicas de identificación molecular en bacterias mediante el análisis del gen que codifica para el ARNr 16s u otros genes mencionados se basan en la amplificación de la región de una parte del genoma que se desea estudiar y en la secuenciación de esos genes o sus fragmentos (Díaz Montoya, D. 2020). El medio de cultivo o las condiciones de incubación no serán factores determinantes, pero si serán factores críticos la técnica de extracción del ADN cromosómico y la amplificación.

A continuación se describen las etapas metodológicas a considerar en la identificación molecular. Las técnicas detalladas se podrán ver en el Anexo 5.

6.1.1 Extracción y purificación de ADN

El primer paso de la caracterización molecular consistió en obtener un pellet celular a partir de alícuotas provenientes de un cultivo sólido o líquido en fase exponencial de crecimiento (eZNA soil ADN kit D5625-02). Seguidamente, se procedió a la ruptura de la pared celular por métodos mecánicos para liberar el ADN de los microorganismos que conformaban el pellet. Por último, fue necesario llevar a cabo un proceso de purificación del ADN, ya que el material genético es muy frágil y debe ser inmediatamente estabilizado y acondicionado para evitar su degradación y garantizar su preservación. Por lo tanto, los procesos de extracción, purificación y almacenamiento del ADN debieron mantener el pH óptimo y brindar una alta concentración iónica para asegurar el éxito de las etapas posteriores (Anexo 5.1 y 5.2).

6.1.2 Amplificación del gen que codifica para 16S-RNA y Electroforesis en gel de agarosa

El gen de interés fue amplificado mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y obtener millones o miles de millones de copias de ese gen. Para ello, se utilizó un cebador que garantizó la obtención de la secuencia deseada y las múltiples copias fueron posteriormente separadas por tamaño mediante una electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN_r 16S fueron visualizados con luz ultravioleta porque durante el procedimiento se utilizó un colorante fluorescente, el bromuro de etidio, que tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas del ADN (Anexo 5.2).

6.1.3 Clonación y secuenciación de los fragmentos de ADN_r 16S de las cepas hidrocarburolíticas puras

Luego de extraído y amplificado el gen de ADN_r 16S, se procedió a su clonación utilizando un cultivo de células de *E. coli* DH5 α competentes y un plásmido como vector de clonación un plásmido provisto por un producto comercial denominado pGEM[®] T-Easy Vector systems de marca Promega. Para comprobar que la clonación fue exitosa se recurrió a la expresión de la enzima β -galactosidasa y finalmente se seleccionaron esas colonias, se las propagó en un medio rico tipo agar recuento en placa y se las acondicionó para el envío al laboratorio MacroGen (<http://foreign.macrogen.com/eng/>) para su secuenciación. A partir de la información enviada por los secuenciadores (electroforama y secuencias en FASTA) se construye la secuencia consenso y se las analizó mediante el algoritmo BLAST comparando con la base de datos del GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Con toda esa información y usando los programas que se detallan en el Anexo 5.6.2 *Análisis de la secuencia* se construyeron los árboles filogenéticos y se trató de determinar género y especie cuando la información lo permitió.

El procedimiento resumido se muestra en la Figura 41.

Extracción y Secuenciación de ADN

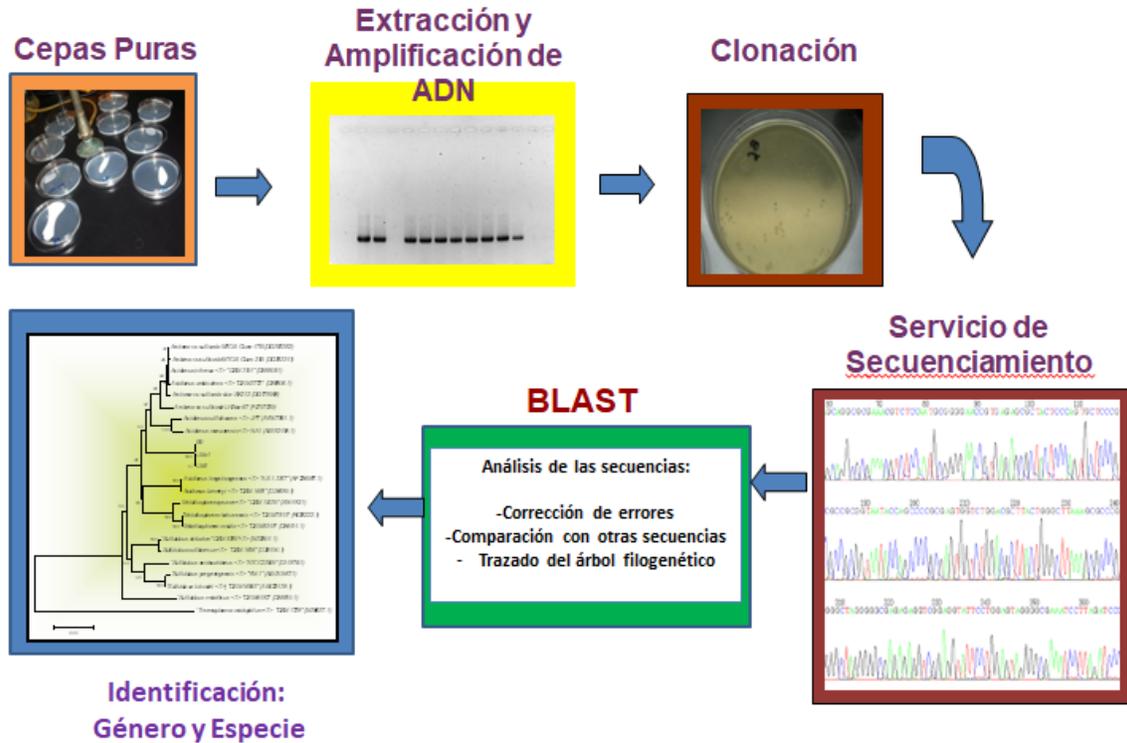


Figura 41: Etapas del proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADN, 16S.

6.2 Crecimiento en medio salino para diferenciar entre especies bacterianas

El crecimiento en medio salino se utilizó para la diferenciación entre las especies de *Microbacterium sp.* y de *Brevibacterium sp.* Esta prueba se basó en la capacidad de *Brevibacterium sp.* de crecer en medios con altos tenores de NaCl (ver técnica en anexo 5.6).

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Caracterización molecular de las cepas hidrocarburofílicas seleccionadas

Para conocer la identidad de las cepas seleccionadas se realizó una extracción de ADN e introducción de los plásmidos en células de *E. coli*, y posterior clonación según se indica en el anexo 5. Luego las muestras fueron enviadas a Corea para ser analizadas mediante el servicio de extracción de ADN y secuenciación que

brinda la empresa MacroGen (<http://foreign.macrogen.com/eng/>). Se realizó la secuenciación del gen ARNr 16S, previa extracción y amplificación del gen mediante cebadores específicos. Las secuencias forward y reverse obtenida fue recibida en formato .ab1. Mediante el software UGENE (versión 1.26) los archivos fueron procesados y se obtuvieron las secuencias consenso las cuales fueron comparada, para su identificación, con la base de datos nucleotídica del GenBank, mediante el uso del algoritmo bioinformático de BLAST. Luego, se realizó un árbol filogenético, basado en el análisis de secuencias del gen ARNr 16S. Las secuencias fueron analizadas para determinar la distancia evolutiva entre ellas, mediante el modelo de dos parámetros de Kimura (1980) y la matriz de distancias así obtenida fue usada para construir el árbol con el método de Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987). La robustez del árbol fue evaluada con un análisis de bootstrap utilizando 1000 repeticiones. La identificación resultante fue la siguiente:

Tabla VII: Resultados identificación molecular cepas incognita

Cepa	Taxón	% de identidad	% de cobertura
Pa41	<i>Pseudomonas putida</i>	99	100
Z8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99	100
H1	<i>Microbacterium sp./ Brevibacterium sp.</i>	96	100
H6	<i>Microbacterium sp./ Brevibacterium sp.</i>	96	100

La cepa Pa41 se identificó con la especie *Pseudomonas putida* y la cepa Z8 con la especie *Pseudomonas aeruginosa*. Se confirma con los resultados de pruebas bioquímicas, en particular con la prueba de cetrimida, dado que ambas cepas dieron positivo no solo para crecimiento sino también con la liberación al medio del pigmento. Esto se condice con lo observado en las pruebas de hidrofobicidad donde se comprobó había un comportamiento diferencial frente a los diferentes hidrocarburos.

Si se observa el siguiente árbol filogenético del género *Pseudomonas sp.* (Figura 42), se puede ver que *P. parafulva* se encuentra en el mismo nodo que las

secuencias identificadas como 13 y 14 (las cuales son respectivamente las cepas Pa41 y Z8) y el porcentaje de identificación luego de la secuenciación fue del 99% para ambos casos. Este porcentaje no es suficiente como para determinar de forma exacta las especies, además, como ya se vio en las pruebas bioquímicas realizadas en este trabajo, estas cepas producen un pigmento verde y fosforescente característica propia de las especies *P. putida* y *P. aeruginosa*, mientras que *P. parafulva* produce un pigmento amarillo y no fosforescente como se encuentra reportado en Peña, A. y col. 2016. Estas evidencias podrían estar indicando la presencia de especies nuevas en los aislados.

Ante este resultado y a efectos de continuar con los ensayos, se decidió nombrar a las cepas con los nombres preestablecidos y realizar pruebas de identificación en futuras instancias.

Las tablas VII y VIII muestran las características obtenidas luego de las pruebas bioquímicas a las cepas Z8 y Pa41 y lo reportado por la bibliografía para las especies *P. aeruginosa* y *P. putida*.

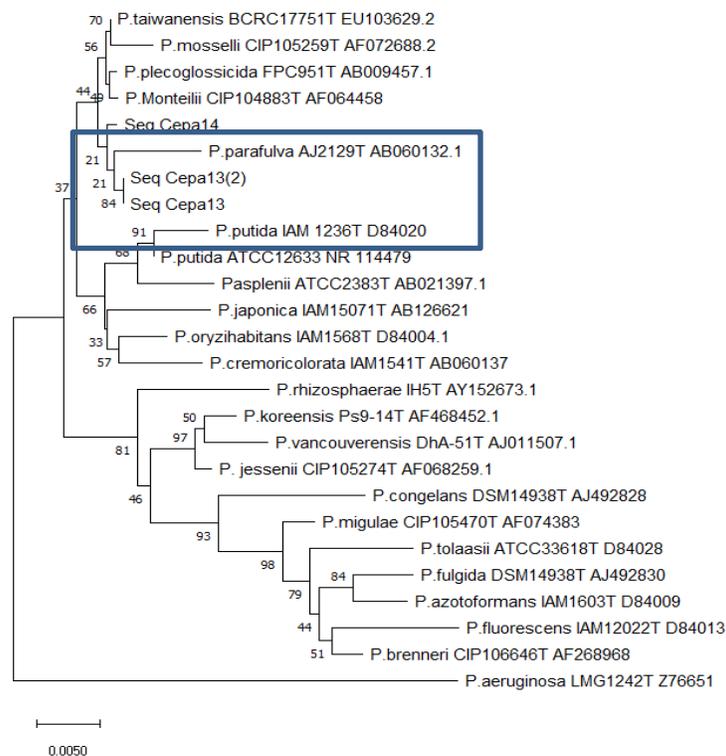


Figura 42: Árbol filogenético de las especies de *Pseudomonas* aisladas en el presente trabajo. Las cepas nombradas como 13 y 14 corresponden a las cepas Pa41 y Z8 respectivamente.

Tabla VIII: Resultados pruebas bioquímicas realizadas a Pa41 e información recolectada en bibliografía para *P. putida*. Los datos presentados en la tabla pretenden comparar los datos obtenidos experimentalmente con los disponibles en bibliografía, por ello los ítems de la tabla no coinciden en número con capítulos anteriores. (https://issuu.com/rubenantonio5/docs/revista_microbiologia_pruebas_bioqu)

Cepa	Pa41	<i>Pseudomonas putida</i>
Colonia	color crema, lisa, brillante, de borde continuo	circular, brillante, de color crema, de borde regular
Gram	bacilos Gram -	bacilos Gram -
oxidasa	+	+
Catalasa	+	+
Citrato	+	+
Rojo metilo	-	-
Almidón	-	-
Fermentación lactosa	-	-
Actividad ureasa	-	-
Producción SH₂	-	-
Movilidad	móvil	móvil
OF	oxidación	oxidación
Indol	-	-
Gelatina	-	-
Cetrimide	+	+

Tabla IX: Resultados pruebas bioquímicas realizadas a Z8 e información recolectada en bibliografía para *P. aeruginosa*. Los datos presentados en la tabla pretenden comparar los datos obtenidos experimentalmente con los disponibles en bibliografía, por ello los ítems de la tabla no coinciden en número con capítulos anteriores. (https://issuu.com/rubenantonio5/docs/revista_microbiologia_pruebas_bioqu).

Cepa	Z8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Colonia	circular, brillante, de color crema, de borde regular	circular, brillante, de color crema, de borde regular
Gram	bacilos Gram -	bacilos Gram -
oxidasa	+	+
Catalasa	+	+
Citrato	+	+
Rojo metilo	-	-
Almidón	-	-
Fermentación lactosa	-	-
Actividad ureasa	-	-
Producción SH ₂	-	-
Movilidad	móvil	móvil
OF	oxidación	oxidación
Indol	-	-
Gelatina	+	+
Cetrimide	+	+

En el caso de las cepas H1 y H6, los resultados obtenidos a partir de la secuenciación y comparación en la base de datos internacional GenBank dieron como resultado un 96% de coincidencia con dos géneros bacterianos como se indicó mas arriba. En ambos casos los géneros posibles para estas cepas son ***Brevibacterium sp.*** y ***Microbacterium sp.*** Para resolver este problema se realizó una búsqueda bibliográfica para encontrar pruebas bioquímicas que permitan diferenciar algunas características metabólicas que se relacionen con la fisiología de alguna de los dos géneros y permita su diferenciación.

6.4 Crecimiento en medio salino para diferenciación entre *Brevibacterium sp.* y *Microbacterium sp.*

Según reporta Mounier J. 2007, una prueba de laboratorio capaz de diferenciar las especies H1 y H6 es el crecimiento en medio salino. Una de las diferencias entre los géneros *Microbacterium sp.* y *Brevibacterium sp.* es su crecimiento en medios con diferentes concentraciones de sales. Se realizó entonces la siembra en medio salino según la técnica descrita en el anexo 5.6 *Crecimiento en medio salino*.

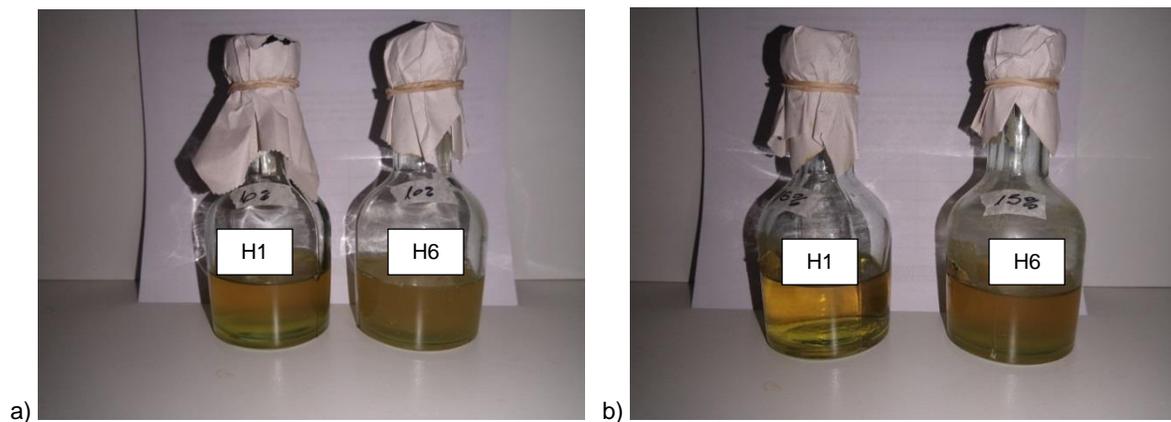


Figura 43: Crecimiento de las cepas H1 y H6 en medio salino. a) Con 10% de NaCl. b) Con 15% de NaCl.

En la Figura 43a se puede ver que con una concentración de 10 % de NaCl hay turbidez y por lo tanto hubo crecimiento celular en ambos frascos. En la Figura 43b en el frasco con la cepa H1, no se evidencia ninguna turbidez, mientras que en el frasco de la cepa H6 sí.

Se comprobó entonces, a través de esta prueba, la presencia de dos cepas diferentes. La cepa H1 corresponde al género *Microbacterium sp.*, mientras que la cepa H6, por crecer en un amplio rango de porcentajes de NaCl en el medio, correspondería al género *Brevibacterium sp.*

Esta reportado que, en general, en alta salinidad, la biodegradación de hidrocarburos es reducida debido a la menor diversidad microbiana y la baja solubilidad de los hidrocarburos y oxígeno, sin embargo, se han logrado aislar varios generos halófilos entre ellos *Brevibacterium*. (Valeriano-Zapana, J. y Gonzales-Limache, E. 2016).

De acuerdo a los datos reportados por Mounier J. 2007, las especies de *Brevibacterium sp.* son resistentes a altas concentraciones de NaCl la cual sería capaz de crecer con altos porcentajes de NaCl (entre 2 y 15%) no así el género *Microbacterium sp.* que soporta una salinidad solo del 5% de NaCl.

Brevibacterium sp. es considerado el mayor componente de la microflora que crece en la superficie de quesos (Mounier J. 2007). Este género aparece en la superficie de los mismos luego del salado del cuajo y la maduración del queso y actualmente se lo utiliza como fermento secundario en la elaboración de quesos madurados (Pulgar Morelo, M. 2001).

Brevibacterium sp. ha sido aislado de ambientes diversos como leche, derivados lácteos y peces marinos y en la superficie de quesos madurados como Limburger, Brick, Camembert, Roquefort y otros (Pulgar Morelo, M. 2001). También ha sido reportada en aislamientos de bacterias de suelos contaminados con petróleo (Maposita, M. y col. 2011). Distintas especies de este género han sido aisladas de ambientes con petróleo *B. casei* ha sido aislada a partir de suelo contaminado, *B. célere* a partir de algas marinas, *B. ammoniilyticum* de un sistema de tratamiento de aguas residuales, todas ellas con capacidad degradativa frente al petróleo (Valeriano-Zapana, J., Gonzales-Limache, E. 2016).

Microbacterium sp., se encuentra también en ambientes variados tanto terrestres como acuáticos. Está presente en la rizósfera y la filósfera de las plantas. En la rizósfera puede estar formando parte de los nódulos fijadores de nitrógeno de algunas especies y en la filósfera puede estar presente dentro de los tejidos de las plantas (Alves, A. y col. 2014). Algunas especies pueden ser patógenas tanto para animales como para el ser humano (Rakhashiya, P. y col. 2015). También ha sido reportada, pero no con frecuencia, como especie degradadora de hidrocarburos y es utilizada en programas de biorremediación de suelos ya que es capaz, junto con las demás especies presentadas en este trabajo, de degradar hidrocarburos (alcanos y compuestos petroquímicos aromáticos) de manera parcial (Figueroa Suazo, C. 2017). También se ha podido aislar *Microbacterium sp.* en ambientes marinos y se ha demostrado que produce un bioemulsificante polimérico de naturaleza no iónica, con actividad emulsificante contra una gran variedad de

sustratos, y una atractiva propiedad emulsificante en petróleo y sus derivados como el aceite para motores (Camacho Chab, J. y col. 2009).

En la Figura 44 se presenta el árbol filogenético para el orden Actinomycetes donde puede observarse la distancia que existe entre las 2 especies analizadas siendo ésta muy corta con lo cual es factible que al estar tan emparentadas, los resultados no sean concluyentes respecto a su identidad ya que los fragmentos analizados eran fragmentos de gen de ADNr 16S y no el gen completo que hubiera, tal vez, ofrecido una mayor aproximación en la determinación del género. Se corrió nuevamente el programa Blast para corroborar las diferencias entre ambas cepas y se obtuvieron los arboles filogenéticos que se muestran a continuación (las cepas incógnita se encuentran encuadradas en azul):

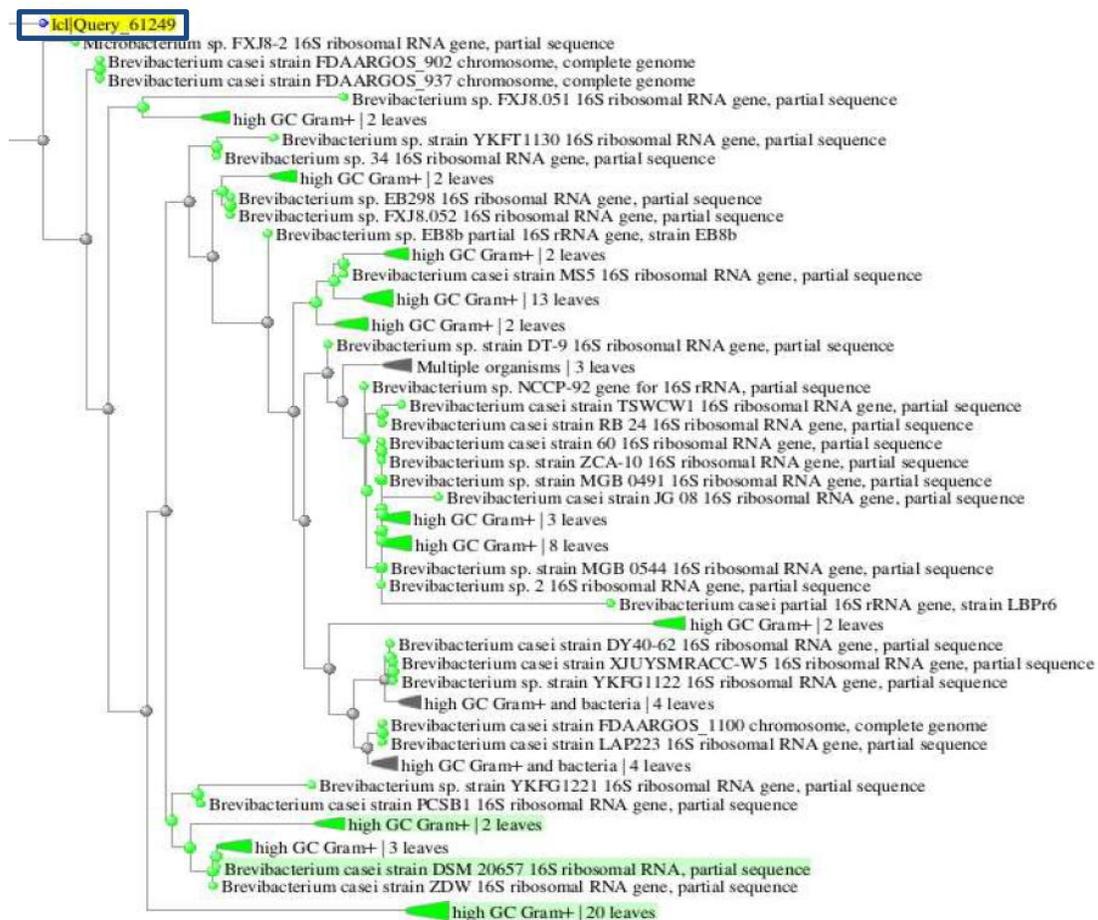


Figura 44: Árbol filogenético para la cepa H1 correspondiente a *Microbacterium* sp. aisladas en el presente trabajo. La nomenclatura de la cepa H1 utilizada al momento de la identificación se encuentra enmarcada en azul.

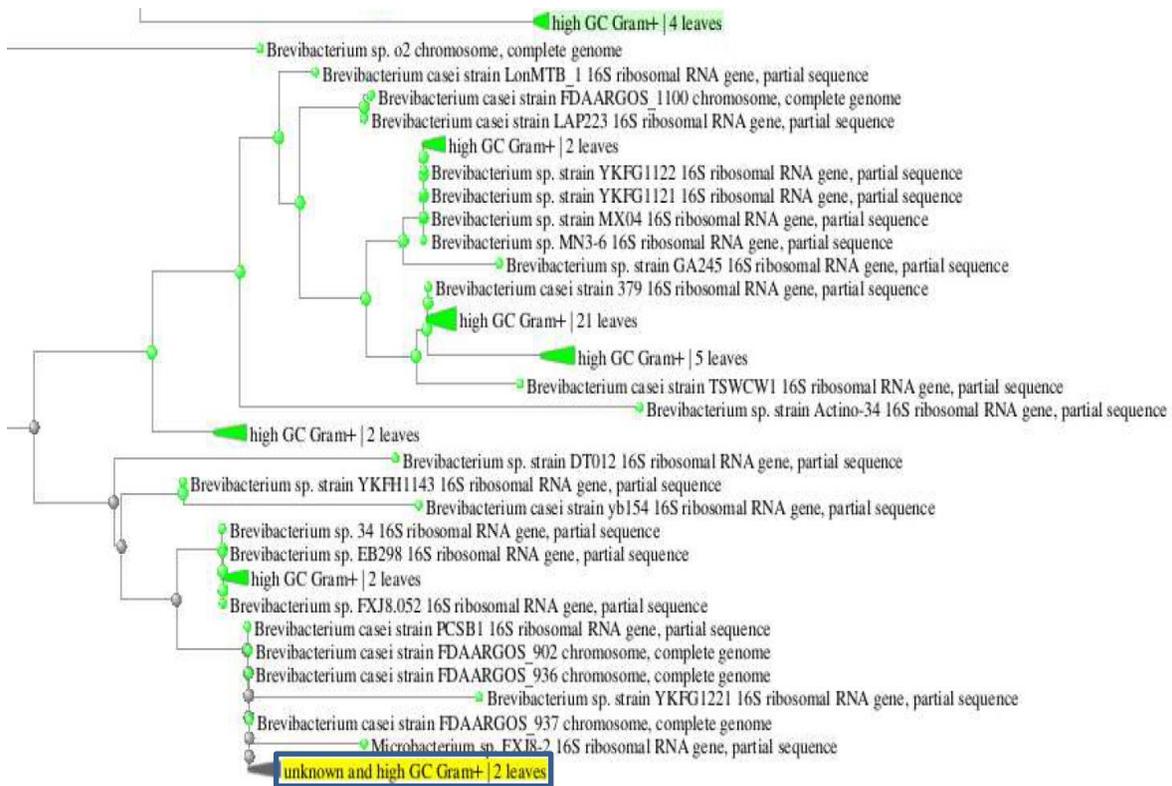


Figura 45: Árbol filogenético para la cepa H6 correspondiente a *Brevibacterium sp.* aisladas en el presente trabajo. La nomenclatura de la cepa H6 utilizada al momento de la identificación se encuentra enmarcada en azul.

En este caso, los Blast obtenidos no eran concluyentes ya que en ambas cepas había una concordancia del 96% tanto para el género *Microbacterium* como el género *Brevibacterium*, y ambos géneros están muy cerca entre si filogenéticamente hablando como se muestra en la Figura 46. Por ello, además de esta prueba, se realizó una comparación entre los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas comparadas con las reportadas en bibliografía (Pulgar Morelo, M. 2001, Mounier J. 2007, Rakhshiya, P. y col. 2015) corroborando y confirmando así su identidad. Los datos fueron recopilados en las Tablas IX y X.

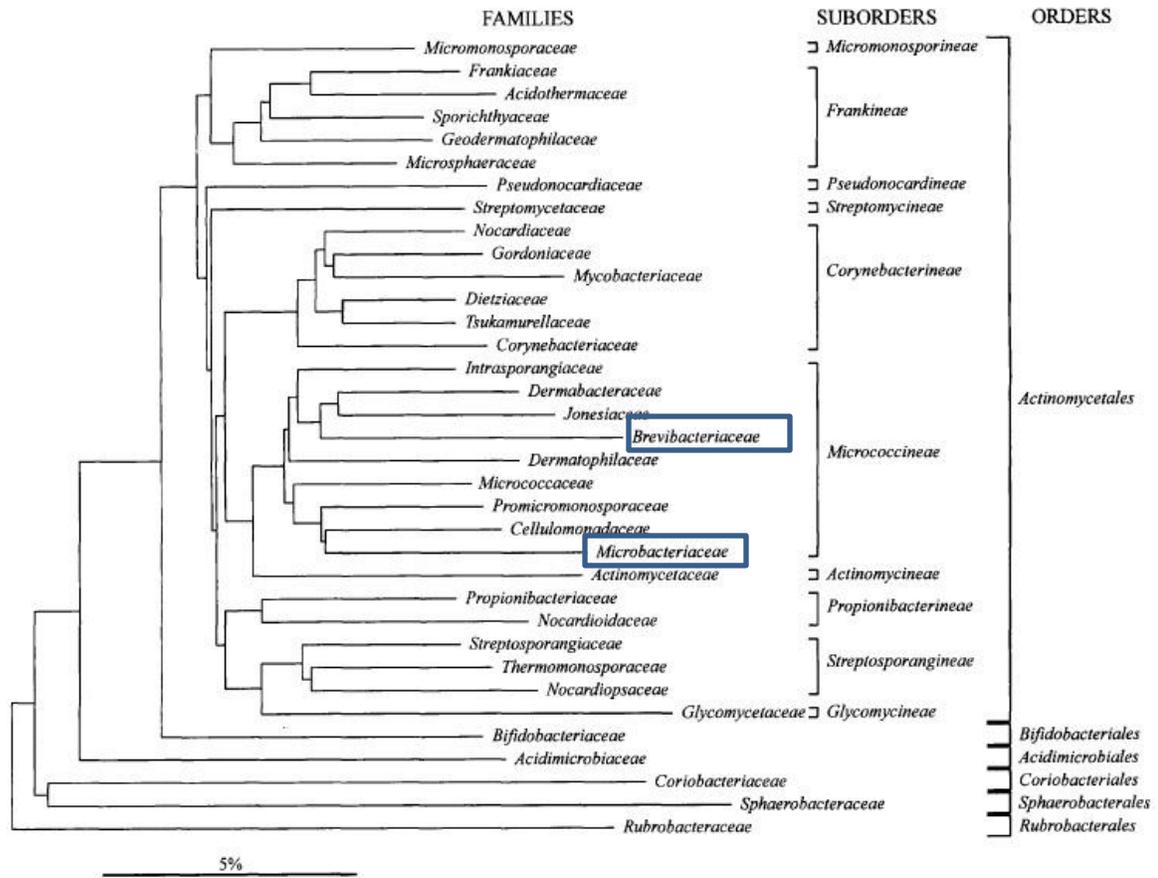


Figura 46: Arbol filogenético para el orden Actinomycetales y sus subórdenes. Fuente: https://actinobacteriasblog.wordpress.com/inicio_actinobacterias/arbol-filogenetico/

Tabla X: Resultados pruebas bioquímicas realizadas e información recolectada en bibliografía para *Microbacterium sp.* Los datos presentados en la tabla pretenden comparar los datos obtenidos experimentalmente con los disponibles en bibliografía, por ello los ítems de la tabla no coinciden en número con capítulos anteriores. (Pulgar Morelo, M. 2001).

Cepa	H1	<i>Microbacterium sp.</i>
Colonia	circular, brillante, convexa de bordes lisos, color amarillento	colonias de colores amarillos naranjas
Gram	bacilos Gram +	bacilos Gram +
oxidasa	-	-
Catalasa	+	+
Citrato	+	-
Almidón	-	-
Fermentación lactosa	+	+
Actividad ureasa	-	-
Movilidad	móvil	Móvil o no
OF	oxidación	oxidación
Indol	dudoso	dudoso
Gelatina	+	+
Cetrimide	-	-

Tabla XI: Resultados pruebas bioquímicas realizadas a H6 e información recolectada en bibliografía para *Brevibacterium sp.* Los datos presentados en la tabla pretenden comparar los datos obtenidos experimentalmente con los disponibles en bibliografía, por ello los ítems de la tabla no coinciden en número con capítulos anteriores. (Pulgar Morelo, M. 2001)

Cepa	H6	<i>Brevibacterium sp.</i>
Colonia	circular, brillante, convexa de bordes lisos, color crema	bacilo, coco grande
Gram	cocos Gram +	Gram -
Catalasa	+	+
Citrato	-	+
Actividad ureasa	-	-
OF	Ni fermentación ni oxidación	oxidación
Indol	dudoso	dudoso
Gelatina	+	+
Cetrimide	-	-

Como queda reflejado en las tablas, todas las pruebas bioquímicas concuerdan a excepción de las pruebas de citrato y producción de indol para *Microbacterium sp.* y OF y citrato para *Brevibacterium sp.* Esto puede deberse a que los datos que se pudieron recolectar de la bibliografía corresponden solo a los géneros (Pulgar Morelo, M. 2001, Mounier J. 2007, Rakhshiya, P. y col 2015). Entre estos y las especies, pueden haber diferencias.

6.5 Conclusiones

- ✚ Se logró la identificación molecular de las cuatro cepas seleccionadas en el capítulo 5 para continuar con los ensayos de biorremediación. A partir de los resultados obtenidos se encontraron las siguientes especies: *Pseudomonas aeruginosa* (Z8), *P. putida* (Pa41), *Microbacterium sp.* (H1) y *Brevibacterium sp.* (H6) las cuales habían mostrado capacidad de utilizar diferentes hidrocarburos.
- ✚ A modo de resumen sobre las características de cada cepa se presenta la tabla XI donde se muestran los datos obtenidos de las pruebas bioquímicas para las cepas seleccionadas, la tabla XII donde se muestra la degradación de distintos hidrocarburos y la tabla XIII donde se detallan los resultados para la prueba de emulsificación.

Tabla XII: Pruebas bioquímicas para las especies seleccionadas.

Cepa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Z8)	<i>Microbacterium</i> sp. (H1)	<i>Brevibacterium</i> sp. H(6)	<i>Pseudomonas putida</i> (Pa41)
Oxidasa	+	-	-	+
catalasa	+	+	+	+
TSI	fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa	fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa	fermentación de glucosa	fermentación de glucosa
citrato	+	+	-	+
rojo metilo	-	+	-	-
almidón	-	-	-	-
ferm. lactosa	-	+	-	-
act. ureasa	-	-	-	-
prod. SH ₂	-	+	+	-
movilidad	Móvil	móvil	no móvil	móvil
OF	oxidación	oxidación	ni oxidación ni fermentación	oxidación
Prod. indol	sin actividad triptofanasa	dudoso	dudoso	sin actividad triptofanasa
gelatina	+	+	+	+
cetrimide	+	-	-	+

Tabla XIII: Resultado prueba de hidrocarburos de las cepas seleccionadas.

Cepa	Kerosene	Antraceno	Bifenilo	Gasoil	Naftaleno
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Z8)	-	+	-	+	-
<i>Microbacterium</i> sp. (H1)	+	+	+	+	-
<i>Brevibacterium</i> sp. H(6)	+	+	+	+	-

Tabla XIV: Resultados de las pruebas de emulsificación para las cepas seleccionadas.

Cepa	% de absorbancia (hidrofobicidad)		
	Kerosene	Gasoil	Hexadecano
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Z8)	43	78	59
<i>Microbacterium sp.</i> (H1)	59	81	63
<i>Brevibacterium sp.</i> H(6)	20	74	10
<i>Pseudomonas Putida</i> (Pa41)	66	55	77

PARTE D: BIORREMEDIACION DE
SUELOS CONTAMINADOS CON
HIDROCARBUROS. ENSAYOS EN
MICROCOSMOS.

CAPITULO 7: ENSAYOS
PRELIMINARES Y PUESTA A PUNTO
DE LAS TECNICAS ANALITICAS PARA
CUANTIFICAR HIDROCARBUROS EN
LOS MICROCOSMOS

7.1 Ensayos preliminares

Uno de los principales desafíos en los procesos de biorremediación es la medición de la concentración de hidrocarburos en los sistemas. Existen diversos métodos de medición de hidrocarburos: gravimétrico, espectrofotometría infrarroja, cromatografía gaseosa, espectrofotometría ultravioleta y turbidimetría, entre otras (Castillo Bertel, M. 2013; Santa, J. 2002; Wardani, O. 2020). A su vez, es imprescindible contar con una fase de extracción previa que sea lo suficientemente efectiva para separar los hidrocarburos del resto de la muestra. Para ello se utiliza ultrasonido, extracción en tubo Soxhlet, fluidos supercríticos y solventes a alta presión, además de la ya conocida extracción con éter de petróleo. (Romero Miño, A. 2005).

Los modelos analíticos de calibración basados en espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) para la determinación de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) en suelos y de hidrocarburos aromáticos (HA) en aceites vegetales, alimentos y agua, son una alternativa rápida para el análisis químico cuantitativo de muestras problema y han demostrado ser adecuados para este fin. (Arguijo-Portillo, N. y col. 2019).

En estudios cuyo objetivo es el análisis cuantitativo o identificación de compuestos específicos en mezclas complejas de hidrocarburos como los aromáticos policíclicos, comúnmente se aplican técnicas como la cromatografía de gases (GC) o la HPLC, entre otras, pero estos métodos requieren largos tiempos de análisis por la necesidad de extracción de compuestos específicos, alto consumo de reactivos y elevado costo de los instrumentos. (Arguijo-Portillo, N. y col. 2019).

Debido a que las técnicas mencionadas en general requieren equipos y materiales sofisticados y reactivos muy costosos (gases, estándares para calibración, solventes, etc), se decidió utilizar, en el presente trabajo, técnicas de tipo gravimétricas que permiten extraer y cuantificar los hidrocarburos de las muestras aunque tal vez resignando sensibilidad en función de un menor costo operativo.

La técnica de gravimetría determina el peso de los contaminantes totales extraídos con un solvente por medio de una balanza analítica. Este método ofrece una cuantificación gruesa de los contaminantes que no requiere equipo sofisticado, es

un procedimiento sencillo, barato y rápido. El contenido de hidrocarburos a bajas concentraciones no puede ser determinado con mucha precisión con este método, debido al error que se puede presentar con pesos muy pequeños por lo que se recomienda hacer una curva de calibrado para validar los rangos de aplicación según equipamiento disponible; sin embargo, por arriba de $50\ 000\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ es recomendada su utilización sin objeciones. Por otra parte el método gravimétrico no da información sobre el tipo de compuesto presente, o de la presencia o ausencia de compuestos tóxicos (Fernández Linares L. y col., 2006).

Esta técnica es aplicable para cuantificar de una manera global a los componentes de las mezclas de hidrocarburos y/o asfáltenos contenidos en muestras de suelos contaminados por medio de un balance de pesos (Fernández Linares L. y col., 2006).

Específicamente el método se basa en la cuantificación de los hidrocarburos que son extraídos dentro de un solvente adecuado. El solvente es evaporado y el extracto orgánico obtenido es pesado. Esta cuantificación es llamada HTPs (Hidrocarburos Totales de Petróleo) y es reportada como porcentaje de la muestra total en peso seco. Este método es más adecuado para petróleos pesados que no se pierden en la etapa de evaporación (Fernández Linares L. y col., 2006). Algunas veces, cuando se realiza un método gravimétrico, se requiere incluir etapas de limpieza con sílica gel, para remover material biogénico y evitar así interferencias. Este método no es adecuado para mediciones de hidrocarburos ligeros que volatilizan a temperaturas por debajo de $70\text{-}85^{\circ}\text{C}$ (Fernández Linares L. y col., 2006).

Como se dijo anteriormente en este trabajo de tesis se utilizó el método gravimétrico para la cuantificación de HTPs. Para ellos, se realizaron las extracciones mediante agitación mecánica utilizando éter de petróleo como solvente y llevando a cabo un clean-up batch utilizando sílica gel para limpiar el extracto de posibles interferencias (materia orgánica que no corresponda a la mezcla contaminante). Entre los métodos de extracción y cuantificación disponibles en bibliografía se escogieron los siguientes: a) para la extracción por agitación mecánica el método EPA 8270B SW-846 (USEPA 1986, Louchouart et

al., 1999) modificado (EPA, 1994; Schwab et al., 1999) y b) para la cuantificación de HTPs la determinación gravimétrica (USEPA 821-B94-004, 1995).

En el presente capítulo se muestran una batería de ensayos preliminares tendientes a validar las técnicas extractivas y de cuantificación de HTP propuestas, así como la determinación de los límites de precisión y confiabilidad de las mismas. Para ello se destinó un período de aproximadamente 7 semanas, en las que se analizaron muestras contaminadas con hidrocarburos aportadas por la empresa EET.S.A., las cuales son similares a las muestras de suelo que se utilizarán para el armado de los microcosmos correspondientes a los ensayos del capítulo 8. Adicionalmente, se realizaron determinaciones de HTP por cromatografía gaseosa sobre muestras testigo tanto para compararlas con la cuantificación gravimétrica como para conocer las concentraciones iniciales de los suelos contaminados en el campo que se usarán en los ensayos correspondientes al capítulo 8.

De los resultados obtenidos se deduce que el hidrocarburo que mejor se adapta para diseñar los ensayos de degradación en microcosmos es el gasoil ya que a diferencia del kerosén los porcentajes de evaporación son bajos y permitirán que la degradación del hidrocarburo por parte de las bacterias pueda evaluarse durante el período de tiempo que requieran los ensayos. Es por ello que se decidió utilizar gasoil en el armado de los microcosmos.

7.2 Materiales y Métodos

7.2.1 Ensayos preliminares para la determinación de hidrocarburos en suelos

7.2.1.1 Prueba de volatilidad de hidrocarburos

El procedimiento se realizó según el siguiente protocolo: se pesaron sendos Erlenmeyers de vidrio de 250 ml en la balanza analítica y se registró su peso (P_1). Con la pipeta Pasteur se dosificó una cantidad conocida del hidrocarburo a ensayar (kerosene o gasoil) y se registró su peso (P_2) y luego se añadieron 25 ml de éter de petróleo. Todos los frascos se dejaron evaporar bajo campana a temperatura ambiente. Diariamente se registró el peso final (P_3) del Erlenmeyer hasta peso constante. Para calcular la masa de hidrocarburo inicial ($P_{HC\text{ inicial}}$) y

remanente ($P_{\text{HC remanente}}$) luego de la evaporación, la masa del hidrocarburo evaporada ($P_{\text{HC evaporado}}$) y el porcentaje de evaporación del hidrocarburo ($\%E_{\text{HC evap}}$) se utilizaron las ecuaciones 1, 2, 3 y 4.

$$P_{\text{(HC inicial)}} = P_2 - P_1 \quad (1)$$

$$P_{\text{(HC remanente)}} = P_3 - P_1 \quad (2)$$

$$P_{\text{(HC evaporado)}} = P_2 - P_3 \quad (3)$$

$$\%E_{\text{(HC evap)}} = ((P_2 - P_3) * 100) / (P_2) \quad (4)$$

Para evaluar el arrastre de hidrocarburo en la evaporación del éter de petróleo se dejó como testigo un Erlenmeyer con la adición del hidrocarburo pero sin el éter de petróleo. Las pruebas se hicieron por triplicado.

7.2.2. Determinación gravimétrica de hidrocarburos en suelos

7.2.2.1 Determinación del porcentaje de humedad

Para conocer el porcentaje de agua presente en las muestras de suelo contaminado se siguió el protocolo descrito en el Anexo 6 ítem 6.1. Se aplicó el método gravimétrico de secado a 60°C. La muestra se mantuvo a esa temperatura en estufa hasta obtener peso constante en balanza analítica y los datos obtenidos se procedió a efectuar el cálculo del porcentaje de humedad.

7.2.2.2 Determinación del porcentaje de hidrocarburos totales de petróleo (HTP)

Para conocer el % de HTP presente en las muestras se realizó el método gravimétrico, EPA 8270B SW-846 (USEPA 1986, Louchouart et al., 1999) modificado (EPA, 1994; Schawab et al., 1999) (EAMG) y para la cuantificación de HTPs la determinación gravimétrica (USEPA 821-B94-004, 1995) utilizando éter de petróleo calidad analítica como reactivo extractante según protocolo descrito en el Anexo 6 ítem 6.2. Para constatar los valores obtenidos por el método gravimétrico se realizaron algunas determinaciones de HTP mediante cromatografía gaseosa en laboratorios químicos acreditados tanto del Depto. de Qca. FAIN-UNCo como privados de la Provincia de Neuquén.

7.2.2.3 Cálculo de los límites de detección y cuantificación del método gravimétrico para la determinación del %HTP

El límite de detección se define como la cantidad o concentración mínima de una sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado (concentración mínima detectable).

Responde a la fórmula:

$$LD = \bar{X} + 3\sigma$$

El límite de cuantificación se define a su vez como la concentración mínima de un analito que puede ser cuantificado en una matriz real.

Responde a la fórmula:

$$LQ = \bar{X} + 10\sigma$$

Siendo:

LD: límite de detección LQ: límite de cuantificación

\bar{X} : media de los datos σ : desvío estándar

La metodología para calcular estos límites consistió en aplicar la técnica de extracción de hidrocarburos por el método gravimétrico modificado con su correspondiente corrección por humedad (Anexo 6 ítems 6.2 y 6.1) sobre un suelo no contaminado con hidrocarburos y calcular la media y el desvío estándar sobre esos datos con un $n = 16$.

7.3 Resultados y discusión

Los ensayos preliminares pretenden comparar las técnicas posibles para la extracción de hidrocarburos y su posterior cuantificación, como así también poner a punto las técnicas elegidas para este trabajo.

7.3.1 Prueba de volatilidad de hidrocarburos

Para seleccionar que tipo de contaminante es más conveniente para incorporar a los suelos en los ensayos de biorremediación que se llevarán a cabo, en el

capítulo 8 se realizaron pruebas de volatilidad para kerosén y gasoil y además se evaluó la incidencia del éter de petróleo en la evaporación de aquellos testeados.

La prueba de volatilidad de hidrocarburos da una idea de cuan volátil puede ser un hidrocarburo a temperatura ambiente en función del tiempo. En ensayos en microcosmos, donde se quiere probar la capacidad degradativa de una especie bacteriana, es conveniente realizar esta prueba entre los hidrocarburos que se quieren ensayar de tal manera de descartar esta variable del ensayo y asegurarse que la disminución de hidrocarburos en el sistema es debido al consumo de estos por las bacterias y no por la propia evaporación del contaminante.

Para llevar a cabo estos ensayos se seleccionaron dos productos de uso comercial procedentes de la destilación del petróleo: Kerosene y gasoil y se evaluó su volatilidad de acuerdo al protocolo detallado en la sección de materiales y métodos.

Las mezclas contaminantes utilizadas (kerosene y gasoil) fueron fraccionados en volúmenes equivalentes a las cantidades que se encontrarían presentes en 3 g suelo contaminado de acuerdo a lo que se utiliza en el método gravimétrico para la determinación de hidrocarburos totales de petróleo.

Para el kerosene se tomaron 12 Erlenmeyer, se adicionó a cada uno la cantidad equivalente del hidrocarburo que se recuperaría de un suelo contaminado con aproximadamente 6% y 2% de kerosene. Solo a 3 Erlenmeyers de cada grupo de frascos se le adicionó 25 ml de éter de petróleo mientras que los restantes se dejaron sin el extractante a modo de testigo para evaluar la incidencia del Eter de petróleo en la evaporación del kerosén. Posteriormente se evaluó el contenido de kerosene remanente por pesada a las 24, 48 y 72 h y se calculó el % de evaporación

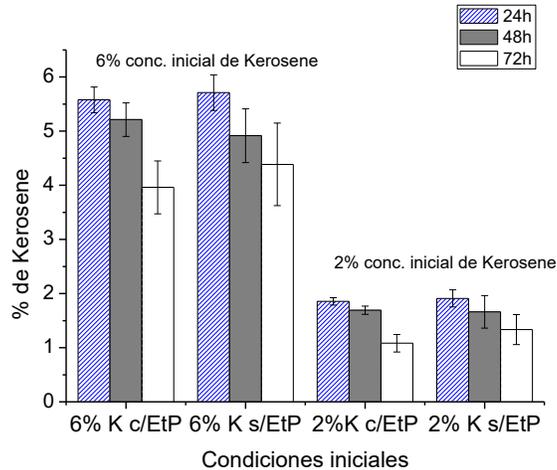


Figura 47: Resultados prueba de volatilidad del kerosene (k) con y sin éter de petróleo (c/ETP y s/ETP).

La Figura 47 presenta los resultados de la prueba de volatilidad para el kerosene. Se analizaron frascos conteniendo una cantidad inicial de Kerosene de 6 y 2%, con y sin éter de petróleo. Puede observarse en el gráfico que hay diferencias de peso en los Erlenmeyers a medida que transcurren los tres primeros días del ensayo. Se cuantifica una evaporación del 30% y 45% del kerosene respecto del contenido inicial en los frascos de 6 % y 2%, respectivamente. Esto indica que un porcentaje grande del kerosene se evapora y podría significar un error al momento de realizar los ensayos en microcosmos ya que esa cantidad inicialmente considerada no estaría disponible para las bacterias”.

Para determinar si las diferencias observadas en los datos son significativas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) ($\alpha=5\%$) detalladas en el anexo 9. Se comprueba que la presencia de éter de petróleo no afecta a la evaporación de kerosen para ninguna de las masas ensayadas, no se detectan diferencias significativas ($F_{obs.} < F_{crit.}$) respecto a la evaporación, pero si tenemos en cuenta el tiempo, las diferencias si son significativas ($F_{obs.} > F_{crit.}$), se puede concluir entonces que hay pérdidas significativas de kerosene en corto tiempo. A partir de estos resultados se puede decir que este hidrocarburo no es útil para este ensayo si se utiliza en microcosmos. También se puede concluir que el éter de petróleo, como extractante, no influye en la evaporación del kerosene.

El mismo análisis estadístico se realizó para evaluar gasoil. En la Figura 48 se muestra el ensayo equivalente usando dos concentraciones de gasoil (4% y 2,5%)

como hidrocarburo contaminante. Se desestimó evaluar la incidencia del éter de petróleo en el ensayo con gasoil ya que en el test realizado con kerosén no había afectado el % de evaporación de ese hidrocarburo que es el más volátil de los compuestos ensayados. Los resultados obtenidos indican que no se aprecia una diferencia marcada en los datos de evaporación a las 72 h respecto del contenido de gasoil inicialmente adicionado al frasco.

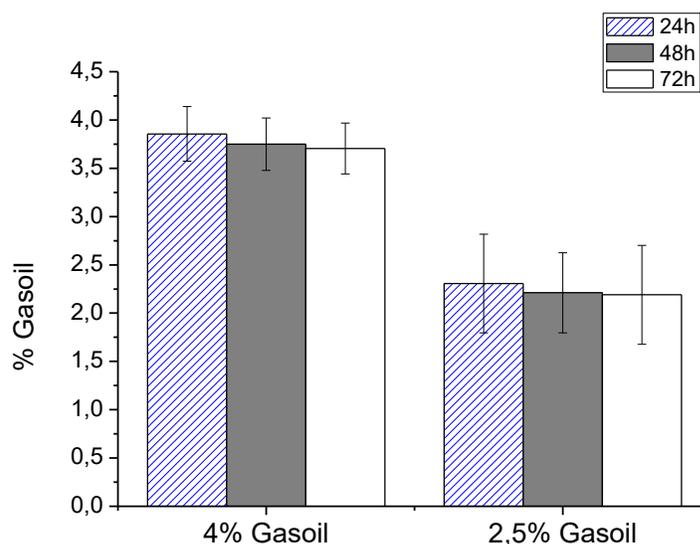


Figura 48: Resultados prueba de volatilidad del gasoil para 4% y 2.5% de hidrocarburo.

Realizado el análisis ANOVA ($\alpha=5\%$) de los datos obtenidos se pudo determinar que el volumen de gasoil, sea de 2,5 o 4% no influye en la evaporación del mismo como tampoco en el tiempo transcurrido ya que en ambos casos el $F_{obs.} < F_{crit.}$ Esto significa que el gasoil se mantendrá más estable respecto de su volatilidad en el tiempo (Anexo 9).

De los resultados obtenidos se deduce que el hidrocarburo que mejor se adapta para diseñar los ensayos de degradación en microcosmos es el gasoil ya que a diferencia del kerosén los porcentajes de evaporación son bajos y permitirán que la degradación del hidrocarburo por parte de las bacterias pueda evaluarse durante el período de tiempo que requieran los ensayos. Es por ello que se decidió utilizar gasoil en el armado de los microcosmos.

7.3.2 Análisis de regresión para la efectividad en la recuperación de gasoil por el método gravimétrico

Con la finalidad de evaluar la recuperación de hidrocarburo por el método gravimétrico, se realizaron por triplicado extracciones con éter de petróleo a un suelo arenoso que fue contaminado en el laboratorio con cantidades crecientes de gasoil. En la Figura 49 se muestran los valores correspondientes a la extracción de gasoil con éter de petróleo cuantificados mediante el método gravimétrico. Se aprecia una buena recuperación del contaminante en todos los porcentajes de gasoil ensayados y un ajuste al modelo lineal con un R^2 de 0,985. Se realizó un análisis de regresión lineal de estos y se obtuvo que, por cada gramo de gasoil que se agrega en suelo, el gasoil recuperado aumenta en promedio 1,039 gramos. Esta regresión fue analizada posteriormente a través del coeficiente de correlación de Pearson con una significancia del 0,05 (95% de confianza) de manera de evaluar la dependencia lineal entre estas 2 variables. Luego de realizado el análisis, este arrojó una correlación entre las variables del 0,993 lo que significaría que hay una relación lineal directa muy buena entre el gasoil agregado y el gasoil recuperado.

El detalle de estos análisis estadísticos se encuentran en el anexo 9.3.

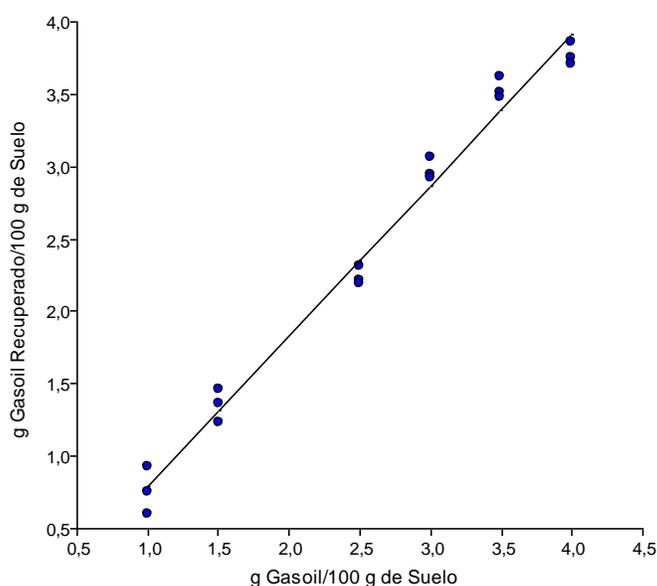


Figura 49: Correlación entre el contenido inicial de contaminante y su recuperación por método gravimétrico

Por otra parte, se analizó una muestra de suelo contaminado *in situ* con petróleo provista por la empresa EET S.A., utilizando tanto el método gravimétrico como la cromatografía gaseosa. Estos ensayos se realizaron para validar el uso de la técnica gravimétrica para el seguimiento periódico de los microcosmos.

Si bien dos métodos con formas de medición (o sea principios químicos y físicos diferentes) NO tienen porque dar igual o parecido (dentro del error) contribuye a validar el método gravimétrico seleccionado para la realización de este trabajo.

En la Tabla XIV se muestran los resultados obtenidos a partir de ensayos realizados a 10 porciones de un suelo contaminado utilizando la técnica gravimétrica propuesta para este trabajo y su comparación con un análisis realizado a la misma muestra por técnica cromatográfica cuyo detalle se muestra en el anexo 8 Figuras 8.1, 8.2 y 8.3, muestra denominada MDACH-01 analizada en laboratorios INDUSLAB. Se puede apreciar que el análisis gravimétrico arrojó en promedio un valor de 4,1% de HTP con un desvío estándar de 0,3 ($4,1 \pm 0,3\% \text{HTP}$) mientras que la muestra analizada por cromatografía dio un resultado muy cercano por lo tanto podemos decir que el método gravimétrico es factible de ser usado en el desarrollo experimental para analizar a los microcosmos contaminados con residuos de petróleo.

Tabla XV: Comparación de análisis por método Gravimétrico y Cromatografía Gaseosa.

%HTP Gravimétrico		Promedio	Desvío estándar	% Cromatografía gaseosa
4,0071	3,894	4,1092	0,2679	4,3174
3,9152	4,1055			
3,8914	4,2045			
4,0071	4,5011			
3,9152	4,6512			

7.3.3 Cálculo de límites de cuantificación y de detección

Para completar la validación del método, se calculó los límites de detección cuantificación según lo explicado en la sección 3.9. El ensayo se realizó para un $n = 12$. Los resultados se encuentran tabulados en la Tabla XIV El límite de detección fue de 0,08% y el límite de cuantificación fue de 0,20% demostrando

que el método puede detectar y cuantificar bajas concentraciones de hidrocarburos.

Tabla XVI: Resultados extracción de hidrocarburos para cálculo de límites de detección y cuantificación.

Muestra	%HTP	Promedio	Desvío estándar	LD = X + 3σ	LQ = X + 10σ
1	0,01	0,03	0,01	0,08	0,2
2	0,05				
3	0,05				
4	0,01				
5	0,04				
6	0,01				
7	0,01				
8	0,02				
9	0,04				
10	0,02				
11	0,05				
12	0,03				

7.4 Conclusiones

- ✚ Se corroboró en los diferentes ensayos de volatilidad, que el kerosene presenta una evaporación significativa a temperatura ambiente. Por lo tanto, este hidrocarburo no será un compuesto adecuado para preparar microcosmos con suelos contaminados *in situ* ya que podrían obtenerse resultados erróneos al evaluar la biodegradación por bacterias.
- ✚ Se pudo comprobar que el gasoil no arrojó diferencias significativas en su evaporación a temperatura ambiente en el tiempo que duro el ensayo. Estos resultados indican que sería un hidrocarburo más apropiado para llevar adelante experimentos de microcosmos con suelo contaminado en laboratorio. De esta manera se puede inferir que la disminución del contaminante en el suelo estará asociada a la biodegradación por actividad bacteriana y no por la volatilidad del gasoil.
- ✚ La aplicación del método gravimétrico resultó satisfactorio para extraer y cuantificar los hidrocarburos del suelo contaminado en el rango de

concentraciones testeadas (1 al 5 %), hecho que queda demostrado con el análisis de correlación de Pearson del suelo con gasoil agregado.

- ✚ Los valores de recuperación de los HTP por el método gravimétrico son similares a los obtenidos por análisis cromatográfico realizado a la muestra MD-ACH-01 al inicio del ensayo, quedando validado el método gravimétrico como metodología para evaluar el % de HTP en el suelo en este trabajo de tesis.
- ✚ Los valores obtenidos para los límites de detección y cuantificación, determinados en los ensayos preliminares, fueron inferiores al valor de 1% de HTP (valor máximo permitido por la legislación para disposición final de residuos). Estos resultados indican que se podrán realizar mediciones confiables usando el método gravimétrico en los rangos requeridos por los ensayos en microcosmos que se realizarán en el capítulo 8 teniendo certeza de detectar el punto de disposición final del residuo.

CAPITULO 8: ENSAYOS EN
MICROCOSMOS PARA LA
REMEDIACION DE SUELOS
CONTAMINADOS CON
HIDROCARBUROS

8.1 Introducción

El presente capítulo está destinado a evaluar las capacidades metabólicas para degradar derivados del petróleo en suelos contaminados, desarrolladas por las cepas seleccionadas en las etapas precedentes (ensayos de bioaumentación) y comparar esas actividades hidrocarburo-líticas con las propias de la flora nativa presente en los mismos suelos (ensayos de bioestimulación). En resumen se pretende discutir la eventual conveniencia de inocular flora exógena frente a la flora hidrocarburo-lítica autóctona. Para lograr el objetivo planteado se diseñaron ensayos en microcosmos armados en contenedores plásticos tipo maceta de jardín. Para seguir la evolución de los microcosmos en el tiempo se cuantificó la biomasa y la cantidad de hidrocarburos degradados de acuerdo a las técnicas analíticas descritas en capítulos anteriores. Más específicamente se realizaron tres tipos de ensayos: I) Suelo contaminado *exsitu* con gasoil (4,0%) usando un sustrato inerte (arena de construcción) a los efectos de evaluar la acción degradativa de las cepas seleccionadas inoculadas por separado y constituyendo un consorcio; II) Suelo proveniente de un pasivo ambiental contaminado *insitu* conteniendo aproximadamente 2,0% de residuos de petróleo; III) Suelo proveniente de un pasivo ambiental contaminado *insitu* conteniendo aproximadamente 6,0% de residuos de petróleo. Los suelos fueron cedidos por la empresa EET S.A. que se dedica a la biodegradación y disposición final de residuos derivados de la industria petrolera en la región Norpatagónica.

8.2 Materiales y Métodos

8.2.1. Producción de biomasa

En el Anexo 7 incisos 7.1 y 7.2 se describe la preparación del inóculo que se utiliza en los ensayos de bioaumentación del presente capítulo. Es necesario generar una cantidad de biomasa de manera tal de producir un inóculo lo suficientemente grande como para sembrar los contenedores del microcosmos con una población de bacterias aproximada de $1 \cdot 10^8$ bact/ml.

8.2.2 Recuento de bacterias hidrocarburohíticas presentes en el suelo mediante técnica de NMP

En el Anexo 7 inciso 3 se describe la cuantificación de bacterias hidrocarburohíticas mediante la técnica del número más probable (NMP) utilizando diluciones seriales, rezarzurina como indicador de crecimiento y kerosén como sustrato (García-Cruz, N. y col. 2014).

8.3 Ensayo en microcosmos: bioestimulación y bioaumentación

Se realizaron tres ensayos para evaluar la capacidad degradadora de hidrocarburos tanto de las cepas seleccionadas inoculadas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Microbacterium sp.*, *Brevibacterium sp.* y *Pseudomonas putida*) como de las bacterias autóctonas estimuladas con fertilizantes, riego y aireación. Adicionalmente se monitoreó la eficiencia en la implantación del inóculo y su permanencia en el sistema.

Se realizaron los siguientes ensayos:

- Ensayo I. Suelo Arenoso contaminado *ex situ* con 4,0% de gasoil
- Ensayo II. Suelo arcilloso proveniente de un pasivo ambiental contaminado *in situ* con 2,0% de petróleo
- Ensayo III Suelo arcilloso proveniente de un pasivo ambiental contaminado *in situ* con 6,0% de petróleo.

8.3.1. Ensayo I. Suelo Arenoso contaminado *ex situ* con aproximadamente 4% de gasoil

8.3.1.1 Introducción

En esta etapa se diseñó un ensayo que permitiera evaluar la degradación de hidrocarburo (gasoil) por las especies bacterianas que habían sido caracterizadas en las etapas previas. Para el armado de los microcosmos se utilizó arena de construcción para simular un suelo arenoso. El material sólido e inerte se seleccionó a partir de arena de construcción comercial que no hubiera estado en contacto anteriormente con ningún contaminante del tipo hidrocarburo. De este modo se pretendió disminuir las posibilidades de tener microorganismos degradadores de hidrocarburos presentes en el sistema.

8.3.1.2 Armado de microcosmos

Se realizó el llenado de los contenedores plásticos de medidas 0,45 m x 0,10 m x 0,10 m con arena de construcción disponiendo en cada uno de ellos 2,5 kg de la misma. El sustrato no fue esterilizado sino que se utilizó tal cual fue provisto por el comerciante de manera de simular lo más posible el tratamiento que se le da al suelo una vez recibido en la planta de tratamiento. Luego se contaminó cada contenedor con 4,0% en peso de gasoil y se homogeneizó el sustrato para que todo el gasoil quede en contacto con él. Los microcosmos se organizaron en 3 sistemas diferentes cada uno por triplicado:

- Sistema 1: bioestimulado

Se prepararon los microcosmos con un riego inicial de nutrientes y sin inoculación de microorganismos. Se trató de reproducir las condiciones de una biopila a campo donde se estimulan los microorganismos presentes con aporte de nutrientes. El ensayo se realizó por triplicado.

- Sistema 2: bioestimulado y bioaumentado simple

Se prepararon los microcosmos con un riego inicial con nutrientes y se inocularon cada uno con una cepa diferente a ensayar (*Pseudomonas aeruginosa*, *Microbacterium sp.*, *Brevibacterium sp.* y *Pseudomonas putida*). El ensayo se realizó por triplicado para cada cepa.

- Sistema 3: bioestimulado y bioaumentado mixto:

Ídem al anterior, pero en cada maceta se realizó una inoculación con las 4 cepas juntas.

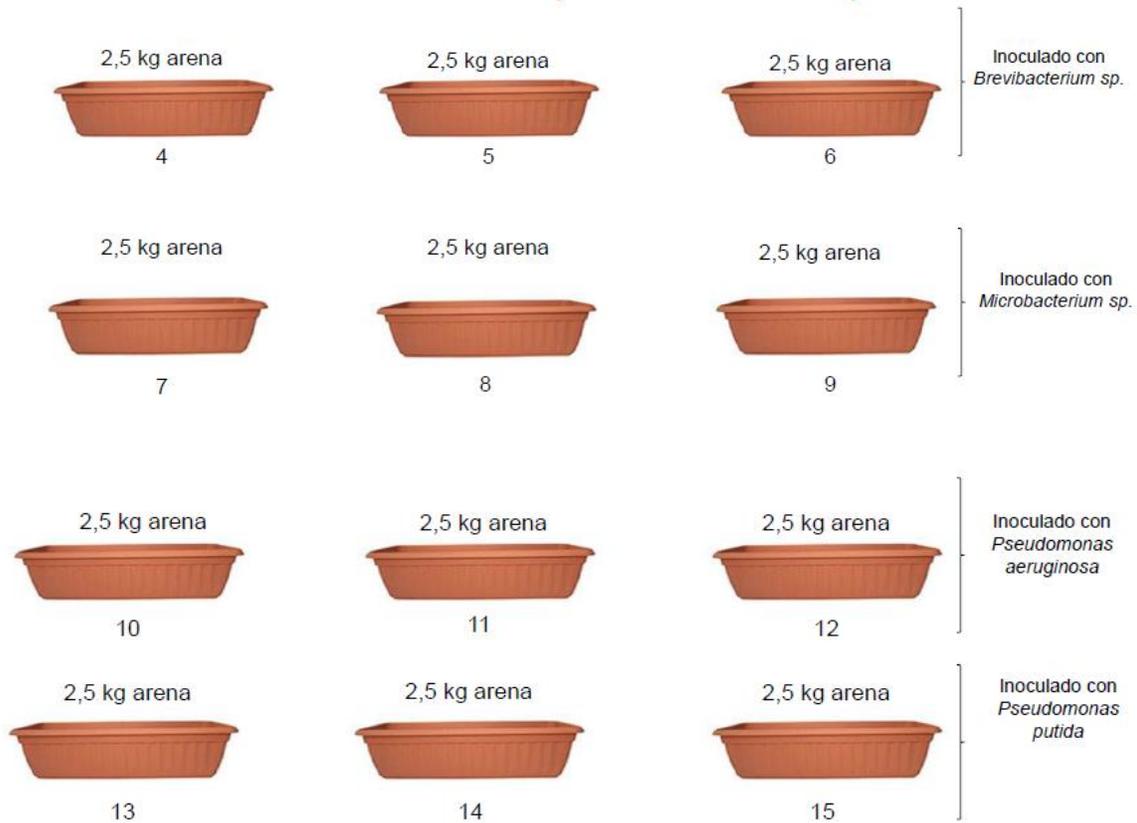
Un esquema de los sistemas para este ensayo se encuentra esquematizado en la Figura 50.

Cada sistema se organizó en tres contenedores (repetición) por tratamiento teniendo así, un total de 18 contenedores para el ensayo, 3 contenedores correspondían al sistema 1, 12 al sistema 2 y 3 al sistema 3.

Sistema 1: bioestimulado



Sistema 2: bioestimulado y bioaumentado simple



Sistema 3: bioestimulado y bioaumentado mixto



Figura 50: Diagrama de los sistemas para el ensayo I.

Una vez organizados y armados los microcosmos, se realizó un riego inicial con una solución de nutrientes con una proporción C:N:P 100:10:1 considerando el

4,0% de gasoil incorporado como la fuente de carbono y de acuerdo a recomendaciones en la literatura que considera los rendimientos y la composición de elementos observada en la biomasa para ciertos grupos bacterianos (Pode,1996; Demque y col., 1997). El nitrógeno fue incorporado en forma de urea y el fósforo como fosfato monopotásico.

Para realizar la inoculación de los sistemas 2 y 3, primeramente se realizó una propagación del inóculo según la técnica descrita en la sección 7.1 *Producción de inóculo* y se calculó la concentración celular deseada mediante el recuento en la cámara Thoma. Una vez alcanzada una concentración celular de $1 \cdot 10^8$ bact/ml, se realizó una centrifugación del cultivo según apartado 7.7 *Obtención de biomasa por centrifugado e inoculación*, se resuspendió en agua y en cada uno de los microcosmos se inoculó con aproximadamente 50 ml de la suspensión celular.

Se homogeneizó luego para que todos los componentes en el contenedor estuvieran en contacto.

En el caso del sistema mixto, las cepas se propagaron cada una de las especies por separado, se realizó la resuspensión en agua y luego, al momento de inocular el microcosmos, se mezclaron las 4 suspensiones y se distribuyó en los contenedores (50 ml en cada contenedor).

La temperatura a la cual se desarrolló el ensayo fue la temperatura ambiente que osciló aproximadamente entre 25 - 30 °C a lo largo del ensayo.

8.3.1.3 Seguimiento del ensayo

Los microcosmos se monitorearon regularmente para reponer la humedad perdida por evaporación. El riego de los mismos se realizó con 150 – 200 ml de agua corriente según necesidad y para mantener, dentro de lo posible, la condición de capacidad de campo, condición que permite en el sustrato un equilibrio entre el aire y el agua en el perfil del mismo.

El sustrato de los contenedores fue rotado periódicamente para facilitar el ingreso de aire en el sistema y ponerlo así a disposición de las bacterias.

8.3.1.4 Resultados

Al momento de iniciado el ensayo (t_0) y cada 20 días aproximadamente, se realizó un muestreo de los microcosmos que consistió en la extracción de una porción de arena, previamente homogeneizado el sustrato del contenedor, en recipientes estériles con tapa.

Por cada muestreo realizado se tomaron los valores de 2 parámetros para evaluar durante el tiempo la actividad microbiana: el número de bacterias por mililitro de suspensión (bact/ml) y el porcentaje de hidrocarburos totales de petróleo remanente en el suelo (%HTP). Ambas técnicas se detallan en el anexo 7.3 y 6.2 respectivamente, de manera de hacer una correlación entre la degradación del contaminante y el crecimiento celular.

Cabe consignar que en este caso en particular, no se pudo realizar el conteo de la biomasa por el método de número más probable (NMP) ya que al momento de realizado el ensayo, el viraje del indicador resarzurina utilizado para la técnica variaba su color a las 24 h de iniciada la incubación. Si bien este comportamiento indeseable podría atribuirse a una interferencia causada por algún componente presente en la arena que impedía el correcto viraje del indicador no se pudo determinar con certeza que compuesto causaba la reacción, por lo tanto la población bacteriana fue seguida por conteo directo en microscopio óptico tomando una alícuota de arena (1g) re-suspendida en agua (100ml) y recuento en Cámara de Thoma.

Se analizaron un total de 7 muestras, correspondientes a los tiempos t_0 a t_6 , durante los 180 días que duró el ensayo y los resultados se muestran en las Figuras 51 y 52.

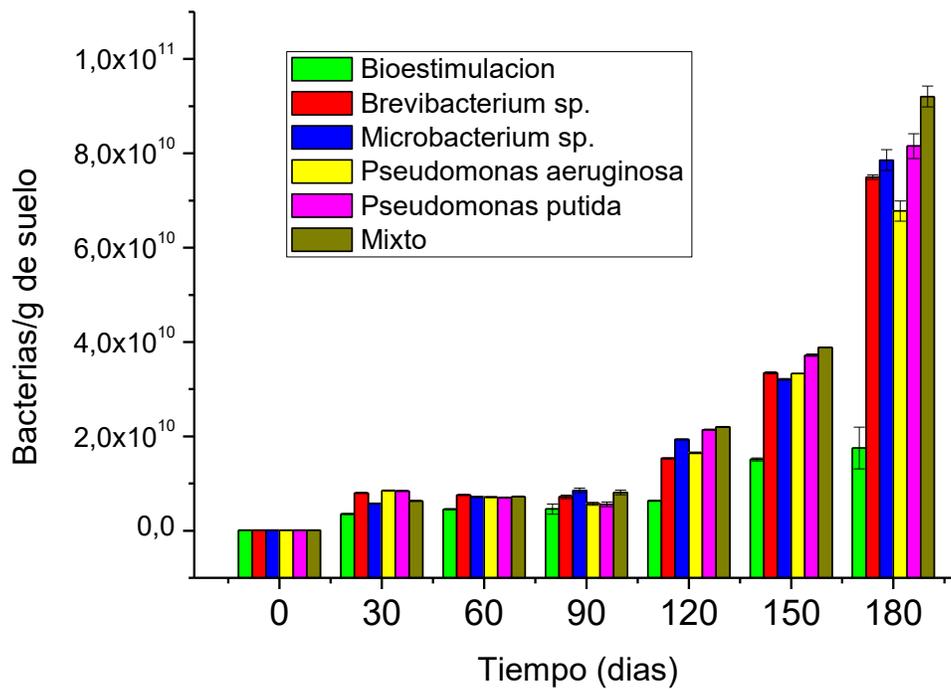


Figura 51: Evolución de la biomasa del suelo (bact/ml) suelo para el ensayo I. Se muestran los valores medios para cada tratamiento.

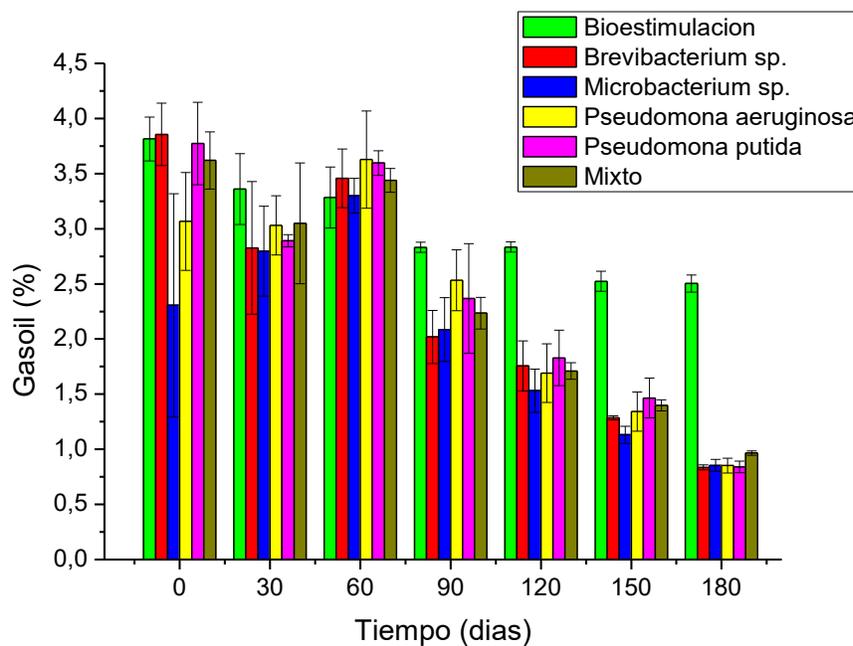


Figura 52: Evolución % de gasoil para el ensayo I. Se muestran los valores medios para cada tratamiento.

Si se observan en general los gráficos de las Figuras 51 y 52, a los 30 días (t1) luego de la inoculación se evidencia un crecimiento de las cepas en la arena contaminada con gasoil que se corresponde con una pequeña disminución de los valores de %HTP (gasoil) remanentes en el contenedor. Mas específicamente en el gráfico de la Figura 52 puede verse variabilidad en los valores iniciales de %HTP para cada tratamiento. Esto se debe a que siempre hay una pequeña heterogeneidad en la distribución del contaminante sobre el sustrato y al momento de extraer las muestras si bien se toma el recaudo de mezclar lo mejor posible igualmente pueden presentarse zonas dentro del contenedor donde el hidrocarburo puede estar más concentrado y manifestar esas diferencias que se ven en el punto inicial.

Posteriormente, los valores de biomasa permanecieron más o menos invariables hasta los 90 días del ensayo mientras que los valores del %HTP remanentes disminuyeron notoriamente desde los 60 días de ensayo. Esto puede deberse a que la arena es no porosa entonces el contaminante, al no quedar retenido en los poros de un suelo arcilloso queda mas biodisponible para los microorganismos. En esta etapa no se nota un incremento de la biomasa pero sí una disminución en la concentración de gasoil con lo que podría ser una adaptación de las especies bacterianas al contaminante y/o a la presencia de metabolitos secundarios producidos como desechos como así también la disminución de las fracciones mas volátiles que corresponden mas o menos al 4,0% del contenido gasoil y que en general se considera que se pierde en los primeros 50 días de ensayo como ya fue reportado (Serrano y col, 2007;Gomez y col.,2009).

Después de los 90 días y hasta los 180 días donde finaliza el ensayo se puede ver en los gráficos un aumento de la biomasa en los sistemas bioaumentados que fue acompañado por el consumo de gasoil que alcanzó valores cercanos al 1% valor requerido por la legislación vigente para disposición final de suelos contaminados con hidrocarburos. Los valores finales del %HTP para cada tratamiento Bioestimulación y bioaumentación simple fueron los siguientes: *Pseudomonas aeruginosa*: 0,85%, *Microbacterium sp.*: 0,85%, *Brevibacterium sp.*: 0,83%,

Pseudomonas putida: 0,83% Los valores de biomasa obtenidos para todos los tratamientos rondan los valores de 10^{10} bact/g suelo.

Se puede decir que los inoculos se implantaron en todos los sistemas bioaumentados y bioestimulados, sin embargo no se observó preponderancia en el crecimiento de ninguna de las especies bacterianas utilizadas por sobre las otras especies. Estos resultados son menos alentadores a los reportados en bibliografía donde es frecuente encontrar mayor degradación en presencia de especies de *Pseudomonas* en especial si son productoras de biosurfactantes (Loureiro y col., 2019).

Analizando los datos obtenidos de *P. aeruginosa* y *P. putida* puede observarse que el remanente del HTP luego de llevarse a cabo la degradación, es del 0,85 y 0,83%. Estos valores demuestran un comportamiento similar de las especies del género frente al contaminante presente en el suelo.

Por otra parte en los sistemas de bioaumentación y bioestimulación mixto el valor del porcentaje de HTP remanente fue del 0,96%, cantidad levemente superior a la de los sistemas inoculados con una sola especie hidrocarburofítica por lo tanto se comprobó una acción sinérgica muy leve entre las bacterias que conforman el consorcio.

A los efectos de comprobar si las diferencias observadas en la concentración final de hidrocarburos en cada uno de los microcosmos tienen significancia estadística se realizaron las pruebas que se pueden ver en el Anexo 9.4. Específicamente se aplicó Análisis de la Varianza (Suma de Cuadrados (SC) tipo III) y Test de Tukey con Alfa=0,05 y DMS=0,14283; donde se corroboró que las cantidades de gasoil remanentes en los sistemas bioaumentados son significativamente diferentes de los sistemas bioestimulados. Por otra parte se comprueba que no hay diferencia significativa entre los sistemas inoculados y es significativamente diferente del resto. Por otra parte se verificaron los supuestos de Normalidad y Homogeneidad de varianzas utilizando el test de Shapiro-Wilks (modificado) y la Prueba de Levene respectivamente. Ambos supuestos fueron confirmados pudiéndose suponer normalidad de los datos y Homogeneidad de la Varianza.

Respecto de los sistemas bioestimulados se constata que hubo menor desarrollo de biomasa y el consumo de gasoil no superó el 2,5% debido a la escasa presencia de bacterias hidrocarburohílicas en los mismos. La baja degradación se asocia al número reducido de bacterias presentes originalmente en la arena (no se esterilizó el sustrato se utilizó como fue provisto por el comerciante) y si bien hay menor población bacteriana que en los sistemas inoculados ($2,5 \cdot 10^{10}$ bact/gsuelo) no pareciera que presentan grandes dificultades para adaptarse a la presencia del contaminante y degradarlo aunque si lo hacen mas lentamente.

Se puede observar una diferencia notable a favor de los sistemas inoculados (bioaumentados) respecto del sistema solo bioestimulado pudiéndose inferir una buena implantación de las cepas bacterianas inoculadas sobre este sustrato inerte y muy poco poroso como es la arena de construcción y seguramente debido a la muy baja carga microbiana autóctona no se ejerce una presión selectiva sobre las bacterias agregadas las cuales se desarrollan y utilizan el sustrato de manera mas efectiva en los sistemas bioaumentados respecto de los bioestimulados.

8.3.2 Ensayo II. Suelo arcilloso proveniente de un pasivo ambiental contaminado in situ con aproximadamente 2% de petróleo

8.3.2.1 Introducción

Una vez confirmada la actividad hidrocarburohílica de las bacterias sobre arena y gasoil, se diseñaron ensayos que permiten evaluar esta actividad degradativa usando como sustrato un residuo sólido procedente de un pasivo ambiental localizado en una zona aledaña a la extracción de petróleo y que fuera provisto por la empresa EET S.A. que operaba en la región y que ofrecía servicio de biorremediación de suelos empetrolados por medio de la técnica de bioestimulación en pilas.

El ensayo II se diseñó de la misma manera que el ensayo I para el sustrato arena, pero proponiendo solo dos sistemas: un sistema aplicando la técnica de bioestimulación y otro aplicando bioestimulación y bioaumentación simple inoculando cada sistema con una de las especies en estudio. Considerando los resultados obtenidos en el Ensayo I, se decidió omitir en el Ensayo II los sistemas

bioestimulados y bioaumentados mixtos ya que no se detectaron diferencias marcadas entre los sistemas inoculados con una sola especie y aquellos mixtos inoculados con las 4 cepas en estudio en los microcosmos con suelo arenoso. También se omitió del ensayo la cepa *Pseudomonas putida* y se conservó para el mismo a *Pseudomonas aeruginosa* por haber presentado valores de degradación de HTP casi iguales. Se conserva *P. aeruginosa* por ser una de las especies aisladas en el presente trabajo. Por otra parte como la inclusión de cada sistema adicional en el diseño del ensayo implica una manipulación grande de materiales y reactivos que incrementan los costos y tiempos operativos tampoco se justificaba su análisis en esta etapa.

8.3.2.2 Armado del microcosmos

El armado de los microcosmos para esta etapa fue exactamente igual que en el ensayo para arena. Se pesó 2,5 kg aproximadamente de suelo contaminado para cada contenedor, se realizó un riego inicial con nutrientes en las mismas concentraciones que en el ensayo con arena y se homogeneizó, y se sembró cada sistema con una especie diferente luego de la propagación del inóculo. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los sistemas propuestos en esta etapa fueron 2:

Sistema 1: bioestimulación. Consistía en la bioestimulación de las especies presentes en el suelo por medio de nutrientes y sin la presencia de bacterias ajenas a ese suelo.

Sistema 2: bioestimulación y bioaumentación simple. Cada sistema de tres contenedores fue inoculado con una especie a ensayar (tratamiento) y a su vez bioestimulado con solución de nutrientes.

Las especies inoculadas en los sistemas y evaluadas en esta etapa fueron aquellas aisladas de suelos contaminados previamente: *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbacterium sp*, y *Brevibacterium sp*.

En la Figura 53 y a modo de resumen se muestra un diagrama de los ensayos llevados a cabo para el presente trabajo y a continuación se describirán cada uno de ellos.

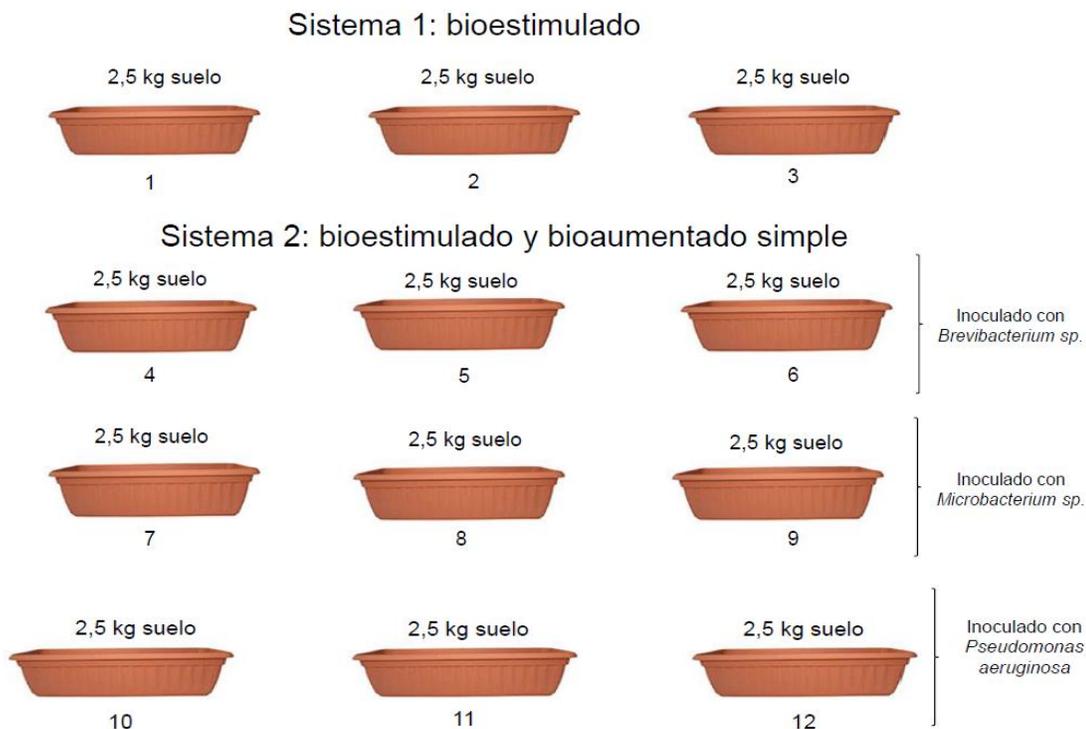


Figura 53: Diagrama para el ensayo en microcosmos con suelo contaminado de campo aproximadamente al 2%.

8.3.2.3 Seguimiento del ensayo

El seguimiento del ensayo se realizó cada 20 días aproximadamente y calculando 2 parámetros: el %HTP remanente en el suelo a medida que transcurre el tiempo, de igual manera que se calculó en el ensayo con arena y descrito en la sección 6.2 y el NMP de bacterias por gramo de suelo según la técnica descrita en la sección 7.3.

También se realizó el análisis de muestras del suelo luego de finalizado el ensayo, datos que se encuentran detallados en el anexo 8 Figura 8.6.

El riego fue esporádico de manera de reponer el agua perdida por evaporación y se rotó el suelo de manera de llevar aire y oxígeno al sistema para propiciar el desarrollo celular.

La temperatura durante el ensayo osciló entre 25 – 30 °C.

8.3.2.4 Resultados

El sustrato que se utilizó para preparar los microcosmos del ensayo II consistió en la mezcla de: A) una muestra de pasivo ambiental proveniente de una zona

petrolera que se describe en el Anexo 8 y que se denomina UNCo 1212 (norete) provista por EET SA y B) un suelo arcillo arenoso de barda sin contenido de HC. El material A es suelo contaminado con hidrocarburos producto de solidificación de lodos y recortes de perforación base oíl, consistente en mezcla de arcillas y material de desbaste de la perforación de pozos para la extracción de petróleo, contaminada con gas oíl, aceites livianos y distintos aditivos orgánicos e inorgánicos no determinados. La concentración de HTP, de nitrógeno y fósforo de la muestra UNCo 1212 se obtuvo mediante análisis químicos realizados en el laboratorio externo INDUSLAB SA detallada en el anexo 8 Figuras 8.4 y 8.5. La composición final del sustrato se logró mezclando cantidad necesaria de los materiales A y B para obtener un suelo contaminado con una composición de $2,2 \pm 0,2$ % de HTP. Este porcentaje de hidrocarburos inicial presente en el suelo se evaluó a través del método gravimétrico por triplicado. Cabe consignar que se decidió realizar esta primera prueba de biodegradación del contaminante utilizando una dilución de la muestra original porque la concentración de la misma superaba el 5% de HTP que es la cantidad sugerida por la Norma U.S. EPA, 1994 para ser tratada en biopilas.

Los microcosmos se monitorearon durante más de 200 días siguiendo el desarrollo de la biomasa y la degradación de los hidrocarburos totales de petróleo. Los resultados se presentan a continuación en las Figuras 54 y 55.

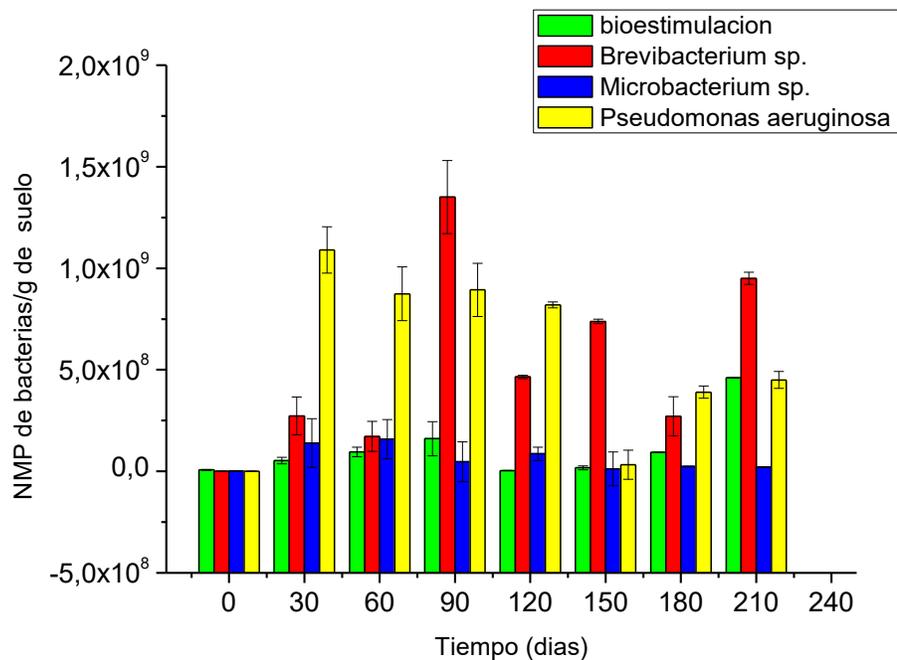


Figura 54: Evolución de la biomasa del suelo determinada por NMP bact/g suelo para el Ensayo II. Suelo arcilloso proveniente de un pasivo ambiental contaminado *in situ* con con 2,2±0,2% de petróleo.

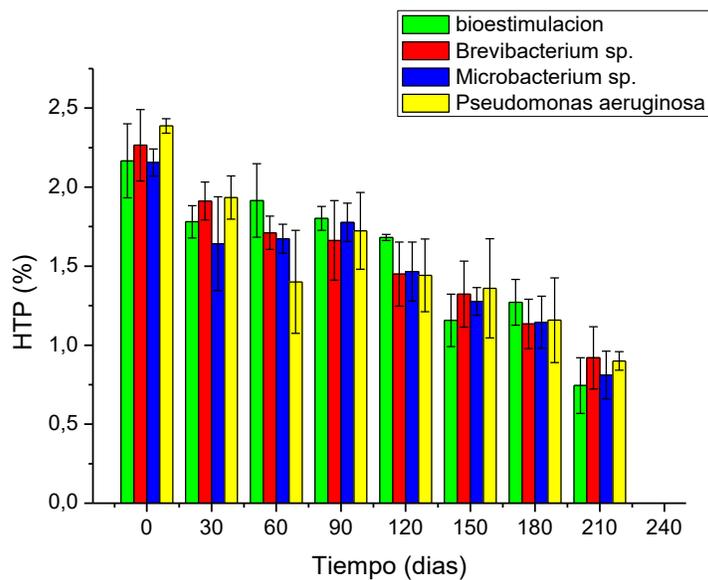


Figura 55: Evolución %HTP para el Ensayo II. Suelo arcilloso proveniente de un pasivo ambiental contaminado *in situ* con 2,2±0,2% de petróleo

Puede apreciarse que la biomasa se incrementó para el sistema inoculado con *Pseudomonas aeruginosa* entre los 0 y 60 días variando mucho el NMP respecto de las otras dos cepas inoculadas y del sistema estándar de bioestimulación. En el mismo período de tiempo la degradación de HTP fue más asentuada para *Pseudomonas aeruginosa* mientras que el resto si bien descendió la tendencia fue más errática ya que solo *Brevibacterium sp.* siempre se mantuvo a la baja en ese periodo de tiempo. Este comportamiento a favor de *Pseudomonas aeruginosa* se condice con su condición de cepa degradadora de HC ampliamente reportada (Zhao F. y col. 2018, García González y col; 2019, De La Rosa Martínez, D., 2020). Por otra parte es posible que este período sea de adaptación a la cantidad y tipo de hidrocarburos para las bacterias ya que en los microcosmos se encuentran en condiciones diferentes a las que fueron propagados los cultivos donde la aireación, la temperatura y los nutrientes estaban controlados.

Entre los 60 y 90 días se vió un incremento en la biomasa también para la cepa *Brevibacterium sp.* superando a *Pseudomonas aeruginosa* mientras que los HC sufren un incremento posiblemente asociado a liberación de parte del HC retenido en los intersticios de los componentes arcillosos del suelo que constituye los microcosmos.

A partir de los 90 días se observa una disminución marcada en los valores de hidrocarburos presentes en el suelo llegando luego de 210 días de ensayo a valores menores al 1% de HTP para todos los tratamientos siendo: Bioestimulación: 0,74%, Bioestimulación y bioaumentación simple: *Pseudomonas aeruginosa*: 0,90%, *Microbacterium sp.*: 0,81%, *Brevibacterium sp.*: 0,92%. No se puede establecer que tipo de tratamiento es más efectivo ya que hay mucha variabilidad en las determinaciones que se efectuaron por triplicado y las barras de error se superponen demostrando que las extracciones serían más o menos equivalentes. Como se indicó anteriormente, se realizó un análisis cromatográfico del suelo una vez finalizado el ensayo de manera de corroborar y comparar los % HTP remanentes. La muestra se identificó como 4D-UNC y los resultados se encuentran en el anexo 8, Figura 8.6. Se puede observar que este análisis arrojó valores de aproximadamente 0,7% de HTP, comparables a los obtenidos por

gravimetría en los diferentes sistemas planteados, cuyos valores oscilan entre 0,74 y 0,92% lo que demuestra la degradación del contaminante e utilización del mismo por los microorganismos. También queda demostrado la confiabilidad y utilidad del método gravimétrico al momento de realizar determinaciones de hidrocarburos en el medio cuando se deben trabajar con muchas muestras y no se tiene disponibilidad o acceso a los métodos cromatográficos.

Respecto a la biomasa, los mayores valores al final del ensayo se obtuvieron con el tratamiento de bioestimulación y *Pseudomonas auroginosa* en el orden de los $4,6 \times 10^8$ bact/g suelo y con el tratamiento con *Brevibacterium sp.* $9,5 \times 10^8$ bact/g suelo. La variabilidad en la biomasa indica la dificultad de implantación de los cultivos frente al contaminante mientras que en el ensayo de bioaumentación las especies presentes en el suelo ya estarían adaptadas tanto al ambiente contaminado como a los diferentes hidrocarburos que componen el contaminante, no obstante ello se aprecia la capacidad degradativa en los sistemas estudiados y se alcanzan los valores permitidos por la legislación vigente.

Del mismo modo que se hizo en el Ensayo I se realizaron determinaciones estadísticas para valorar las diferencias obtenidas en los porcentajes finales de hidrocarburos totales de petróleo para poder determinar si las diferencias obtenidas en los distintos sistemas eran o no significativas. Para el Ensayo II se pueden observar en el Anexo 9.5 los detalles de los diferentes cálculos volcados en las tablas y gráficos correspondientes. En esta oportunidad se evaluaron los puntos finales realizando el correspondiente Análisis de la Varianza (Suma de Cuadrados (SC) tipo III) y el Test de Bonferroni con $\text{Alfa}=0,05$ y $\text{DMS}=0,43553$. La verificación del supuesto de Normalidad se realizó a partir del test de Shapiro-Wilks (modificado) que arrojó como resultado una respuesta donde los datos se alejarían levemente de la Normalidad pero que si se trabaja con el logaritmo natural de la variable de respuesta se verifica normalidad. Mientras que para verificar la homogeneidad de la varianza se utilizó la Prueba de Levene y se comprobó ese supuesto.

A partir de los resultados obtenidos se pudo concluir que no existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos. Por lo tanto se corrobora lo

expresado más arriba cuando se discutieron los resultados para cada tipo de sistema bioaumentado y bioestimulado. No se consiguió una mejora significativa por acción de los inóculos externos adicionados a los sistemas bioaumentados respecto de la microbiota presente en los sistemas bioestimulados.

8.3.3 Ensayo III: Suelo arcilloso proveniente de un pasivo ambiental contaminado in situ con aproximadamente 6% de petróleo

8.3.3.1 Introducción

Una vez confirmada la actividad de las bacterias sobre el suelo contaminado con hidrocarburo del ensayo anterior con $2,2 \pm 0,2\%$ de HTP, se diseñó un ensayo de manera de probar la capacidad de las bacterias hidrocarburohíticas directamente sobre el suelo de pozo de extracción de petróleo provisto por la misma empresa que tiene mayor cantidad de contaminante para tratar de observar si se podía producir la degradación del hidrocarburo y en qué tiempo se alcanzarían los valores regulados por la legislación vigente. El ensayo se diseñó de la misma manera que el ensayo para arena, pero proponiendo solo dos sistemas: un sistema aplicando la técnica de bioaumentación y otro aplicando bioaumentación y bioestimulación simple inoculando cada sistema con una de las especies en estudio.

8.3.3.2 Armado del microcosmos

El armado de los microcosmos para esta etapa fue exactamente igual que en el ensayo para arena. Se pesó 2,5 kg aproximadamente de suelo contaminado para cada contenedor, se realizó un riego inicial con nutrientes calculando las cantidades de P, N y K en función de la cantidad de C presente en el suelo contaminados siguiendo la proporción establecida 100:10:1 en la norma USEPA y se homogeneizó, y se sembró cada sistema con una especie diferente luego de la propagación del inóculo.

El ensayo III se mantuvo en las mismas condiciones de humedad y temperatura que los anteriores ensayos rotando periódicamente el suelo para llevar aire a las zonas más alejadas de la superficie y de manera de llevar aire y oxígeno a las especies degradadoras.

8.3.3.3 Seguimiento del ensayo

Como en los sistemas anteriores, el seguimiento se realizó de la misma manera: cada 20 días se tomó una muestra y se determinó NMP de bact/g de suelo y %HTP remanente.

8.3.3.4 Resultados

El material a ensayar en los microcosmos consistió en suelo contaminado con hidrocarburos producto de solidificación de lodos y recortes de perforación base oíl, consistente en mezcla de arcillas y material de desbaste de la perforación de pozos para la extracción de petróleo, contaminada con gas oíl, aceites livianos y distintos aditivos orgánicos e inorgánicos no determinados descrito en el anexo 8, Figuras 8.4 y 8.5. El porcentaje de hidrocarburos inicial presente en el suelo se evaluó a través del método gravimétrico por triplicado y se obtuvo un valor promedio de $6,6 \pm 0,2\%$ de HTP. Este valor es acorde al valor reportado para la muestra en el análisis por cromatografía gaseosa en el laboratorio externo INDUSLAB SA según la norma EPA 418.1 que informa un valor de 62195,00 mg/kg para la cantidad de HTP (Anexo 8).

El Ensayo III se monitoreó durante más de 350 días siguiendo la evolución de la cantidad biomasa generada y de HTP degradada. Las Figuras 56 y 57 muestran los resultados de esta última etapa.

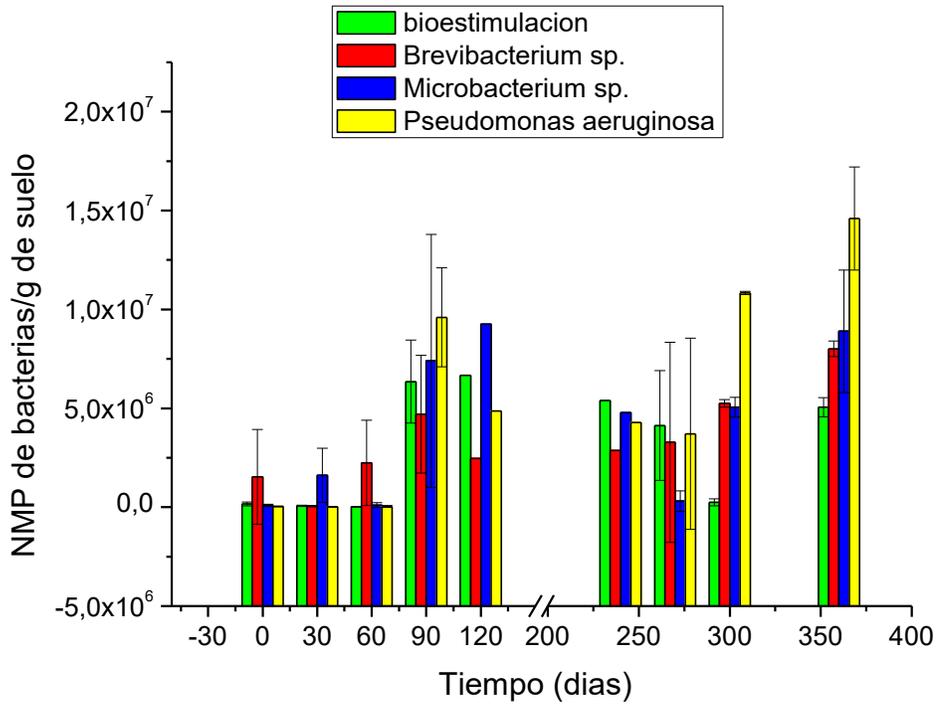


Figura 56: Evolución de la biomasa del suelo NMP bact/gr suelo para el ensayo III.

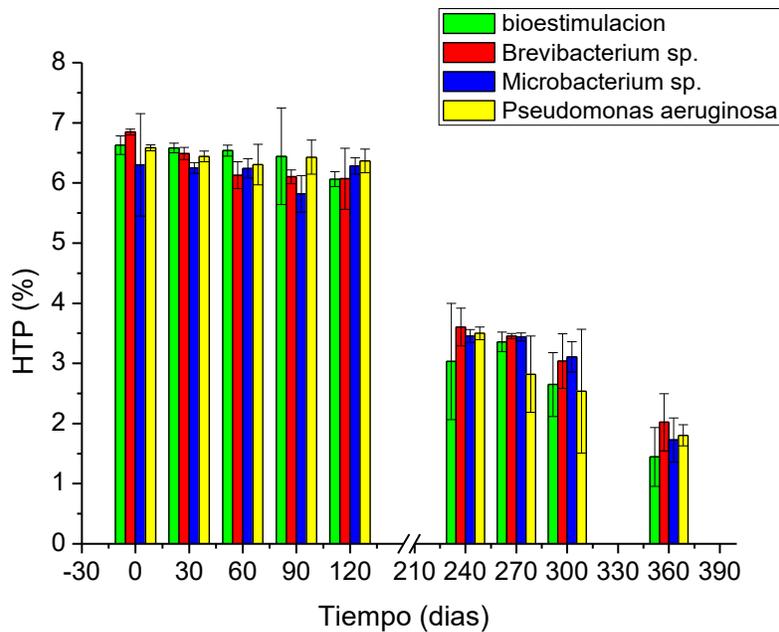


Figura 57: Evolución %HTP para el ensayo III

Durante los primeros 120 días del ensayo los muestreos llevados a cabo cada 30 días mostraron una cierta constancia en los valores de hidrocarburo determinados

los cuales oscilaron alrededor del valor inicial sin embargo se nota un aumento significativo de la biomasa transcurridos 90 días lo cual denota cierta tolerancia y adaptación de los cultivos inoculados y/o de las bacterias originalmente presentes en el suelo. Mas detalladamente se observa que la cuantificación de la biomasa durante los primeros 60 días no muestra un crecimiento significativo respecto de la cantidad inoculada considerando un periodo de latencia de los cultivos y/o adaptación a las condiciones de cada microcosmos y recién entre los 60 y 120 días se aprecia un incremento en el número de bacterias detectado en los resultados de NMP en ese período. Sin embargo ese incremento no se refleja en un efectivo desenso en la cantidad de hidrocarburo contenido en la muestra de suelo contaminado con restos de petróleo. Cabe consignar que se puede observar una cierta recalcitrancia a la degradación de la muestra analizada porque se trata de un pasivo contaminado mucho tiempo antes de que llegue a nuestros laboratorios lo que hace que las fracciones mas livianas del petróleo se hayan evaporado y el remanente sean hidrocarburos mas pesados y mas fuertemente adheridos a las fases arcillosas que presentan poros donde es alojado y retenido el HC remanente.

A partir de los 120 días el sistema se deja 100 días sin muestrear manteniendo el riego y la rotación del suelo para garantizar la aireación y se retoma el muestreo a los 240 días. A partir de ese momento se produjo un aumento en la biomasa producida por las bacterias que es acompañado de la reducción del contaminante, este hecho denota condiciones ambientales más propicias para los microorganismos debido a la disminución del hidrocarburo en el suelo. Luego fluctúa hasta el final del ensayo, posiblemente debido a la adaptación de las bacterias a los remanentes de contaminantes usados como fuente de carbono.

Al final del ensayo, habiendo pasado 360 días la biomasa producida por *Microbacterium sp* y por el tratamiento con bioestimulación fueron los más altos con valores de $2,4 \times 10^6$ y $1,6 \times 10^6$ bact/g de suelo respectivamente repitiéndose la tendencia de los ensayos previos donde estos dos tratamientos dieron los valores más altos de biomasa.

Respecto a los valores de concentración de hidrocarburos y el tiempo que duró el ensayo se considera que la disminución fue satisfactoria alcanzándose los siguientes valores por tratamiento:

Bioestimulación: 1,24%

Bioestimulación y bioaumentación simple: *Pseudomonas aeruginosa*: 1.10%, *Microbacterium sp.*: 1,11%, *Brevibacterium sp.*: 1,56%. Estos valores superan el 1% de hidrocarburos en el suelo y nuevamente no difieren del tratamiento con bioestimulación, lo que demostraría el beneficio de este por sobre los sistemas inoculados.

En el Ensayo III, al igual que en los casos anteriores, se aplicaron cálculos estadísticos para valorar las diferencias obtenidas en los contenidos de HTP remanente en cada sistema analizado y se pueden ver en el Anexo 9.6. En este caso particular se realizó el Análisis de la Varianza (SC tipo III) y se aplicó el Test de Tukey con Alfa=0,05 y DMS=0,97365. A partir de los resultados se pudo verificar que no existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos. Adicionalmente se verificaron los supuestos de Normalidad mediante el test de Shapiro-Wilks (modificado) y el supuesto de la Homogeneidad de la Varianza mediante la Prueba de Levene que permitieron asumir la Normalidad de los datos y la Homogeneidad de la Varianza.

Cabe destacar que si comparamos el ensayo III con el realizado previamente con una concentración inicial de hidrocarburo del $2,2 \pm 0,2\%$ podemos ver que solo difieren en aproximadamente un 0,5% de HTP, por lo que puede concluirse que si bien se demoró más tiempo, las bacterias fueron capaces de degradar a pesar de tan alta concentración inicial de HTP. Estos resultados que muestran una capacidad para degradar suelos con alta carga son auspiciosos ya que cuando las empresas ambientales pretenden hacer biorremediación en pilas generalmente tienen que bajar el porcentaje de hidrocarburo diluyendo con suelo no contaminado a los suelos que traen del sitio donde se producen los derrames hasta lograr tenores de contaminación donde los microorganismos no sean inhibidos por los contaminantes.

8.4 Conclusiones

8.4.1 Ensayo I. Suelo Arenoso contaminado ex situ con aproximadamente 4,0% de gasoil

- ✚ Se pudo comprobar que las cepas *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbacterium sp.* y *Brevibacterium sp.* manifestaron capacidad para metabolizar gasoil. Esta adaptabilidad al contaminante que se tradujo en una disminución en la concentración del HC presente en la muestra se vio favorecida porque el gasoil es un derivado del petróleo compuesto mayoritariamente por moléculas alifáticas de fácil degradación.
- ✚ El relativamente corto tiempo (180 días) requerido para obtener una disminución del hidrocarburo originalmente presente en la muestras hasta alcanzar valores por debajo del 1% se puede atribuir a dos factores, en primer lugar el sustrato utilizado (arena comercial) es un sólido no poroso y en segundo lugar había sido contaminado en el laboratorio justo antes del armado de los microcosmos por lo tanto la biodisponibilidad del gasoil fue alta al no quedar retenido en el interior del residuo ni haber sido transformado en compuestos más recalcitrantes producto de una exposición a los factores ambientales más prolongada en el transcurso del tiempo.
- ✚ Los microcosmos donde se llevaron a cabo los tratamientos de bioestimulación para el sustrato arena contaminada con gasoil dejaron una cantidad remanente de HC superior al 2,5% acorde a la baja presencia de bacterias hidrocarburohólicas presentes en el sustrato. Por lo tanto los tratamientos de bioestimulación fueron menos eficientes que los tratamientos de bioaumentación.
- ✚ No se pudo comprobar sinergia positiva para la degradación de HC aportada por la acción colectiva de las diferentes cepas en el cultivo mixto en relación a las cepas individuales en los ensayos de bioaumentación y bioestimulación.
- ✚ Los resultados fueron corroborados mediante la utilización de métodos estadísticos para evaluar las diferencias aplicando específicamente el

análisis de la Varianza y los test correspondientes para la ponderación de medias

8.4.2 Ensayo II con suelo contaminado *in situ* aproximadamente al 2,5%

- ✚ La concentración inicial de HTP presente en los suelos contaminados *in situ* fue analizada mediante técnicas gravimétricas y cromatográficas. Los valores obtenidos como resultado por ambas metodologías de análisis fueron similares convalidándose de este modo las técnicas gravimétricas propuestas.
- ✚ Se pudo comprobar que las cepas *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbacterium sp.* y *Brevibacterium sp.* manifestaron capacidad para metabolizar un residuo de petróleo contenido en suelo arcilloso contaminado *in situ* y con larga exposición a factores ambientales.
- ✚ En este ensayo se ha observado que en todos los microcosmos (bioestimulación y bioaumentación) se alcanzó una degradación de los HTP presentes en la matriz sólida, llevándolos desde una concentración inicial cercana al 2,5% hasta alcanzar concentraciones cercanas al 1% que es la condición necesaria para alcanzar los límites aceptados para su disposición final en un período de 210 días.
- ✚ Los valores obtenidos en este ensayo fueron sometidos a análisis estadísticos (Análisis de Varianza por SC de tipo III y Test de Bonferroni) para evaluar sus diferencias y los test correspondientes para la ponderación de medias.
- ✚ No obstante la degradación de HTP alcanzada en los todos microcosmos ensayados no se pudo comprobar una ventaja cuantitativa en los sistemas bioaumentados respecto de los bioestimulados. Se comprobó que en el rango de las condiciones ensayadas son bajas las posibilidades de implantación del inóculo exógeno frente a las bacterias nativas ya adaptadas al suelo y tipo de sustrato.

8.4.3 Ensayo III con suelo contaminado *in situ* al 6.5%

- ✚ Se pudo comprobar que las cepas *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbacterium sp.* y *Brevibacterium sp.* manifestaron capacidad para metabolizar los HTP en suelo contaminado *in situ* al 6,5%
- ✚ En todos los ensayos mostraron marcadas disminuciones del contaminante y un aumento del NMP relacionado a dicha disminución por lo que se puede concluir que a pesar de la complejidad del residuo pudo ser utilizado como fuente de carbono.
- ✚ Al final del ensayo, los valores obtenidos de %HTP remanentes fueron cercanos al 1%, resultados que fueron debidamente analizados por métodos estadísticos para corroborar las diferencias entre tratamientos (Análisis de la Varianza (SC tipo III) y Test de Tukey) y los correspondientes para Normalidad y Homogeneidad de la Varianza.
- ✚ El tiempo estimado para alcanzar los valores de disposición final (1% de HTP) fue mayor a los 365 días de ensayo. Sin embargo este resultado puede verse como alentador si se toma en cuenta que el punto de partida tenía alta concentración de HTP (6,5%) cantidad mayor a la recomendada usualmente para la confección de biopilas. La capacidad degradativa de los cultivos seleccionados permiten diseñar ensayos evitando la dilución del contaminante con tierra libre de residuos de petróleo y por lo tanto ser más sostenibles.

PARTE E: CONCLUSIONES Y
PERSPECTIVAS

CAPITULO 9: CONCLUSIONES
GENERALES

9.1 Conclusiones generales

Mediante la realización de este trabajo de tesis se logró el aislamiento de 36 cepas bacterianas procedentes del sitio Zapala y 20 cepas bacterianas procedentes del sitio Huincul. Todos los cultivos se desarrollaron en medios selectivos que propiciaron el crecimiento de los microorganismos con capacidades hidrocarburolicas.

Se realizaron cultivos en medios sólidos nutritivos, tinciones de Gram y observaciones mediante microscopía óptica tradicional para caracterizar la morfología de las colonias y de las bacterias aisladas. Adicionalmente se realizaron baterías de pruebas bioquímicas a los efectos de conocer los perfiles metabólicos e intentar agrupamientos de los individuos que compartirán características similares.

Se comprobó la capacidad para degradar diferentes hidrocarburos (kerosen, gasoil, antraceno, bifenilo y naftaleno) de todas las cepas analizadas y se seleccionaron las más eficientes. Adicionalmente se realizaron pruebas de hidrofobicidad para hidrocarburos puros y comerciales pudiendo seleccionarse de este modo, un pool de cepas (Z8, H1, H6 y Pa41) que se consideraron más eficientes para ser aplicadas en los ensayos de microcosmos.

Para realizar la caracterización y clasificación filogenética de las 4 cepas mencionadas se aplicaron técnicas moleculares que arrojaron los siguientes resultados: *Pseudomonas aeruginosa* (Z8), *Microbacterium sp.*(H1), *Brevibacterium sp.* (H6), *Pseudomonas Putida* (Pa41).

Cabe consignar que se destaca la presencia de cepas del género *Pseudomonas sp.*, especie ampliamente reportada como excelente degradadora de hidrocarburos, y se confirman los resultados previamente obtenidos en la prueba en medio Cetrimide, Por otra parte las especies *Brevibacterium sp.* y *Microbacterium sp.*, debieron diferenciarse por una prueba de concentración salina

de manera adicional a las técnicas moleculares. Estas especies si bien no son frecuentemente reportadas en ambientes asociados a la actividad petrolera como *Pseudomonas sp.* demostraron, en el presente trabajo, capacidad hidrocarburofítica apropiadas para los objetivos planteados.

Las cuatro cepas caracterizadas se utilizaron para realizar ensayos en microcosmos y realizar el seguimiento en cinéticas de degradación para la remediación de suelos contaminados *in situ* con gasoil y *ex situ* a partir de suelos de pasivos ambientales con residuos de petróleo

A continuación se reportan los principales resultados obtenidos en los tres ensayos de biodegradación en microcosmos:

El ensayo I (sustrato arena comercial contaminada *ex situ* al 4% con gasoil) demostró que las cepas aisladas tienen una rápida y buena adaptabilidad al sustrato contaminado y los valores finales de %HTP remanentes en el suelo en todos los sistemas alcanzaron concentraciones inferiores al límite de disposición final (0,83 – 0,85%) en 180 días.

Comparando los sistemas con inóculos simples con el sistema mixto, se determinó que los más eficientes para degradar gasoil fueron los sistemas inoculados con *Pseudomonas putida* y *Brevibacterium sp.* los cuales alcanzaron valores de degradación de gasoil del 0,83% de HTP. Estos valores son levemente más bajos a los obtenidos para los sistemas de *Pseudomonas aeruginosa* y sistema mixto (0,96% HTP) lo que lleva a concluir que todos los sistemas evaluados fueron aptos para estas técnicas de biorremediación ya que todos alcanzan valores menores a los permitidos para la disposición final del residuo.

Los sistemas inoculados con cultivos mixtos no demostraron sinergia positiva en la degradación de hidrocarburos en comparación con los sistemas inoculados con una única especie bacteriana.

Para el ensayo II, considerando que se utilizó como sustrato un suelo contaminado *in situ* con el 2,5% de HTP, con compuestos de petróleo proveniente de un derrame real acontecido en el pasado, se constató que todas las cepas se

desarrollaron en forma comparable en remoción a los ensayos con arena, confirmándose así, el perfil hidrocarburo lítico de las bacterias utilizadas y su utilidad para degradar residuos más recalcitrantes, complejos y adsorbidos más fuertemente al sustrato.

En el ensayo III, suelo contaminado *in situ* con 6,5% de HTP proveniente de derrame antiguo, se comprobó que la adaptación de las cepas bacterianas fue más lenta que en los restantes ensayos por ser éste un escenario más hostil. Se logró disminuir el contaminante a valores cercanos al 1% en aproximadamente 350 días, lo que presenta una ventaja en el uso de estas especies en ambientes con porcentajes superiores al 5% de HTP.

Todos los resultados de los ensayos fueron sometidos a análisis estadísticos correspondientes (ver anexos 9.4, 9.5 y 9.6) ratificándose las diferencias significativas o no obtenidas entre los tratamientos aplicados.

Comparando los 3 ensayos, no se logró mejorar el tiempo de degradación a valores del 1% de HTP a menos de 12 meses ni se pudo optimizar un consorcio bacteriano que sea más eficiente que la bioestimulación, estos resultados desalientan la inoculación externa y no se justificaría aplicar la bioaumentación frente a la bioestimulación dado los mayores costos de aplicar dichas técnicas y los rendimientos finales similares.

Si bien no se logró encontrar un consorcio que supere su eficiencia frente a los sistemas bioestimulados, el presente trabajo recopila y detalla exhaustivamente técnicas analíticas, microbiológicas y moleculares para ser aplicadas en el aislamiento, identificación y análisis de la capacidad degradativa de las especies hidrocarburo líticas de un ambiente contaminado.

CAPITULO 10: PERSPECTIVAS

10.1 Perspectivas

Finalizado el presente trabajo, se incluyen algunas consideraciones a tener en cuenta en futuros trabajos:

Considerando que se tiene un conjunto de bacterias identificadas molecularmente sería de interés analizar en profundidad los diferentes mecanismos de acción utilizados por cada cepa estudiada respecto de la degradación de hidrocarburos (enzimas utilizadas, biosurfactantes, ramnolípidos, etc).

A los efectos de evaluar la evolución de los compuestos contenidos en la mezcla inicial de contaminantes durante el ensayo se propone la utilización de métodos analíticos (que no pudieron ser utilizados de manera extensiva en la presente tesis) que permitan la identificación de los compuestos residuales producto de la degradación y poder así evaluar su toxicidad de esos componentes generados para las bacterias.

En los ensayos para evaluar consorcios, se recomienda también realizar un seguimiento de la sucesión de las especies en los ensayos de manera de detectar mecanismos r o k y de esa manera conocer a fondo el comportamiento del consorcio planeado. También ayudaría a proponer mecanismos para potenciar la degradación del contaminante favoreciendo a cada especie en su lugar dentro de la sucesión.

Haciendo uso de las nuevas herramientas de secuenciación molecular y considerando que la degradación de los suelos a campo se realiza de manera *in situ* a partir de la modificación de la legislación, se podría evaluar a campo la variabilidad de especies dentro del ambiente y comportamiento de manera de poder comparar con los estudios de laboratorio.

PARTE F: ANEXOS, BIBLIOGRAFIA
REFERENCIAS.

ANEXOS

ANEXO 1: MEDIOS DE CULTIVO, ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO Y CONSERVACION DE CEPAS

1.1 Medio de Cultivo Bushnell-Haas (BH)

Cantidades correspondientes a 1000 ml de agua destilada.

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 0 g
CaCl ₂ .H ₂ O	0,020g
KH ₂ PO ₄	1,00 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,00 g
KNO ₃	1,00 g
FeCl ₃	0,05 g
Resazurina	0,01x10 ⁻² g

Se esteriliza en autoclave a 1,5 atmósferas de presión (121 °C) durante 20 minutos.

1.2 Medio de Cultivo Luria-Bertani (LB).

Cantidades correspondientes a 1000 ml de agua destilada.

Extracto de levadura	5,0 g
Pluripeptona	10,0 g
NaCl	10,0 g
Agar	20,0 g

El pH debe ser aproximadamente neutro (pH 7) y puede ser ajustado con una solución de NaOH o HCl 10% m/v.

Se esteriliza en autoclave a 1,5 atmósferas de presión (121 °C) durante 20 minutos.

1.3 Enriquecimiento y propagación de las muestras

Los materiales y métodos se detallan a continuación:

- ✚ Muestras de agua (10ml) y/o suelo (1g) contaminadas con hidrocarburos
- ✚ Medio Bushnell y Haas (BH) (ver Anexo 1.1)

- ✚ Kerosene
- ✚ Erlenmeyer de 200 ml
- ✚ Agitador rotatorio
- ✚ Cámara de cultivo

Se colocaron 70 u 80 ml de medio BH (según corresponda al estado de la muestra original) en sendos Erlenmeyers y se adicionó a cada uno 10 ml de kerosene como fuente de carbono y energía para enriquecimiento y propagación de los microorganismos. Cada sistema fue inoculado con la sub-muestra correspondiente y se incubaron en cámara de cultivo a 30 °C por un período de 7 días en agitador rotatorio a 100 rpm.

1.4 Aislamiento de bacterias hidrocarburolicás

Se utilizaron los materiales, medios de cultivo y procedimientos que se detallan a continuación:

- ✚ Medio Luria Bertani en tubo de ensayo (9 ml)
- ✚ Tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril para dilución
- ✚ Placas de Petri
- ✚ Aislamientos de la parte 1
- ✚ Cámara de incubación
- ✚ Pipetas automáticas de 0,1 – 1 ml.
- ✚ Baño termostatzado a 45 °C
- ✚ Tips

En primer lugar se prepara un batería apropiada de diluciones seriales para lograr suspensiones bacterianas que tengan una concentración entre 10^7 y 10^8 bact/ml. A tal efecto se tomó 1 ml de cada cultivo enriquecido y se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril y se homogeneizó enérgicamente. A partir de este tubo se hace la dilución siguiente, y de ésta la próxima hasta tener concentración adecuada expresada en bact/ml. Posteriormente, se sembró en sendas placas de Petri 1 ml tanto de cada una de las diluciones obtenidas como

de la suspensión celular de enriquecimiento sin diluir. Seguidamente, se vertió medio LB fundido en cada placa de Petri y se homogeneizó con movimientos circulares suaves. Todas las placas se mantuvieron en incubación entre 24-36 h a 30 °C. Transcurrido ese período de tiempo, se procedió al aislamiento de colonias bacterianas, seleccionándolas en función de su color, forma, consistencia, etc. y se procedió a la propagación de cada cultivo sembrándolos en tubos o placas con LB sólido.

1.5 Conservación de cepas hidrocarburoclíticas aisladas

Se utilizaron los siguientes materiales:

- ✚ Placas de Petri con cultivo bacteriano a conservar
- ✚ Eppendorf de 2 ml con solución de glicerol al 10% estériles
- ✚ vortex
- ✚ Ansa
- ✚ Mechero
- ✚ Algodón
- ✚ Alcohol 70%

Se seleccionaron las placas que mostraron buen desarrollo y de cada una de ellas se tomó con un ansa la mayor cantidad de biomasa posible y se transfirió a un tubo Eppendorf con glicerol. Cada tubo se homogeneizó utilizando un vortex para mejorar el contacto entre la biomasa y el glicerol, se rotuló y se conservó en un refrigerador a -20 °C de temperatura.

ANEXO 2: CUANTIFICACION MICROBIANA

La cuantificación bacteriana se llevó a cabo utilizando los siguientes materiales:

- ✚ Cámara Thoma con cubre-objeto
- ✚ Tubos con agua destilada estéril
- ✚ Muestras
- ✚ Microscopio óptico con dispositivo de constaste de fase Bausch y Lomb T129080
- ✚ Ansas
- ✚ Mechero
- ✚ Alcohol 70%
- ✚ Algodón
- ✚ Fósforos

El procedimiento para realizar el recuento celular comenzó con la preparación (limpieza y carga) de la Cámara de Thoma. Se colocó un cubre objeto sobre la cámara fijando sus bordes. Se homogenizó la muestra a cuantificar y se tomó una gota con ansa. Se posicionó en forma vertical la cámara y se apoyó el ansa donde se contacta el cubre-objeto con la superficie de la cámara de manera tal que se libere la gota de cultivo contenida en el ansa en el espacio existente entre el vidrio de la cámara y el cubre-objeto, el cual es llenado de líquido por capilaridad. Posteriormente se llevó la cámara cargada al microscopio y se observó el cultivo con aumento de 40X. El procedimiento para realizar el conteo se encuentra detallado en el Anexo 2.1: Recuento en cámara Thoma.

2.1 Recuento en Cámara Thoma

Organización de la cámara:

- ✚ Cuadrado grande: 1 mm^2
- ✚ Cuadrado mediano (16/cuadrado grande): $0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ mm} = 0,0625 \text{ mm}^2$
- ✚ Cuadrados pequeños (25/cuadrado mediano) $0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm} = 0,0025 \text{ mm}^2$

NOTA: Es importante notar que las celdas medianas se subdividen en 25 celdas (9 de los cuales están divididos por la mitad) y no en 16. Se deben contar todas las células incluidas en las 25 celdas pequeñas.

Al colocar la muestra bajo el cubreobjetos, la suspensión celular alcanza una altura de 0,02 mm. Teniendo estos datos en cuenta, y si se considera el cuadrado grande central, el volumen contenido en éste será de:

$$1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,02 \text{ mm} = 0,02 \text{ mm}^3 = 2 \times 10^{-5} \text{ ml}$$

$$(1 \text{ ml} = 1000 \text{ mm}^3)$$

Recuento de células:

Con el objetivo 10X del microscopio se localiza la zona de recuento. Para contar las células se cambia al objetivo 40X. Se cuentan las células contenidas en 5 de los 16 cuadrados medianos (las cuatro esquinas y una central) de acuerdo con el siguiente criterio:

Se cuentan y se suman todas las células que están dentro de los cuadrados medianos seleccionados incluyendo aquellas que están tocando los lados superior y derecho de dichos cuadrados (aunque estén parcialmente fuera). Siguiendo este criterio, en la Figura se cuentan las células en color verde, y no se cuentan las células en color rojo.

Como ejemplo, si se han contabilizado n células en los 5 cuadrados medianos seleccionados, se extrapola a la totalidad de los cuadros, equivalente al cuadrado grande, haciendo la siguiente operación:

$$\frac{\sum (\text{células de 5 cuadrados medianos})}{5} \times 16 = N (\text{n}^\circ \text{ de células en cuadrado grande}) \times f$$

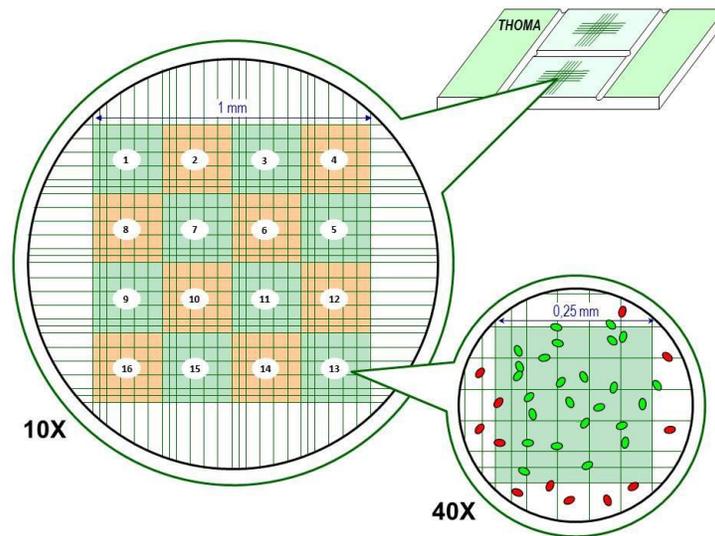
Si para hacer el recuento se ha tenido que concentrar o diluir la muestra inicial, se debe de tener en cuenta este factor (f):

Para extrapolar el número de células en 1 ml se realiza el siguiente cálculo:

$$\text{Número de células/mL} = \frac{N \times f}{2 \times 10^{-5} \text{ mL}}$$

La función simplificada sería:

$$N^{\circ} \text{ células/ml} = \Sigma(\text{células de 5 cuadrados medianos} \times f) \times 1,6 \times 10^5$$



ANEXO 3: PRUEBAS BIOQUIMICAS

3.1 TSI

Materiales:

- ✚ Tubos con medio TSI en pico de flauta
- ✚ Tubo con cepa bacteriana
- ✚ Aguja
- ✚ Mechero

Con la aguja se toma una porción del cultivo y se siembran los tubos de TSI por punción y estría (punción hacia el fondo del tubo y estría sobre el pico de flauta).

Se lleva a estufa por 24 h a temperatura de 37 °C

Esta prueba determina la capacidad de un microorganismo de metabolizar los hidratos de carbono incorporados a un medio de crecimiento básico, junto con la posibilidad de detectar la producción de SH_2 .

El medio contiene el agregado de 3 azúcares: glucosa, lactosa y sacarosa. El microorganismo sembrado podrá metabolizar los azúcares por fermentación (en anaerobiosis) o por oxidación (en aerobiosis). Además contiene sulfato ferroso o sulfato de hierro y amonio que al reaccionar con el SH_2 da SFe que ennegrece el medio.

Lectura:

-Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.

-Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.

-Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): el microorganismo es no fermentador de azúcares.

-La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas.

-El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

3.2 Catalasa

Materiales.

- ✚ tubo de ensayo con cepa bacteriana
- ✚ ansa
- ✚ agua oxigenada (10 volúmenes)
- ✚ portaobjetos

Esta prueba se realiza colocando una gota de H_2O_2 (agua oxigenada) de 10 volúmenes en el centro de un portaobjeto limpio.

Con una aguja se levanta el centro de la colonia en estudio y se la diluye en el H_2O_2 . La prueba es positiva cuando de inmediato aparece un burbujeo que indica el desprendimiento de O_2 .

Si el burbujeo aparece luego de 5-10 segundos, la prueba es considerada (-). El peróxido de hidrógeno es muy inestable y por lo tanto se recomienda un control de calidad del producto antes de ser usado.

Se comprueba así la presencia de la enzima catalasa, la cual cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Esta enzima está presente en bacterias aerobias y en la mayoría de las anaerobias facultativas que poseen el sistema citocromo.

3.3 Oxidasa

Los microorganismos que poseen la enzima citocromo- c- oxidasa en su cadena respiratoria, se evidencian porque en presencia de oxígeno atmosférico y citocromo c, se oxida el sustrato presente (oxalato de dimetil- para-fenilendiamina) en los discos a un compuesto de color rosa o fucsia.

Materiales:

- ✚ Tubo de ensayo con cultivo bacteriano a ensayar.
- ✚ Tubos de ensayo limpios con 0,2 ml de agua destilada estéril
- ✚ Discos de oxidasa
- ✚ Ansa
- ✚ Mechero

Se toma una ansada del cultivo a determinar y se hace una suspensión en un tubo de ensayo con 0,2 ml de agua destilada estéril

Se coloca el disco de oxidasa y se deja reposar 1 minuto.

Lectura:

Positivo: coloración rosado o fucsia en el disco y/o solución

Negativo: el disco permanece sin cambios de color

3.4 OF (Diferenciación entre fermentación y oxidación de carbohidratos (glucosa))

Materiales:

- ✚ Tubo de ensayo con cultivo bacteriano a ensayar.
- ✚ 2 tubos de con 5 ml de medio de cultivo Hugh y Leifson.
- ✚ Aguja
- ✚ Mechero

Se toma una muestra de la bacteria con la aguja y en cada uno de los tubos se siembra por punción introduciendo la aguja con la muestra hasta 3 mm del fondo del tubo. Luego, a uno de los tubos se le agrega un tapón de VAS-PAR estéril para generar condiciones de anaerobiosis. Se incuba a 35 °C 48 h o más. Algunos microorganismos pueden necesitar hasta 14 días.

La lectura se realiza teniendo en cuenta el siguiente criterio:

REACCIÓN	TUBOS CON REACCIÓN	TUBO ABIERTO	TUBO CERRADO
Oxidación	Abierto	Amarillo (A)	Verde (-)
Fermentación	Cerrado	Amarillo	Amarillo (A)
	Cerrado	Amarillo (AG)	Amarillo (AG)
Sin oxidación o fermentación	Ninguna	Azul o Verde (-)	Verde (-)

3.5 Hidrólisis de almidón

Materiales:

- ✚ placas de Petri con ARP y 1% de almidón
- ✚ tubo con cepa bacteriana
- ✚ solución de Lugol
- ✚ ansa
- ✚ mechero

Se toma con el ansa una porción del cultivo bacteriano y se realiza una estría central en la placa.

Se lleva a incubación 48 h a temperatura de 37°C.

Esta prueba determina la acción de la enzima amilasa sobre el almidón, que es un polisacárido complejo que al hidrolizarse produce dextrinas, maltosa y glucosa. La capacidad de un microorganismo para hidrolizar almidón depende de la producción de la enzima amilasa. Esta rompe específicamente las uniones α - 1-4 del homopolímero de la glucosa.

Para interpretar el resultado se realiza una reacción de reconocimiento del sustrato para lo cual, luego de la incubación, se inunda la placa con una solución de Lugol: si el microorganismo ha hidrolizado el almidón, se observará una zona clara alrededor de la estría, lo que indica prueba (+). El resto de la superficie se colorea de azul. Puede ocurrir que la reacción del almidón de una coloración parda, lo que es debido a que el almidón esté parcialmente hidrolizado.

3.6 Cetrímide

El agar cetrímide es un medio de cultivo específico para poner en evidencia la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Tiene en su composición “Bromuro de cetil trimetil amonio” (cetrímide), que inhibe notablemente la flora acompañante.

Las cepas de *P. aeruginosa* liberan pigmento piocianina, el cual es fluorescente bajo luz uv.

Materiales:

- ✚ Placas de Petri con agar cetrímide

- ✚ Tubo con cepa bacteriana
- ✚ Fuente de luz UV para la lectura
- ✚ Ansa
- ✚ Mechero

Se toma una ansada del cultivo y se hace una estría central en la caja de Petri.

Se lleva a incubación a 37°C por 72 h.

Lectura:

Se observa el crecimiento en la placa y se verifica la producción de piocianina bajo la fuente de luz uv.

3.7 BAM

Permite la diferenciación de miembros de la familia *Enterobacteriaceae* en función de su comportamiento frente a la lactosa y la urea, producción de indol, SH₂ y movilidad.

Como indicadores tiene: indicador de Andrade (fucsina ácida en NaOH y H₂O destilada) que acusa la acidificación del medio al fermentar la lactosa (pasa a rojo) y azul de timol que pone de manifiesto la alcalinización del medio debido al desdoblamiento de la urea (pasa a azul).

Es un agar semisólido que se siembra por punción, lo que permite ver la movilidad de los gérmenes.

Para detectar producción de SH₂ se utiliza una tirita de papel de filtro estéril embebida en una solución de acetato de plomo.

Materiales:

- ✚ Tubo de ensayo con cultivo bacteriano a ensayar.
- ✚ Tubos de con 5 ml de medio de cultivo BAM.
- ✚ Tiras de papel de filtro estériles con acetato de Pb
- ✚ Aguja
- ✚ Mechero

Se toma una muestra de la bacteria con la aguja y en cada uno de los tubos se siembra por punción introduciendo la aguja con la muestra hasta 3 mm del fondo del tubo.

Se introduce un papel de filtro haciendo un dobléz en la punta de aproximadamente 1 cm y se coloca con el dobléz sobre la boca del tubo dejando la parte más larga dentro del mismo teniendo la precaución de que el papel no toque la superficie del medio

Se incuba a 35 °C de 24 a 96 h observando diariamente los cambios de color.

Lectura:

Metabolismo de lactosa y actividad ureasa: Se evidencia por el color observado en el medio de cultivo:

- Fermentación de lactosa negativo, ureasa negativo: verde amarillento
- Fermentación de lactosa positivo, ureasa negativo: amarillo, naranja, rosado, rojo.
- Fermentación de lactosa negativo, ureasa positivo: azul violáceo, azul verdoso.

Producción de ácido sulfhídrico:

- Positivo: papel de filtro: ennegrecido.
- Negativo: ausencia de ennegrecimiento en el papel de filtro.

Movilidad:

- Positiva: presencia de turbidez que se extiende más allá de la línea de siembra.
- Negativa: solo se observa turbidez en la línea de siembra.

3.8 Producción de indol

Materiales:

-  Tubos con 5 ml caldo triptonado.
-  Cultivo celular
-  Ansa
-  Alcohol 70%
-  Algodón
-  Mechero

Con el ansa se toma una porción del cultivo celular y se siembra en el medio.

Se incuba a 37 °C de 2 a 7 días.

Lectura:

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se utiliza reactivo de Kovacs para evidenciar la reacción positiva.

Se agrega al cultivo desarrollado 0,5 ml del reactivo. Se agita suavemente, se deja reposar, se separa la capa alcohólica y la acuosa. Si la reacción es indol (+) la capa alcohólica toma color rojo.

3.9 MRVP (reacción de rojo de metilo y Vogues Proskauer)

El medio de cultivo usado es el de Clark y Lubs (Caldo MR-VP).

3.9.1 Reacción del rojo de metilo

Determina la capacidad de un microorganismo de formar productos ácidos a partir de la fermentación de la glucosa y mantenerlos, venciendo la capacidad amortiguadora del sistema.

El indicador de pH es rojo de metilo (0,1 g de RM en 300 ml de Et-OH 95° más 200 ml de agua destilada).

Para realizar la prueba se retiran 2,5 ml del cultivo al cual se agregan 5 gotas del indicador.

Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

- Prueba (+): color rojo pH 4,4
- Prueba (-): color amarillo pH 6

En un tiempo de incubación de 18-48 h todos los miembros de esa familia darán la prueba positiva, pero en un tiempo de incubación mayor (4-5 días) como exige la técnica, aquellos microorganismos que son (+) continúan produciendo más ácido venciendo el sistema amortiguador del fosfato y manteniendo el pH bajo.

Los organismos RM (-) continúan metabolizando los productos iniciales de la fermentación, dando productos neutros que disminuyen la acidez aumentando el pH hacia la neutralidad.

La validez de esta prueba depende del tiempo de incubación para permitir que se produzca la diferencia en el metabolismo de la glucosa.

Control (+): *Escherichia coli*. Control (-): *Klebsiella*

3.9.2 Reacción de Vogues -Proskauer (VP)

Determina la capacidad de un microorganismo de producir acetilmetilcarbilol como producto final de la fermentación de la glucosa. Los productos finales son compuestos neutros como el 2,3- butanodiol y el etanol produciéndose además acetoína (acetilmetilcarbilol) como intermediario.

En presencia de oxígeno atmosférico estos productos neutros se oxidan a diacetilo que es en definitiva el responsable de la reacción colorimétrica de reconocimiento. El medio de cultivo usado es el de Clark y Lubs (Caldo MR-VP). La incubación se lleva a cabo hasta 4 días a 37 °C. Para realizar la prueba se retiran 2,5 ml y se agregan:

- ✚ Solución A: 0,6 ml de α -naftol al 5% en alcohol etílico absoluto (intensificante de color).

- ✚ Solución B: 0,2 ml de KHO al 40% en agua destilada (agente oxidante).

Es conveniente tomar la alícuota del cultivo asépticamente para verificar la reacción, de forma de poder incubar el resto en caso que la reacción resulte negativa.

La reacción se considera (+) si aparece color rosa violáceo en la parte superior del tubo antes de 5 minutos. Algunas veces es necesario un leve calentamiento para lograr la manifestación del color. Además, algunas cepas son capaces de consumir la acetoína formada y son falsos VP (-), por lo tanto para diferenciar *E. coli* del grupo *Klebsiella-Enterobacter*, se recomienda completar estas reacciones con la producción de indol y utilización del citrato.

La incubación se lleva a cabo hasta 4 días a 37 °C

3.10 Hidrolisis de la gelatina

Materiales:

- ✚ Tubos con 5 ml de caldo nutritivo (extracto de carne 3 g/L; peptona 5g/L; pH= 8) con 12% de gelatina.

- ✚ Cultivo celular

- ✚ Aguja
- ✚ Alcohol 70%
- ✚ Algodón
- ✚ Mechero

Con la aguja se toma una porción del cultivo celular y se siembra por punción central.

Se incuba a 37 °C de 2 a 7 días.

Lectura:

Transcurrido el tiempo de incubación, los tubos deben enfriarse en heladera o en un baño de hielo: los tubos negativos y los controles se solidificarán mientras que aquellos donde se ha hidrolizado la gelatina, permanecerán líquidos.

Muchas bacterias tienen fuerte acción frente a la gelatina, pero desarrollan en forma lenta por lo que no se puede informar como negativo hasta cumplir los 30 días de incubación.

No deben agitarse los tubos porque si se mezcla la gelatina hidrolizada con la no hidrolizada, da lugar a una combinación que se solidifica por enfriamiento y se obtiene un resultado erróneo.

Se debe tener en cuenta que no haya en el medio un hidrato de carbono pues puede producirse un ahorro de proteína y que la bacteria metabolice el hidrato de carbono para obtener energía en lugar de usar gelatina, obteniéndose un resultado falso negativo.

3.11 Citrato

Materiales:

- ✚ Tubos con medio sólido Citrato de Simmons en pico de flauta
- ✚ Tubo con cepa bacteriana
- ✚ Ansa
- ✚ Mechero
- ✚ Alcohol 70% para desinfección

Se toma con el ansa una porción del cultivo a analizar y se realiza una estría en el pico de flauta del medio.

La incubación se realiza a 35 °C durante 24-48 hs., hasta 4 días antes de informar (-).

Si la prueba tiene resultado positivo se verá el viraje del indicador que posee el medio de verde a azul.

Si la prueba es negativa, no hay viraje del indicador y el tubo permanece de color verde.

ANEXO 4: CARACTERIZACION DE CEPAS POR PRUEBAS BIOQUIMICAS

En la siguiente tabla se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas. Se muestran sólo los resultados de las cepas a las que se le realizó la prueba de hidrocarburos. En color naranja se resaltan los resultados de las cepas que se utilizaron para llevar adelante los ensayos en microcosmos. La identidad de las especies indicadas es Z8= *Pseudomonas aeruginosa*, H1= *Microbacterium sp.*, H6= *Brevibacterium sp.*, Pa41= *Pseudomonas putida*.

Cepa	almidón	OF	citrato	TSI	MRVP			BAM			indol	gelatina	oxidasa	catalasa	cetrimide	
					MR	VP	SH ₂	movilidad	indol	Lactosa						Ureasa
Z8	-	Oxid.	+	Ferm. G, L y S	-	-	-	movil	-	-	-	-	+	+	+	+
Z30	-	Ni f ni o	+	Ferm. G, L y S	-	+	-	No movil	-	-	-	-	-	-	+	-
Z33	-	Oxid.	-	Ferm. Gluc.	-	-	-	No movil	-	-	-	-	+	-	+	-
H1	-	Oxid.	+	Ferm. Gluc.	-	+	+	movil	dudoso	+	-	dudoso	+	-	+	-
H2	-	Ferm.	-	Ferm. G, L y S	-	-	-	No movil	-	-	-	-	-	+	+	-
H3	-	Ferm.	+	Ferm. G, L y S	-	-	-	No movil	-	-	-	-	-	+	+	-
H4	-	Oxid.	+	Ferm. G, L y S	-	-	-	No movil	-	-	+	-	-	+	+	-
H5	-	Ni f ni o.	+	Ferm. G, L y S	-	-	+	No movil	-	-	-	-	-	-	+	-
H6	-	Ni f ni o	-	Ferm. G	-	-	+	No movil	dudoso	-	-	dudoso	+	-	+	-
H7	-	Fer	-	Ferm. G, L y S	-	-	-	No movil	-	-	+	-	+	+	+	-
H8	-	Ni f ni o	-	Ferm. G, L y S	-	-	+	No movil	-	+	-	-	-	+	+	-
H9	-	oxid.	-	Ferm. G, L y S	-	-	+	No movil	-	-	-	-	+	-	+	-
H10	-	Oxid.	-	Ferm. G, L y S	-	-	+	No movil	-	-	-	-	-	+	+	-
H11	-	Ferm.	+	Ferm. G, L y S	-	-	-	No movil	-	-	+	-	-	+	+	-
H12	-	Oxid	-	Ferm. G, L y S	-	-	-	No movil	-	-	+	-	-	+	+	-
H13	-	Oxid.	+	Ferm. G, L y S	-	-	+	No movil	-	-	-	-	-	+	+	+
H14	-	Ni f ni o	+	No ferm. de az.	-	-	+	No movil	-	-	-	-	+	-	+	+
H15	-	Ni f ni o	+	No ferm. De az.	-	-	+	No movil	-	-	-	-	+	+	+	-
H16	-	Ferm.	+	Ferm. G, L y S	-	-	-	No movil	-	-	+	-	+	+	+	+
H17	-	Oxid	-	Ferm G.	-	-	-	No movil	-	-	+	-	+	+	+	+
H18	-	Oxid.	+	Ferm G.	-	-	-	No movil	-	-	-	-	+	-	+	+
H19	-	Oxid.	+	No ferm. de az.	-	-	-	No movil	-	-	+	-	+	-	+	+
H20	-	Ni f ni o	+	Ferm G.	-	-	-	No movil	-	-	+	-	+	-	+	-
Pa41	-	Oxid	+	Ferm. G	-	-	-	movil	-	-	-	-	+	+	+	+

Referencia: Z8= *Pseudomonas aeruginosa*, H1= *Microbacterium sp.*, H6= *Brevibacterium sp.*, Pa41= *Pseudomonas putida*.

ANEXO 5: CARACTERIZACION MOLECULAR DE CEPAS SELECCIONADAS

5.1 Extracción de ADN

Materiales:

- ✚ Cultivo celular en medio líquido
- ✚ eZNA soil ADN kit D5625-02
- ✚ Vortex
- ✚ Pipetas automáticas
- ✚ Tips
- ✚ Eppendorf 1 y 2 ml.

A partir de un cultivo sólido o líquido se hace un pellet en un Eppendorf de 2 ml. Una vez obtenido el pellet de células se colocan 500 mg de bolitas de vidrio y 0,7µL de buffer SLX y se homogeneiza con vortex a máxima velocidad durante 3 – 5 minutos

Se incorpora luego 100 µL de buffer DS y se mezcla con vortex hasta homogeneizar

Se incuba a 70 °C por 10 minutos homogeneizando con vortex una vez durante la incubación

Se centrifuga a 3000 rpm por 3 minutos y luego se extraen 800 µL del sobrenadante a otro Eppendorf y se añaden 270 µL de buffer P2. Se mezcla con vortex para mezclar y se incuban en hielo por 5 minutos.

Se centrifuga a 14000 rpm a 4 °C, se extrae el sobrenadante llevando a otro Eppendorf y se incorporan 0,7 µL de isopropanol luego de lo cual se invierte el tubo de 20 a 30 veces para homogeneizar la mezcla.

Se realiza entonces una centrifugación a 13000 rpm por 20 minutos en frío (4 °C aproximadamente)

Se descarta el sobrenadante con cuidado y se invierte el tubo sobre papel absorbente durante 1 minuto. En el fondo del tubo queda un pellet formado por ADN

Se añaden entonces 200 µL de buffer elution y se mezcla con vortex por 10 segundos. Y se incuba a 70 °C por 10 – 20 minutos para disolver el ADN.

Luego se incorporan 100 μ L de HTR y se homogeneiza por 10 segundos.

Se incuba a temperatura ambiente por 2 minutos y se centrifuga a 14000 rpm por 2 minutos.

Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo de 2 ml teniendo la precaución de medir el volumen.

Al volumen medido del ítem anterior se le añaden el mismo volumen del buffer XP1 y se mezcla con vortes hasta homogeneizar y se reserva. (1)

Se añaden 100 μ L de buffer equilibration y se transfieren a una hibind ADN columns. Esa columna se introduce en un tubo colector y se centrifuga el conjunto a 12500 rpm por 1 minuto. Se descarta luego el líquido que queda retenido en el Eppendorf.

La columna se pasa a otro tubo colector y se transfieren a ella la mezcla obtenida en (1). Se centrifuga a 12500 rpm por 1 minuto quedando retenido en la columna el ADN extraído. Se descarta el líquido que paso por la columna.

Se añade a la columna 300 μ L de buffer XP1 y se vuelve a centrifugar a 12500 rpm por 1 minuto. Se toma la columna y se descarta el tubo colector.

La columna se lleva a un nuevo tubo colector y se añaden 700 μ L de buffer de lavado SPW, se centrifuga a 12500 rpm por 1 minuto y se descarta el líquido

Se centrifuga nuevamente a 14000 rpm y luego se añaden aproximadamente 60 μ L de buffer de elución y se incuba a 70 °C por 10 – 15 minutos. Luego se centrifuga nuevamente a 14000 rpm.

Se repite este último paso y se guarda el líquido colectado en el tubo colector.

5.2 Purificación

Materiales:

-  Eppendorf de 0,5 y 1,5 ml
-  Tips
-  Pipetas automáticas
-  Kit de purificación de PCR Q' Aquick

En un tubo de 0,5 ml se añaden 20 μ L de la muestra de PCR y 100 μ L de buffer PD y se mezcla.

Se aplica la muestra a la columna y se centrifuga 75 segundos a 14500 rpm y se descarta el contenido del tubo colector.

Se incorporan entonces 750 μ L de buffer PB y se vuelve a centrifugar a máxima velocidad por 75 segundos.

Se descarta el contenido del tubo colector y se coloca la columna en el mismo tubo. Se vuelve a centrifugar a máxima velocidad por 75 segundos.

Se coloca la columna en un nuevo tubo de 1,5 ml y se eluye la muestra con 33 μ L de EB

Se centrifuga por 1 minuto a máxima velocidad y se almacena a -20 °C hasta posterior análisis.

5.3 Electroforesis en gel de agarosa

Materiales:

-  Cámara de electroforesis
-  Gel de agarosa
-  Buffer de corrimiento
-  Marcador de peso molecular
-  Buffer de carga
-  Transiluminador ultravioleta
-  Electroforesis horizontal
-  Pipetas automáticas
-  Tips
-  Guantes

Se prepara un gel de agarosa o acrilamida a la concentración requerida (de 0,5 a 2%). Inmediatamente después de vaciar la agarosa a la cámara, debe insertarse el o los peines necesarios para formar los pocillos donde se descarga la muestra. La agarosa tarda en solidificar alrededor de 20 min.

Una vez solidificado el gel, se añade el buffer de corrimiento (TAE o TBE) a concentración 1X, cubriendo perfectamente el gel (0,5 a 1 cm por encima del gel) y se retiran los peines.

Se mezclan las muestras a analizar con un buffer de carga adecuado. Las muestras se depositan de forma cuidadosa en los pocillos, con lo que se evita que se salgan y puedan contaminar el pocillo contiguo.

Debe considerarse el uso de un marcador de peso molecular en, por lo menos, uno de los carriles, para la determinación del peso molecular de la muestra. Este marcador también debe mezclarse con un buffer de carga, excepto cuando ya viene preparado para su uso de la casa comercial en que se obtuvo.

Se realiza la corrida electroforética al voltaje pertinente (entre 25 y 100 V) y dependiendo del tamaño de la cámara. A mayor voltaje, mayor velocidad. La electroforesis se detiene cuando se considera que la muestra se localiza en la posición deseada, o bien cuando la muestra ha corrido por lo menos tres cuartas partes del gel.

Para la visualización de los ácidos nucleicos se utiliza un colorante fluorescente, el bromuro de etidio, que tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas del ADN y el ARN. Debido a esta propiedad es un agente mutagénico y debe manipularse con cuidado. El bromuro de etidio, por lo general, se incorpora a la agarosa (0,5 mg/ ml) antes de permitir la solidificación, o puede incorporarse luego del corrimiento, incubando el gel en una solución que lo contenga a 0,5 mg/ml. El bromuro de etidio emite fluorescencia de color naranja cuando se expone a la luz ultravioleta con longitud de absorción de 254 nm, y longitud de emisión de 366 nm.

5.4 Clonación de los fragmentos de ADN

Para obtener los clones con los fragmentos de ADN para ser secuenciados, fue necesario introducir ese fragmento de ADN en un vector de clonación y transformar un cultivo de células de *E. coli* competentes, de acuerdo al protocolo que se detallará a continuación.

5.4.1 Protocolo para obtener un cultivo competente de células de *E. coli* DH5 α

Se inocularon 100 ml de medio LB con 1 ml de inóculo de 7}

4yerdw DH5α y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Se diluyó 1 ml del cultivo anterior en 100 ml de medio LB fresco y se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 medida a 600 nm. Las células se fraccionaron en alícuotas de 1ml. Se centrifugaron 2 min a 400 rpm y resuspendieron en 0,5 ml de solución P1 para iniciar el proceso de permeación de la pared y membrana celular. Se centrifugaron 2 min a 400 rpm, se volvieron a suspender en 0,5 ml de P1 y se incubó 15 min en hielo; luego se centrifugó 2 min a 4000 rpm. Se resuspendieron en 0,1 ml de solución de PII para profundizar el proceso de permeación. Se mantuvo en hielo entre 30 a 60 min y se guardó en glicerol a -80 °C hasta su utilización.

Preparación de Reactivos:

-Solución stock IPTG (0,1M). Se pesaron 1,2 g de IPTG y se disolvieron en un volumen final de 50,0 ml de agua destilada. Se esterilizó por filtración y se almacenó a 4 °C.

-Solución de X-Gal (2 ml). Se pesaron 100 mg de 5-bromo-4-cloro-3-idolil-β-D-galactósido. Se disolvieron en 2,0 ml de N-N-dimetilformamida. Se cubrió con papel de aluminio y se almacenó a -20 °C.

-Medio LB (1L). Se pesaron 10,0 g de tristona, 5,0 g de extracto de levadura y 5,0 g de NaCl. Se disolvieron en agua destilada y se ajustó el pH a 7,0 con NaOH. Se esterilizó en autoclave.

-Placas con medio LB y Ampicilina. Se agregaron 15,0 g de agar a 1 L de medio LB. Se esterilizó en autoclave. Se permitió que el medio se enfríe a 50 °C antes de agregar la ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. Se vertieron 30-35 ml de medio dentro de las placas de Petri de 85 mm de diámetro. Se dejó solidificar el agar. Las placas se almacenaron a 4 °C.

-Placas con medio LB y Ampicilina/IPTG/X-Gal. Se prepararon las placas de Petri con ampicilina, tal como se describió arriba. Luego se suplementaron con 0,5mM de IPTG y 80 µg.ml⁻¹ de X-Gal. Se esparció en la placa. Alternativamente, se agregaron 100 µl de 100 mM IPTG y 20 µl de 50 mg/ml⁻¹ de X-Gal sobre la placa de Petri con medio LB ampicilina solidificado y se permitió que se adsorba durante 30 min previo a su utilización.

-Medio de cultivo SOC (100ml). Se pesaron 2,0 g de triptona y 0,5 g de extracto de levadura. Se disolvieron las drogas en 97 ml de agua destilada, se agregaron 1 ml de NaCl 1M, 0,25 ml de KCl 1M, 1 ml de solución stock de Mg²⁺ 2M y 1 ml de glucosa 2M (habiendo sido estas dos soluciones esterilizadas previamente por filtración). Se filtró el medio por membrana 0,2 µm. El pH final se ajustó a 7,0.

-Solución stock de Mg²⁺ 2,0M. Se pesaron 20,33 g de MgCl₂.6H₂O y 24,65 g de MgSO₄.7H₂O. Se agregó AD hasta 1 L. Se esterilizó por filtración.

-Solución de PI (MOPS 10 mM pH=7 + KCl 10 mM). Para 50 ml finales de solución, se pesaron 0,1045 g de MOPS (ácido morfolin-propanosulfónico) y midieron 0,5 ml de una solución stock de KCl 1 M.

-Solución de PII: MOPS (100 mM pH=7 + KCl 10 mM + CaCl₂ 1M). Para 50 ml finales de solución, se pesaron 1,045 g de MOPS y 5,5 g de CaCl₂ y se midieron 0,5 ml de una solución stock de KCl 1M.

El pH de ambas soluciones de permeación se ajustó a 7,0 con KOH y se esterilizó en autoclave 20 min a 121 °C.

5.4.2 Reacción de ligación del Vector - ADN

Para clonar los productos PCR obtenidos, se utilizó como vector de clonación un plásmido provisto por un producto comercial denominado pGEM® T-Easy Vector systems de marca Promega. El fabricante provee el vector cortado con la enzima EcoRV y con la adición de un nucleótido de timidina a ambos terminales 3'. Este procedimiento mejora sustancialmente la eficiencia de ligazón del inserto y evita la recircularización del plásmido sobre sí mismo (Mezei y Store, 1994; Robles y Doers, 1994).

Una gran cantidad de copias del vector pGEM® T-Easy contiene los sitios de los promotores T7 y SP6 para la RNA polimerasa flanqueando un sitio múltiple de clonado (MSC) dentro de la región codificante del α-péptido de la enzima β-galactosidasa. Cuando el inserto de ADN se ubica correctamente se provoca la inactivación de la expresión de la β-galactosidasa y las colonias de los clones recombinantes desarrolladas sobre placas pueden ser fácilmente identificadas por el color blanco.

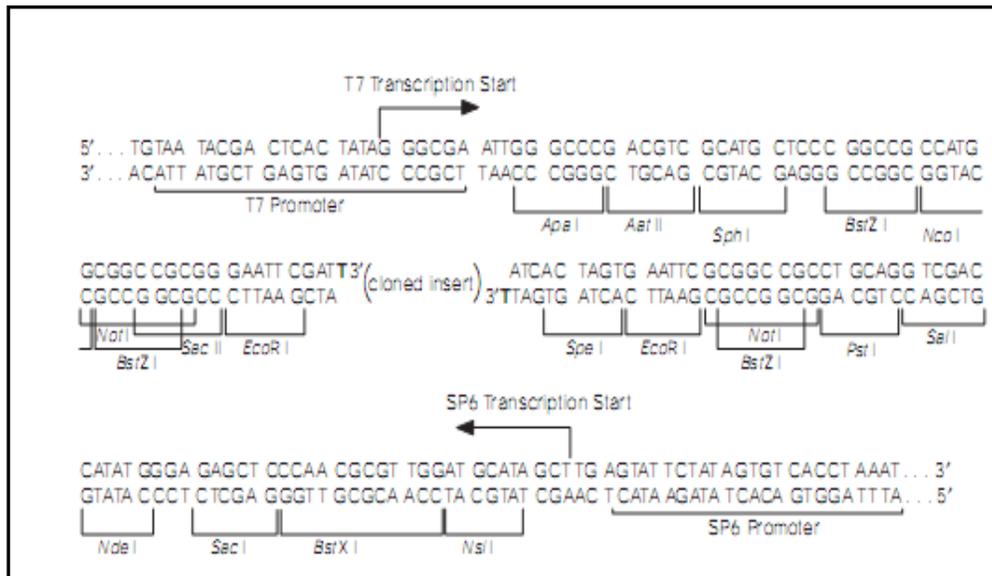


Figura 5.1. Secuencias del promotor y del sitio de múltiple clonado

Para permitir la selección de los clones frente a cualquier otra fuente de contaminación por parte de cepas de *E. coli*, el plásmido cuenta con el gen de resistencia a ampicilina. Adicionalmente, el sitio múltiple de clonación (MSC) de los dos vectores incluye sitios de restricción para diversas enzimas (*Eco*RI, *Bst*Z, *Not*I, etc.) ubicados de manera conveniente que permiten que sean utilizados para diversas estrategias en pos de obtener la secuenciación o identificación de genes como se muestra en la Figura 5.1

El vector pGEM® T-Easy es un plásmido de 3018 pares de bases. En la Figura 5.2 se presenta un esquema del mapa circular del plásmido. Se observa en detalle la interrupción del gen *lacZ* y los promotores T7 y SP6 con los sitios de corte para las correspondientes enzimas y los principales puntos de referencia y su ubicación

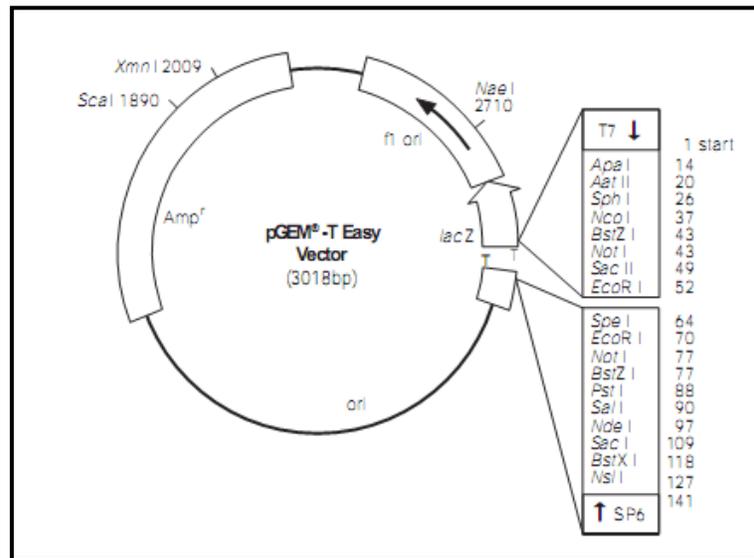


Figura 5.2. Mapa circular del vector pGEM® T-Easy

5.4.3 Protocolo para ligar Vector y ADN

Se prepararon las mezclas indicadas en la Tabla 16 y se incubaron 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C. Concentración del vector: 1,0 µL = 50 ng.

5.4.4 Protocolo de clonación

Se descongelaron las células competentes en hielo. Se adicionaron 125 µL de suspensión de células competentes a 5 µL de mezcla de ligación y se incubaron 1 h en hielo, luego 45-60 segundos a 42 °C y por último 2 min nuevamente en hielo. Se adicionaron 875 µL de SOC a temperatura ambiente. Se incubaron 1 h a 37 °C con agitación (150 rpm); se centrifugaron 2 min a 4000 rpm, se resuspendieron en la última gota y se plaquearon en medio LB-Amp-Iptg-XGal. Se incubaron las placas durante 12h a 37 °C o hasta visualización macroscópica de las colonias y luego se conservaron a 4 °C.

Tabla 1: Mezclas de reacción para el ensayo de clonación

	Muestra (μL)	Control (μL)	(+)	Control (-) (μL)
Buffer 2X	2,5	2,5		2,5
Vector	0,5	0,5		0,5
Producto PCR	0,5	-----		-----
Inserto control	-----	1,0		-----
Ligasa ADN T4	0,5	0,5		0,5
Agua destilada	1,0	0,5		1,5

5.4.5 Identificación de colonias transformantes

Identificación macroscópica.

Para evaluar las colonias transformantes, se observó su coloración luego de incubar las placas 12 h a 37° C. Las células que contienen el plásmido sin el inserto expresan la enzima β -Galactosidasa, se identifican por una coloración azul producida por la actividad enzimática frente al sustrato incluido en el medio de cultivo - X-Gal -. Las células que contienen un inserto en el vector interrumpiendo la secuencia del gen lacZ, no expresan la enzima β -Galactosidasa y, por lo tanto, no se produce la reacción catalizada por la enzima y las colonias presentan coloración blanca.

5.5 Secuenciación de ADN

5.5.1 Determinación de la secuencia de ADN

La secuenciación de los fragmentos de ADN que fueron clonados e insertos en los plásmidos, se realizó a través de métodos automáticos, basados en la determinación de los deoxinucleótidos que componen las cadenas (Sanger y col.,

1977), por el servicio de secuenciación de la empresa MacroGen, Korea. Se utilizó la técnica denominada SES (single extension service) que se basa en la secuenciación de una sola hebra de ADNc a partir del conjunto de cebadores aportados por el cliente. Los análisis se efectuaron con un secuenciador automático 3730xl de 6 canales. Los resultados fueron enviados por la empresa como archivos Abi (electroferogramas) y secuencias nucleotídicas en formato fasta.

5.5.2 Análisis de la secuencia

Se realizó una corrección visual a las secuencias obtenidas con el programa Chromas LITE version 2.01 (Technelysium Pty Ltd, EEUU) con el fin de resolver posibles ambigüedades que pueden surgir de la lectura de los cromatogramas por parte del programa del secuenciador. Posteriormente, las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el algoritmo BLAST comparando con la base de datos del GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Las comparaciones entre secuencias propias, alineamientos y análisis filogenético fueron realizadas con el programa MEGA 4.0 (Tamura y col., 2007). La construcción del árbol filogenético se realizó utilizando el método de análisis filogenético Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). Las distancias entre las secuencias se determinaron utilizando el modelo Kimura's two-parameter (Kimura, 1980). Se evaluó la robustez de los árboles filogenéticos obtenidos con un análisis de bootstrap utilizando 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

5.6 Crecimiento en medio salino

Los materiales usados fueron:

-  Botellas enanas estériles
-  Medio de cultivo base para medir efecto del % salino con diferentes % de NaCl (2, 5, 8, 10 y 15%)
-  Cultivo bacteriano en placa de Petri
-  Agua destilada estéril para suspensión

- ✚ Tips de 1 ml estériles
- ✚ Pipetas automáticas de 1 ml.
- ✚ Agitador
- ✚ ansas
- ✚ Alcohol
- ✚ Mechero
- ✚ Fósforos
- ✚ Algodón

Se toma la placa de Petri y se extrae con ansa una porción de la colonia que se desea estudiar.

Se realiza una suspensión celular en tubos con agua destilada esteril. Se homogeneiza bien.

Se transfiere 1 ml de la suspensión con pipeta automática a botellas enanas con medio base y diferentes concentraciones de NaCl (2, 5, 8, 10 y 15%).

Se incuba en agitador 48 hs. a 27 °C.

Anexo 6: Determinación de los porcentajes de humedad e hidrocarburos totales en los suelos contaminados

6.1 Determinación del porcentaje de humedad

Para una muestra:

- ✚ Muestras de suelo.
- ✚ Balanza analítica.
- ✚ Espátula.
- ✚ Media Placa de Petri.
- ✚ Estufa

Se pesa la tapa de la placa de Petri (P1).

Luego, se incorporan alrededor de 3,0000 g de muestra y se registra ese peso final total (P1+Muestra inicial).

Se procede a colocar las muestras en la estufa a 60°C durante 48 horas para lograr secar las muestras.

Una vez transcurrido ese tiempo se retiran las muestras y se las deja enfriar unos segundos, para luego pesarla y registrar este valor final (P1+Muestra final).

Por último el porcentaje de humedad del suelo se calcula a partir de la diferencia de pesos según la siguiente fórmula:

$$\%Humedad\ del\ suelo = \frac{((P1 + Muestra\ inicial) - (P1 + muestra\ final))}{(P1 + Muestra\ inicial) - P1} \cdot 100$$

6.2. Cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo mediante método gravimétrico modificado

Para una muestra:

- ✚ 1 Erlenmeyer previamente tarado.
- ✚ 1 Tubo con fondo cónico (tubo Falcon) con tapa de 50 ml.
- ✚ Pipeta de 10 ml y propipeta.
- ✚ Pipetas Pasteur plásticas de 15 ml.

- ✚ Éter de petróleo.
- ✚ Papel aluminio.
- ✚ Agitador.
- ✚ Balanza analítica.
- ✚ Centrífuga ECUS CR 2000.
- ✚ Vortex.

Una vez oreadas las muestras por 24 hs, se pulverizan con mortero cerámico.

Se pesan 3 g de muestra en papel aluminio y se depositan en el tubo de fondo cónico de 50 ml.

Se agregan al tubo con muestra, 15 ml de éter de petróleo y se lo tapa.

Se agita en un agitador durante 30 minutos para facilitar el contacto y la extracción de los hidrocarburos.

Se centrifuga en la centrífuga con refrigeración a 3800 rpm durante 15 minutos.

Luego, se extrae el sobrenadante con las pipetas Pasteur de forma muy cuidadosa evitando levantar el pellet formado en el fondo, y se lo deposita en el Erlenmeyer previamente tarado (P1).

Se vuelve a incorporar 10 ml de éter de petróleo en el tubo, se lo mezcla con vortex para resuspender el pellet del fondo y se repiten los pasos 4 y 5. (2º extracción).

Por último, se deja evaporar bajo campana el contenido del Erlenmeyer, por aproximadamente 3 días, y se lo vuelve a pesar con el solvente ya evaporado (P2).

Cálculos:

$$HTP \left[\frac{mg \text{ de HTP}}{g \text{ suelo seco}} \right] = \left(\frac{P2 - P1}{M} \right) \cdot \frac{1}{(1 - (\%H/100))}$$

Donde:

P1 = Peso inicial del Erlenmeyer previamente tarado.

P2 = Peso final de Erlenmeyer con el éter de petróleo evaporado.

M = Masa de muestra incorporada en el paso 1. (aprox. 3 gramos).

%H = porcentaje de humedad de la muestra (según 3.2.1 Medición de Humedad).

Anexo 7:

7.1 Producción de inóculo

El inóculo se propagó a partir de los cultivos que se tenían guardados en conservación. El objetivo final de esta técnica y la técnica descrita en la sección siguiente es la de generar suficiente biomasa de manera de producir un inóculo lo suficientemente grande como para inocular los contenedores del microcosmos.

- ✚ 1 placa de Petri.
- ✚ Medio LB sólido.
- ✚ Medio LB líquido.
- ✚ 1 Botellita de vidrio de 100 ml.
- ✚ 3 Erlenmeyer de 500 ml.
- ✚ Agitador.
- ✚ Micropipetas
- ✚ Ansa.
- ✚ Mechero.
- ✚ Cámara de Thoma.

Se siembra en placa de Petri con medio LB sólido, 0,7 μ L del contenido del Eppendorf en el cual se tiene almacenada en glicerol la cepa a estudiar.

Se incuba la placa a temperatura de 30°C, durante 24 h.

Al cabo de este tiempo, se recolecta con ansa la biomasa producida y se la inocular en botella de vidrio estéril, conteniendo 20 ml de medio LB líquido estéril.

Se deja bajo agitación vigorosa a 30 °C durante 24 h.

Transcurridas las 24 h de inoculación, se agrega 30 ml más de medio LB líquido estéril, y se deja en las mismas condiciones de incubación antes mencionadas.

Pasadas 24 h de incubación, se inocular 15 ml del contenido de las botellitas a un Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 200 ml de medio LB líquido estéril. Esto se realiza por triplicado. Estos tres Erlenmeyer son llevados a incubación bajo agitación vigorosa a 30 °C por un tiempo de 3 días.

Finalizado el período de incubación, se realiza un recuento en microscopio, empleando una Cámara de Thoma, para estimar del contenido bacteriano que se va a inocular.

7.2 Obtención de biomasa por centrifugación e inoculación

- ✚ 3 Erlenmeyer con 200 ml cada uno, de cultivo bacteriano del punto anterior.
- ✚ Centrífuga Sorvall RC5C plus.
- ✚ Recipientes plásticos apropiados para centrifuga.
- ✚ Balanza digital.
- ✚ Vortex.

El contenido total de los 3 Erlenmeyer se colecta en recipientes adecuados para centrifuga, estériles.

Se verifica que el peso de los recipientes plásticos con inóculo esté equilibrado, garantizando así el correcto funcionamiento de la centrifuga.

Se centrifuga durante 15 min a 9000 rpm y a 26 °C.

Se desecha el sobrenadante y se agregan agua de a poco para resuspender el pellet, con la ayuda de un vortex. Se comienza con un volumen de 20 ml, agregando de a 10 ml, hasta un volumen total de 150 ml.

Este volumen total de 150 ml, se divide en 50 ml para cada maceta.

7.3 Recuento de bacterias hidrocarburohíticas presentes en el suelo mediante técnica de NMP

Para una muestra:

- ✚ Frasco orinal estéril para toma de muestra.
- ✚ 15 tubos con 9 ml de medio BH, en los cuales se incorpora como fuente de carbono 100µl de kerosene esterilizado por filtración con membrana de 2 µm.
- ✚ Tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril para las diluciones.
- ✚ Erlenmeyer con 100 ml de agua destilada estéril para dilución.
- ✚ Micropipetas de rango 200-1000 µl y de rango 20-200 µl.

- ✚ Tips para pipetas automáticas estériles correspondientes para cada rango de volúmenes a medir.
- ✚ Mechero.
- ✚ Gradillas.

Se suspende 1 g de muestra de suelo en el Erlenmeyer con 100 ml de agua destilada estéril, obteniendo así una dilución 1:100. Se deja en agitación vigorosa durante 30 minutos.

A partir de esta dilución, se realizan las diluciones en serie en los tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada.

Se inocula 1 ml de cada dilución a un tubo con 9 ml de medio BH y 100 μ L de kerosene, por triplicado.

Luego, se deja los tubos BH+K inoculados incubar durante 21 días a temperatura de 30°C. Cada semana, durante este período, se realiza un seguimiento del viraje de los tubos.

Transcurridos los 21 días, se procede a la lectura final. Para cada dilución tenemos 3 tubos de medio BH+K inoculados, de los cuales se cuenta cuántos de ellos han virado del color azul al rosado (tubos positivos). Para la realización de esta técnica es necesario que al menos en una dilución los 3 tubos sean negativos, a partir de la primera dilución en la que esto sucede, se comenzará a contar hacia las 2 diluciones anteriores, la cantidad de tubos positivos. Así tendremos una combinación de 3 números, correspondientes a cantidad de tubos positivos, de los cuales el último siempre será cero. Con esta combinación ingresamos a Tabla de NMP publicada por John L's Bacteriology Pages, The MPN method (<http://www.jlindquist.com/generalmicro/102dil3.html>) y al número correspondiente lo afectamos por la dilución del número medio. Se obtiene así, el número más probable de microorganismos por gramo de suelo.

ANEXO 8: ANALISIS CROMATOGRAFICOS DE LAS MUESTRAS DE E.E.T. S.A.

Se muestran a continuación los análisis realizados a las muestras de suelo que posteriormente fueron utilizados para armar los microcosmos. Los parámetros determinados fueron: concentración y tipo de hidrocarburos totales, pH, conductividad, humedad y presencia de metales pesados.

Estos análisis fueron utilizados como una fuente útil de información para poder evaluar la identidad del contaminante y para comparar los porcentajes de hidrocarburos totales de petróleo extraídos por el método gravimétrico. Las Figuras 8.1, 8.2, y 8.3 muestran los datos de la muestra MDA-CH-01 que corresponde al suelo utilizado para la validación del método gravimétrico detallado en la sección *7.3.2 Análisis de regresión para la efectividad en la recuperación de gasoil por el método gravimétrico*.

El análisis cromatografico mostrado en las Figuras 8.4 y 8.5 corresponden al suelo contaminado proveniente de un pasivo ambiental provisto por la empresa E.E.T. S. A. Este análisis se llevo a cabo de forma simultánea con el análisis por el método gravimétrico para tener valores comparativos e iniciales del %HTP al inicio del armado de los ensayos II y III.

Finalmente, la Figura 8.6 muestra el resultado del análisis cromatografico de la muestra 4D-UNC. Esta muestra corresponde al análisis realizado al suelo luego de realizado el ensayo II.

INDUSLAB S.A.	
Título Documento	Cod. RO-12.04.01
INFORME FINAL	
29/10/2010 Rev.: 01	
<small>CAMPAMENTO T SIN - CALLE 13 - PLAZA HUINCUL - NEUQUEN - TEL: 0299 - 4902652 ROQUE SAENZ PEÑA N° 4 - CATRIEL - RIO NEGRO - TEL: 0299 - 4912407 / 4914320</small>	
<small>induslab@copelnet.com.ar induslab@cotecat.net.ar</small>	

Protocolo N° 21452
RO-12.03

PROCEDENCIA:	MD ACH-01
EMPRESA:	EET S.A.
FECHAS DE MUESTREO:	16/09/2011
MUESTREO:	EET S.A.
FECHA DE INFORME:	26/09/2011
MATRIZ DE ENSAYO:	SUELO
SOLICITUD:	PE N° 157

RESULTADO POR CROMATOGRAFIA

DETERMINACIONES	UNIDAD	RESULTADO	METODO
nC ₆ a nC ₁₂	mg/kg	2045,84	TNRCC 1005
> nC ₁₃ a nC ₂₈	mg/kg	40573,80	TNRCC 1005
> n C ₂₉ n C ₃₅	mg/kg	555,24	TNRCC 1005
TOTAL	mg/kg	43174,88	TNRCC 1005

[Firma]
VERONICA ENRIETA
Cajero de Laboratorio
INDUSLAB S.R.L.

Laboratorio Certificado ISO 9001:2008 - Certificado N° 231515 BVQI
Laboratorio Inscrito en el Registro Provincial de Servicios Ambientales (RePPSA)

Figura 8.1: Resultados de los análisis por cromatografía realizados en la muestra MD-ACH-01. Aquí se muestran las diferentes fracciones de hidrocarburos presentes.

	
Título Documento	Cod. RO-12.04.01
INFORME FINAL	
29/02/2010 Rev.: 01	
<small>CAMPAMENTO 01 SIN - CALLE 13 - PLAZA MERCADO - ROSARIO - TEL. 0299 - 4923932 ROQUE SAENZ PEÑAN 4 - CATRIEL - RIO NEGRO - TEL. 0299 - 4912497 / 4914326</small>	
<small>induslab@copeinet.com.ar induslab@cotecal.net.ar</small>	
PROTOCOLO N° 12806	
RO-12.01	

EMPRESA: EET S.A.
PROCEDENCIA: **MD-ACH-01**
MUESTRA DE : SUELO
EXTRAE: EET S.A.
FECHA DE EXTRACCION: 16/09/2011
OBJETO DE ANÁLISIS: ANALISIS DE SEGÚN SOLICITUD PE 157

RESULTADOS EN MUESTRA TAL CUAL - BASE SECA

COMPUESTOS	UNIDAD	MD-ACH-01	METODO
pH (1:1)		7,61	S.M. 4500 H-B
Conductividad a 25°C (1:5)	µS/cm	6910,0	S.M. 2510-B
HUMEDAD	%/w	13,20	ASTM 2216
PLOMO	mg/kg	8,25	S.M. 3500-Pb-D
CADMIO	mg/kg	2,75	S.M. 3500-Cd-D
CROMO TOTAL	mg/kg	< 0,1	S.M. 3500-Cr-D
MERCURIO	mg/kg	< 0,3	S.M. 3500-H-C
ARSENICO	mg/kg	0,03	S.M.3500 As -D


 VICEDIRECTORA ENCARGADA
 del Laboratorio
 INDUSLAB S.R.L.

Laboratorio certificado bajo normas ISO 9001:2000
 Laboratorio inscripto en el Registro Provincial de Prestadores de
 servicios Ambientales (RePPSA)

Figura 8.2: Resultados de los análisis por cromatografía realizados en la muestra MD-ACH-01. Se muestran valores fisicoquímicos y concentración de algunos elementos de interés.

Título Documento		Cod. RO-12.04.01
INFORME FINAL		2010/010 Rev. 01
<small>CAMPAMENTO 1 SUR - CALLE 19 - PLAZA WINGUE - NEUSSEN - TEL: 0299 - 490992 ROLUIS SAENZ PENABAZ - CATRIEL - RIO NEGRO - TEL: 0226 - 457467 / 491436</small>		<small>induslab@copeinet.com.ar induslab@cotecal.net.ar</small>

PROTOCOLO N° 23900
RO-12.03

PROCEDENCIA:	MD - ACH - 01
EMPRESA:	EET S.A.
FECHAS DE MUESTREO:	27/03/2012
MUESTREO:	EET S.A.
FECHA DE INFORME:	02/04/2012
MATRIZ DE ENSAYO:	SUELO
SOLICITUD:	PE 197
OBJETO DE ANÁLISIS:	ANALISIS DE PAH's

MUESTRA SECA

<u>COMPUESTOS</u>	<u>UNIDAD</u>	<u>RESULTADO</u>	<u>METODO</u>
NAFTALENO	mg/kg	6,9	EPA 8270-B
ACENAFTILENO	mg/kg	4,0	EPA 8270-B
ACENAFTENO	mg/kg	< 0,1	EPA 8270-B
FLUORENO	mg/kg	9,2	EPA 8270-B
FENANTRENO	mg/kg	< 0,1	EPA 8270-B
ANTRACENO	mg/kg	< 0,1	EPA 8270-B
FLUORANTENO	mg/kg	< 0,1	EPA 8270-B
PIRENO	mg/kg	< 0,1	EPA 8270-B
BENZO (a) ANTRACENO	mg/kg	0,1	EPA 8270-B
CRISENO + TRIPHENYLENO	mg/kg	5,7	EPA 8270-B
BENZO (b) FLUORANTENO	mg/kg	< 0,1	EPA 8270-B
BENZO (k) FLUORANTENO	mg/kg	< 0,1	EPA 8270-B
BENZO (a) PIRENO	mg/kg	< 0,1	EPA 8270-B
INDENO (1,2,3 - cd) PIRENO	mg/kg	< 0,1	EPA 8270-B
DIBENZO (a,h) ANTRACENO	mg/kg	< 0,1	EPA 8270-B
BENZO (g,h,i) PERILENO	mg/kg	< 0,1	EPA 8270-B
Benzo (e)acephenantrileno + Benzo (i)fluoranteno	mg/kg	< 0,1	EPA 8270-B
TOTAL	mg/kg	25,9	EPA 8270-B

VERIFICA Y FIRMA:
 Jefe de Laboratorio
 INDUSLAB S.R.L.

Figura 8.3: Resultados de los análisis por cromatografía realizados en la muestra MD-ACH-01. Se muestran valores de compuestos aromáticos policíclicos presentes en las muestras.

	
INFORME FINAL	
Cod. RO-12.04.01	
29/10/2010 Rev.: 01	
<small>CAMPAMENTO 1 SIN - CALLE 13 - PLAZA HUINCUL - NEUQUEN - TEL. 0229 - 4902952 ROQUE SAENZ PEÑA Nº 4 - CATREIL - RIO NEGRO - TEL. 0229 - 4912497 / 4914326</small>	
induslab@copelnet.com.ar induslab@cotecal.net.ar	

PROTOCOLO N° 16399

RO-12.01

PROCEDENCIA:	UNCO1212 (NORTE)
EMPRESA:	EET S.A.
FECHAS DE MUESTREO:	20/12/2012
FECHA DE RECEPCION:	03/01/2013
MUESTREO:	EET S.A.
FECHA DE INFORME:	23/01/2013
MATRIZ DE ENSAYO:	SUELO
SOLICITUD:	PE N° 233

RESULTADOS EN BASE SECA

DETERMINACION	UNIDAD	RESULTADO	METODO
NITROGENO TOTAL	ppm	123,00	S.M. 4500 N org B/C
FOSFORO TOTAL	ppm	12,30	S.M. 4500-P-F
HIDROCARBUROS TOTALES	mg/kg	62195,00	EPA 418.1
HIDROCARBUROS TOTALES	mg/kg	43067,79	TNRCC 1005

Figura 8.4: Resultado de Nitrógeno, Fósforo e hidrocarburos totales para la muestra UNCo 1212 norte.

	
INFORME FINAL	
Cod. RO-12.04.01	
29/10/2010 Rev.: 01	
<small>CAMPAMENTO 1 SIN - CALLE 13 - PLAZA HUINCUL - NEUQUEN - TEL. 0229 - 4902952 ROQUE SAENZ PEÑA Nº 4 - CATREIL - RIO NEGRO - TEL. 0229 - 4912497 / 4914326</small>	
induslab@copelnet.com.ar induslab@cotecal.net.ar	

Protocolo N° 29576

RO-12.03

PROCEDENCIA:	UNCO1212 (NORTE)
EMPRESA:	EET S.A.
FECHAS DE MUESTREO:	20/12/2012
FECHA DE RECEPCION:	03/01/2013
MUESTREO:	EET S.A.
FECHA DE INFORME:	23/01/2013
MATRIZ DE ENSAYO:	SUELO
SOLICITUD:	PE N° 233

RESULTADO POR CROMATOGRAFIA EN MUESTRA SECA

DETERMINACIONES	UNIDAD	RESULTADO	METODO
nC6 a nC12	mg/kg	< 0,01	TNRCC 1005
> nC12 a nC28	mg/kg	43028,43	TNRCC 1005
> n C28 n C35	mg/kg	39,36	TNRCC 1005
TOTAL	mg/kg	43067,79	TNRCC 1005

Figura 8.5: Resultado por cromatografía de la medición de diferentes fracciones de hidrocarburos para la muestra UNCo 1212.



INFORME FINAL

Protocolo N° : 64215

RO-12.03

Procedencia:	Muestra 4D UNC
Fecha Extraccion:	Sin Fecha
Fecha de Entrada a Laboratorio:	21/12/2017
Fecha de Informe:	29/12/2017
Empresa:	Sra. Lavalle L. - UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
Extrae:	UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
Muestra de:	SUELO
Observaciones:	Digestión de la muestra realizado bajo Método EPA 3540 C
Objeto De Analisis:	ANALISIS DE HIDROCARBURO TOTAL TNRCC 1005

RESULTADOS

DETERMINACIONES	UNIDAD	RESULTADO	METODO
nC ₆ a nC ₁₂	mg/kg	3341	TNRCC 1005
> nC ₁₃ a nC ₂₈	mg/kg	3908	TNRCC 1005
> n C ₂₉ n C ₃₅	mg/kg	741	TNRCC 1005
TOTAL	mg/kg	7990	TNRCC 1005

Nota: N.D. corresponde a No Detectado. Limite de detección del método es < 1 mg/kg.

Figura 8.6: Resultado por cromatografía de la medición de diferentes fracciones de hidrocarburos para la muestra 4D-UNC.

ANEXO 9: ANALISIS ESTADISTICOS

9.1. Analisis de varianza para volatilidad del kerosene.

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	6 % K c/EtP	6 % K s/EtP	Total
<i>%24 h</i>			
Cuenta	3	3	6
Suma	16.7333	17.1333	33.8666
Promedio	5.57776667	5.7111	5.64443333
Varianza	0.05591185	0.10815852	0.07096148
<i>%48 h</i>			
Cuenta	3	3	6
Suma	15.64	14.75	30.39
Promedio	5.21333333	4.91666667	5.065
Varianza	0.09569322	0.24598822	0.16307591

<i>% 72h</i>			
Cuenta	3	3	6
Suma	11.8866	13.16	25.0466
Promedio	3.9622	4.38666667	4.17443333
Varianza	0.23881963	0.58018622	0.38165393

<i>Total</i>		
Cuenta	9	9
Suma	44.2599	45.0433
Promedio	4.91776667	5.00481111
Varianza	0.63613142	0.56685174

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	6.57950395	2	3.289751976	14.8997151	0.00055984	3.88529383
Columnas	0.03409531	1	0.034095309	0.15442209	0.70123632	4.74722535
Interacción	0.39484595	2	0.197422976	0.89415436	0.43453172	3.88529383
Dentro del grupo	2.64951535	12	0.220792946			

Total	9.65796056	17
-------	------------	----

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	2 %K c/EtP	2 % K s/EtP	Total
%24 h			
Cuenta	3	3	6
Suma	5.5666	5.7333	11.2999
Promedio	1.85553333	1.9111	1.88331667
Varianza	0.00481296	0.02481852	0.01277889

%48 h			
Cuenta	3	3	6
Suma	5.0801	4.9867	10.0668
Promedio	1.69336667	1.66223333	1.6778
Varianza	0.00563333	0.09076996	0.0388521

% 72h			
Cuenta	3	3	6
Suma	3.2467	4.0067	7.2534
Promedio	1.08223333	1.33556667	1.2089
Varianza	0.02623385	0.07705785	0.06057002

Total		
Cuenta	9	9
Suma	13.8934	14.7267
Promedio	1.54371111	1.6363
Varianza	0.1338919	0.11064713

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	1.4338843	2	0.716942151	18.7577674	0.0002026	3.88529383
Columnas	0.03857716	1	0.038577161	1.00931631	0.33489556	4.74722535
Interacción	0.06377491	2	0.031887457	0.83428978	0.45787525	3.88529383
Dentro del grupo	0.45865297	12	0.038221081			

Total	1.99488935	17				
-------	------------	----	--	--	--	--

9.2. Análisis de varianza para volatilidad del gasoil.

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	%24 h	%48 h	% 72h	Total
6 % K c/EtP				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	16.7333	15.64	11.8866	44.2599
Promedio	5.57776667	5.21333333	3.9622	4.91776667
Varianza	0.05591185	0.09569322	0.23881963	0.63613142

6 % K s/EtP				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	17.1333	14.75	13.16	45.0433
Promedio	5.7111	4.91666667	4.38666667	5.00481111
Varianza	0.10815852	0.24598822	0.580186223	0.56685174

2 % K c/EtP				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	5.5666	5.0801	3.2467	13.8934
Promedio	1.85553333	1.69336667	1.082233333	1.54371111
Varianza	0.00481296	0.00563333	0.026233853	0.1338919

2 % K s/EtP				
Cuenta	3	3	3	9
Suma	5.7333	4.9867	4.0067	14.7267
Promedio	1.9111	1.66223333	1.335566667	1.6363
Varianza	0.02481852	0.09076996	0.077057853	0.11064713

<i>Total</i>				
Cuenta	12	12	12	
Suma	45.1665	40.4568	32.3	
Promedio	3.763875	3.3714	2.691666667	
Varianza	3.89606342	3.22081924	2.599480324	

ANÁLISIS DE VARIANZA					
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>
Muestra	102.362634	3	34.1208781	263.467416	1.70502E-18
Columnas	7.06281896	2	3.53140948	27.2680945	6.6328E-07
Interacción	1.40919016	6	0.234865026	1.81353133	0.13884704
Dentro del grupo	3.10816832	24	0.129507013		
Total	113.942812	35			

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	3	16.7333	5.57776667	0.05591185
Columna 2	3	17.1333	5.7111	0.10815852
Columna 3	3	5.5666	1.85553333	0.00481296
Columna 4	3	5.7333	1.9111	0.02481852

ANÁLISIS DE VARIANZA						
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	42.4692939	3	14.1564313	292.334447	1.6372E-08	4.06618055
Dentro de los grupos	0.38740371	8	0.048425464			
Total	42.8566976	11				

9.3. Análisis de regresión para la efectividad en la recuperación de gasoil por el método gravimétrico

Regresión:

Análisis de regresión lineal

Variable	N	R ²	R ² Aj	ECMP	AIC	BIC
Y	18	0,985	0,984	0,026	-15,236	-12,565

Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	E.E.	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor
const	-0,245	0,089	-0,433	-0,057	-2,769	0,0137
X	1,039	0,032	0,971	1,106	32,747	<0,0001

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	21,710	1	21,710	1072,381	<0,0001
X	21,710	1	21,710	1072,381	<0,0001
Error	0,324	16	0,020		
Total	22,034	17			

- Los supuestos de normalidad y homocedasticidad se verifican.
- El coeficiente $R^2 = 0,985$ se interpreta de la siguiente manera:

El 98,5% de la variabilidad del Gasoil Recuperado está explicado por el Gasoil agregado al suelo.

- La regresión es significativa, es decir, la pendiente de la recta de regresión ($\beta_1 = 1,039$) es significativamente diferente de cero ($p < 0,0001$).

Además se puede observar que el valor numérico de la pendiente es muy cercano a 1. La pendiente se interpreta de la siguiente forma:

Interpretación de la pendiente: Por cada gramo de gasoil que se agrega en suelo, el gasoil recuperado aumenta en promedio 1,039 gramos.

- Prueba de hipótesis sobre la pendiente para analizar si es igual a 1:

$$H_0: \beta_1 = 1$$

$$H_1: \beta_1 \neq 1$$

$$t = \frac{b_1 - \beta_1}{S_{b_1}} \sim t_{n-2}$$

$$t_o = \frac{1,039 - 1}{0,032} = 1,21875$$

$$t_c = t_{0,025;16} = \pm 2,12$$

No se rechaza la hipótesis nula, a un nivel de significación de 0,05.

9.4. Análisis estadístico para los resultados del ensayo I (Capítulo 8).

ENSAYO 1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Y	18	0,995	0,993	4,550

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6,880	5	1,376	507,395	<0,0001
TRAT	6,880	5	1,376	507,395	<0,0001
Error	0,033	12	0,003		
Total	6,913	17			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,14283

Error: 0,0027 gl: 12

TRAT	Medias	n	E.E.
PseudoP	0,831	3	0,030 A
Brevi	0,838	3	0,030 A
Micro	0,849	3	0,030 A
PseudoA	0,862	3	0,030 A
Mixto	0,964	3	0,030 A
BioE	2,523	3	0,030 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

La media de BioE es significativamente diferente del resto

Verificación de supuestos

Normalidad

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Y	18	0,00	0,04	0,91	0,1808

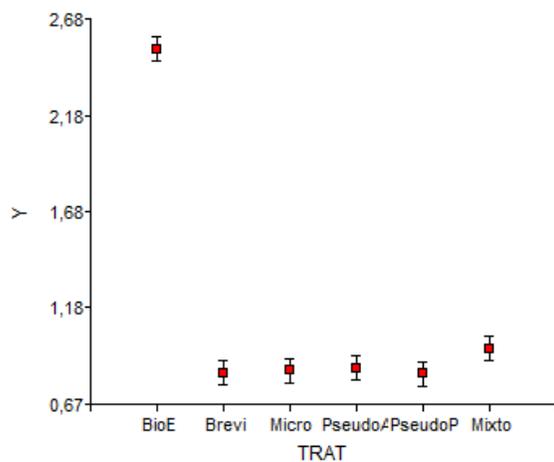
Se puede suponer normalidad

Homogeneidad de varianzas – Prueba de Levene

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,0E-03	5	8,1E-04	1,44	0,2780
TRAT	4,0E-03	5	8,1E-04	1,44	0,2780
Error	0,01	12	5,6E-04		
Total	0,01	17			

Se puede suponer homogeneidad



9.5. Análisis estadístico para los resultados del ensayo II. (Capítulo 8).

ENSAYO 2

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Y	12	0,224	0,000	18,033

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,054	3	0,018	0,771	0,5417
TRAT	0,054	3	0,018	0,771	0,5417
Error	0,188	8	0,024		
Total	0,242	11			

Test:Bonferroni Alfa=0,05 DMS=0,43553

Error: 0,0235 gl: 8

TRAT	Medias	n	E.E.
BioE	0,758	3	0,089 A
Micro	0,814	3	0,089 A
PseudoA	0,904	3	0,089 A
Brevi	0,924	3	0,089 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

No existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos

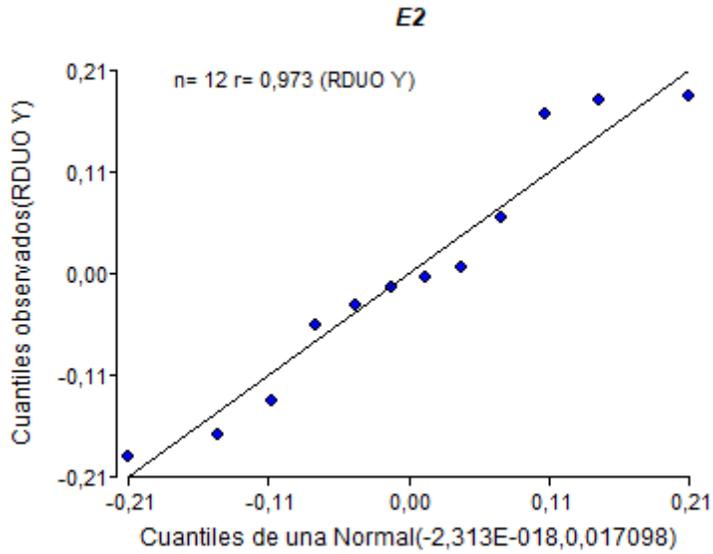
Verificación de supuestos

Normalidad

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RABS Y	12	0,10	0,08	0,79	0,0068

Si se observa el Q-Q plot no parece alejarse demasiado de la normalidad



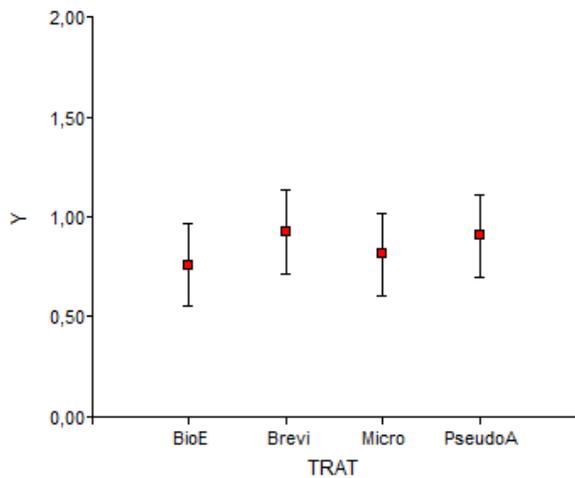
(De todas maneras si se trabaja con el logaritmo natural de la variable de respuesta se verifica normalidad)

Homogeneidad de varianzas – Prueba de Levene

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,02	3	0,01	0,80	0,5290
TRAT	0,02	3	0,01	0,80	0,5290
Error	0,05	8	0,01		
Total	0,07	11			

Se puede suponer homogeneidad



9.6. Análisis estadístico para los resultados del ensayo III (Capítulo 8).

ENSAYO 3

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Y	12	0,314	0,056	21,072

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,507	3	0,169	1,219	0,3640
TRAT	0,507	3	0,169	1,219	0,3640
Error	1,109	8	0,139		
Total	1,616	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,97365

Error: 0,1387 gl: 8

TRAT	Medias	n	E.E.
BioE	1,458	3	0,215 A
Micro	1,753	3	0,215 A
PseudoA	1,826	3	0,215 A
Brevi	2,031	3	0,215 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

No existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos

Verificación de supuestos

Normalidad

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Y	12	0,00	0,32	0,90	0,2733

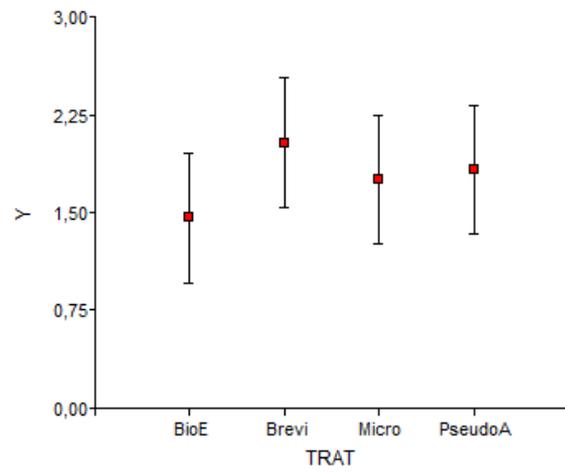
Se puede suponer normalidad

Homogeneidad de varianzas – Prueba de Levene

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,07	3	0,02	0,58	0,6445
TRAT	0,07	3	0,02	0,58	0,6445
Error	0,34	8	0,04		
Total	0,41	11			

Se puede suponer homogeneidad



BIBLIOGRAFIA

Bibliografía referenciada:

Alvarez, J. 2017. Cultivo de los microorganismos nativos en la reducción del contenido de bifenilos policlorados (PCBS) en el suelo de la subestación eléctrica de Puente Piedra. Facultad de Ingeniería. Escuela Académico Profesional de Ingeniería Ambiental. Universidad Cesar Vallejo. Perú.

Alves, A., Correi, A., Igual, J., Trujillo, M. 2014. *Microbacterium endophyticum* sp. nov. and *Microbacterium halimionae* sp. nov., endophytes isolated from the salt-marsh plant *Halimione portulacoides* and emended description of the genus *Microbacterium*. *Systematic and Applied Microbiology* 37 (2014) 474–479.

Argujio Portillo, N., Guerrero Peña, A., Dominguez Rodriguez, V., Carrillo Avila, E., Zavala Cruz, J. 2019. Calibration models for the spectrophotometric quantification of total oil hydrocarbons in soil. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 35 (2) 469-479, 2019. DOI: 10.20937/RICA.2019.35.02.17.

Beyer, J., Trannum, H., Bakke, T., Hodson, P., Collier, T. 2016. Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: A review. *Marine Pollution Bulletin* 110 (2016) 28–51.

Bergey, H. 1957. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Departamento de microbiología y genética molecular. Universidad de Michigan. Estados Unidos. Editorial Springer. Segunda edición 2005.

Blanco, G., Arias, F., Villar Laz, C., Quiroga, C. 2018. El petróleo en Neuquén. 100 años de historia (1918 – 2018). CEHIR. Facultad de Humanidades. Universidad nacional del Comahue. IPEHCS. Conicet. Ministerio de Energía y Recursos Naturales. Provincia de Neuquén.

Camacho Chab J., Ortega Morales, B., de la Rosa García S. 2009. Composición biomolecular y evaluación de la capacidad emulsificante de un exopolímero

producido por *Microbacterium sp.* MC3B-10. Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología. Universidad Autónoma de Campeche. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras.

Cambarieri, L., Pucci, G.N., Acuña, A.J. 2021. Optimización de un proceso de bioestimulación en un suelo de Río Gallegos, Argentina, para su utilización en biorremediación de hidrocarburos. *Ecosistemas* 30(1): 2084. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2084>

Carreño Parrado, Y. 2018. Degradación del cianuro proveniente de los vertimientos de una industria de tratamiento térmico ubicada en Bogotá utilizando microorganismos. Universidad Nacional Abierta y a Distancia- UNAD Escuela de Ciencias Agrarias, Pecuarias y del Medio Ambiental. Bogotá- Colombia.

Castillo Bertel, M. 2013. Evaluación analítica para la determinación de hidrocarburos totales en aguas por espectroscopia infrarroja. *Revista Boliviana de química*. Vol. 30, No.2, pp. 146-152.

Cecotti, M., Morelli, I.S., Coppotelli, B.M. 2015. Estudio metabólico y molecular de cultivos bacterianos degradadores de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) y resistentes a metales pesados. *Química Viva*, vol. 14, núm. 1, 2015, pp. 56-68. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86340672007>.

Coria, I. 2007. Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Universidad Abierta Interamericana. Centro de Altos Estudios Globales.

De La Rosa Martínez, D. 2020. Biodegradable hydrocarbon bacteria. *BIOCIENCIAS - 2018 -1*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Demque,D., Biggar,K., Heroux J. 1997. Land treatment of diesel contaminates sand. *Can. Geotech*, vol. 34 p.141-431.

Díaz Montoya, D. 2020. Aislamiento, caracterización microbiológica y molecular de cepas bacterianas nativas del fermento de *Chenopodium quinoa* y su efecto larvicida contra *Culex quinquefasciatus*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Facultad de Ciencias Naturales y Formales.

Domínguez, M. 2009. Extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos de muestras de interés medioambiental mediante ultrasonidos. Universidad Pablo de Olavide.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *evolution*, 39(4), 783-791.

Fernández Linares, L., Rojas Avelizapa N., Roldán Carrillo, T., Ramírez Islas, M., Zegarra Martínez, H., Uribe Hernández, R., Reyes Ávila R., Hernández, D., Arce Ortega, J. 2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México, D. F.

Figuroa Suazo, C. C. 2017. Evaluación de la capacidad degradadora de hidrocarburos (HC) de pretroleo de hongos y bacterias aislados del borde costero de la región del Bio-Bio para la aplicación en suelos contaminados. Facultad de Ciencias. Departamento de Ciencias Básicas. Universidad del Bío-Bío. Red de Bibliotecas – Chile.

García-Cruz N., Canul-Puc, R., Sanchez-Avila, J., Gold-Bouchot, G., Aguirre-Macedo M. 2014. Potential crude oil degradation by a microbial consortium

isolated from the Gulf of Mexico. Environmental Biotechnology and Engineering. <https://www.researchgate.net/publication/272151561>.

García González, J., Peñafiel Heredia, D., Rodríguez, R. 2019. Bioremediation of hydrocarbons in wastewater with mixed culture of microorganisms: case car washers Puyango. Enfoque UTE 10 1 (2019) 185-196.

Gomez Oviedo, A. 2012. Efecto de los hidrocarburos en suelos arenosos de la Mesa de Guanipa – Venezuela y propuesta de tratamientos alternativos para la recuperación de suelos contaminados con gasoil y aceites dieléctricos con BPC. Tesis doctoral. Universidad Politecnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales. Departamento de Ciencias Ambientales.

Gomez, W., Gaviria, J., Cardona, S. 2009. Evaluacion de la bioestimulacion frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina – diesel. Dina, 76 (160), 83-93. Recuperado el 04 de mayo de 2022, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0012-73532009000400008&lng=en&tlng=es.

Guzman, V., Ceruti, R., Marino, F., Simonetta, A., Manzo R., Mammarella, E. 2016. Ensayos de biodegradación de mezclas comerciales de diesel y biodiesel empleando bacterias degradadoras aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos de la región de Santa Fe. XX Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral 18 y 19 de Octubre de 2016.

<https://www.ingenieroambiental.com>, 2005.

<https://www.lifeder.com/prueba-catalasa/#Fundamento> (visitado el 2/2020)

<http://www.prtr-es.es/Antraceno,15648,11,2007.html> (visitado el 4/2021)

<https://www.empresascarbone.com/pdf/shopify/ficha-tecnica-kerosene.pdf>

(visitado el 12/2022)

https://www.javeriana.edu.co/documents/4486808/5015300/Kerosene++_COPEC.pdf/ebffe067-6d0f-4086-9c54-08eb248e5340?version=1.0 (visitado el 12/2022)

<https://edicion.ypf.com/productosyservicios/Descargas/Kerosene.pdf> (visitado el 12/2022)

<http://foreign.macrogen.com/eng/>(visitado el 7/2019)

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST(visitado el 7/2019)

https://issuu.com/rubenantonio5/docs/revista_microbiologia_pruebas_bioqu

(visitado el 2/2020)

https://actinobacteriasblog.wordpress.com/inicio_actinobacterias/arbol-filogenetico/

(visitado el 8/2019)

www.ingenieroambiental.com, 2005 Contaminación y remediación del suelo.

(visitado el 7/2017)

<http://www.jlindquist.com/generalmicro/102dil3.html> (visitado el 7/2021)

http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_SistemasAPI.pdf (visitado el 7/2022)

<http://www.jlindquist.com/generalmicro/102dil3.html> (visitado el 7/2021)

Jiménez Hernández, V. 2018. Desarrollo de una metodología mediante acoplamiento de bioaumentación, bioestimulación y bioventeo para la remediación de un suelo costero contaminado con hidrocarburos intemperizados. Tesis doctoral con mención internacional. Ciatec.

Kahkashan, S., Wang, X., Ya, M., Chen, J., Wu, Y., Cai, Y., Saleem, M., Inam, A., Aftab, J. 2019. Evaluation of marine sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons along the Karachi coast, Pakistan, 11 years after the Tasman Spirit oil spill. *Chemosphere* 233 (2019) 652-659.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-120.

Mounier, J. 2007. Growth Characteristics of *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* and *Staphylococcus* spp. Isolated from Surface-Ripened Cheese. *Applied and environmental microbiology*. 2007, p. 7732–7739 Vol. 73, No. 23.

Maposita. M., Calle, W., Fiallos C., Burgos. F. 2011. Caracterización microbiológica en suelos contaminados por hidrocarburos, de tipo *Pseudomonas* en el sector Rio Bonanza, provincia de Pastrana. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Km. 30,5 vía Perimetral Guayaquil-Ecuador.

Moreno-Ávalos, L., Suyon-Solorzano, N. 2020. Efect of microorganisms on the degradation of agrochemicals presents in agricultural soils. *REFI Revista de Formación en Investigación*. REFI UPN.2019; 7(1): 18-34.

Nava Solis, G. 2017. Determinación de la concentración de los hidrocarburos policíclicos aromáticos naftaleno, fenantreno, fluoranteno y pireno por fluorescencia de excitación, emisión y sincrónica en medios altamente salinos.

Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex).

Louchouart, P., Lucotte, M., Farella, N. (1999). Historical and geographical variations of sources and transport of terrigenous organic matter within a large-scale coastal environment. *Organic Geochemistry*, 30(7), 675-699.

Liporace, F., Conde Molina, D., Santiago Odobez, N., Quevedo, C. 2019. Isolation of microorganisms from areas contaminated with hydrocarbons close to urbanized areas, for the application of biorremediation strategies. *Brazilian Journal of Development* 4660.

Llanco Palomino, R., Reátegui Del Águila, B., Reátegui Ramos, P., Pari Quispe, Dina. 2020. Identification of oil-degrading bacteria in the aquatic ecosystem of an oil activity of Coronel Portillo-Ucayali. Universidad Nacional de Ucayali. *Revista de investigación universitaria. Versión electrónica* 2664 – 8423.

Ordoñez Burbano, D., Abella Medina, C., Echeverry Tamayo, A., Paz Lasprilla, L., Benítez-Campo, N. 2017. Biodegradación de hidrocarburos alifáticos saturados por microorganismos aislados de suelo contaminado con derivados del petróleo. *Revista científica Facultad de Ciencias Naturales y Exactas Universidad del Valle*. <https://www.researchgate.net/publication/335462181>.

Pila, M., Ruiz D., Colasurdo, D., Allegretti P. 2020. *Química Orgánica II. Capítulo 5. Hidrocarburos aromáticos polinucleares Facultad de Ciencias Exactas. UNLP.*

Prabowo, A., Bae, D. 2019. Environmental risk of maritime territory subjected to accidental phenomena: Correlation of oil spill and ship grounding in the Exxon Valdez's case. *Results in Engineering* 4 (2019) 100035.

Peña, A., Busquets A., Gomila, M., Mulet, M., Gomila, R., Reddy, T., Huntemann, M., Pati, A., Ivanova, N., Markowitz, V., García-Valdés, E., Göker, M., Woyke, T., Klenk, H., Kyripides, N., Lalucat, J. 2016. High quality draft genome sequences of *Pseudomonas fulva* DSM 17717T , *Pseudomonas parafulva* DSM 17004T and *Pseudomonas cremoricolorata* DSM 17059T type strains. Extended Genome Report. Standards in Genomic Sciences.

Pulgar Morelo, M. 2001. Isolation, identification and use of a *Brevibacterium linens* strain to prepare cheese. *Revista Científica FCV-LUZ*. Vol XI, 3, 199-206.

Quiliche-Duran, J., Cortez Lázaro, A., Rodríguez Grados, P., Silva Vergara, M., Huayna Dueñas, L. 2016. Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* potentially degrader of crude oil, from soils in car workshops in North Chico.

Quintella, C., Mata, A., Lima, L. 2019. Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils. *Journal of Environmental Management* 241 (2019) 156–166.

Riojas González, H., Torres Bustillos, L., Mondaca Fernández, I., Balderas Cortes, J., Gortáres Moroyoqui, P. 2010. Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Química Viva - Número 3, año 9, diciembre 2010* - quimicaviva@qb.fcen.uba.ar.

Rodríguez López D., Burucua A., 2015. Pasivos ambientales e hidrocarburos en Argentina. Análisis de casos y marcos jurídicos para un debate urgente. - 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ediciones del Jinete Insomne.

Rakhashiya, P., Pooja P. Patel, Vrinda S. Thaker. 2015. High-quality complete genome sequence of *Microbacterium* sp. SUBG005, a plant pathogen. [Genomics Data](#) 5 (2015) 316-317.

Romero Miño, A. 2005. Estudio sobre la eficiencia en la remoción de hidrocarburos totales de petróleo en suelos contaminados mediante extracción con solventes orgánicos. Universidad internacional SEK. Facultad de Ciencias Ambientales. Ecuador.

Rosemberg, M., Gutnik, D., Rosenberg, E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell – surface hydrophobicity. FEMS Microbiology Letters 9 (1980) 29-33.

Rosemberg, M. 2006. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty years of doing MATH. FEMS Microbiol Lett. DOI:10.1111/j.1574-6968.2006.00291.x.

Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biological of Evolution 4, 406-425.

Santa, J. 2002. Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de hidrocarburos presentes en aguas residuales industriales. CT&F - Ciencia, Tecnología y Futuro - Vol. 2 Núm. 3.

Schwab, A., Su, J., Wetzel, S., Pekarek S., Banks, M. 1999. Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. Environmental science technology. 33, 1940-1945.

Saranya Kuppusamy, Palanisami Thavamani, Mallavarapu Megharaj, Yong Bok Lee, Ravi Naidu. 2016. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degrading, pH tolerant, N-fixing and P-solubilizing novel bacteria from manufactured gas plant (MGP) site soils. [Environmental Technology & Innovation](#) 6 (2016) 204-219.

Serrano, A., Gallego, M., Gonzalez, J., Tejada, M. 2007. Natural attenuation of diesel aliphatic hydrocarbons in contaminated agricultural soil. *Environmental Pollution*. 151, pp 494-502.

Tamura, K., Dudley, J., Nei M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4. *Mol. Biological Evolution*. 24:1596-1599.

U.S. EPA. 1986. Method 8270B semivolatile organic compounds by gas chromatography/ mass spectrometry (GC/MS): capillary column technique. www.usepa.gov, 1986.

U.S. EPA. 1994. How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites: A Guide For Corrective Action Plan Reviewers, Chapter IV. <https://www.usepa.gov>, 1994.

U.S. EPA. 1995. N-Hexane Extractable Material (HEM) and Silica Gel Treated N-Hexane Extractable Material (SGT-HEM) by Extraction and Gravimetry (Oil and Grease and Total Petroleum Hydrocarbons) www.usepa.gov, 1995.

Valeriano-Zapana, J., Gonzales-Limache, E. 2016. Caracterización de bacterias halófilas aisladas de un sistema de tratamiento de lodos activados del terminal petrolífero Almirante Barroso, Sao Paulo, Brasil. *Revista Ciencia y Tecnología Para el Desarrollo-UJCM*. 2(3); 23-30.

Vergani G., Schiuma, M., Hinterwimer G., 2018. "Cuenca Neuquina. Rocas Reservorios de la Cuenca Productivas de la Argentina", *10 Congreso de Exploración y Desarrollo de Hidrocarburos*, Mendoza, IAPG.

Volke Sepúlveda, T., Velasco Trejo, J.A. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). Periférico

sur 5000. Col. Insurgentes Cuicuilco, C.P. 04530. México, D.F. Internet: www.ine.gob.mx. <https://www.researchgate.net/publication/31851896>.

Wardani, O. 2020. Comparación de métodos de extracción de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) de muestras de aire (filtros PM10). Universitat de les Illes Balears.

Zhao Feng, Ping Li, Chao Guo, Rong-Jiu Shi, Ying Zhang. 2018. Bioaugmentation of oil reservoir indigenous *Pseudomonas aeruginosa* to enhance oil recovery through in-situ biosurfactant production without air injection. *Bioresource Technology* 251 (2018) 295–302.

Bibliografía consultada

Abasolo Pacheco, F., Morante Carriel, L. 2019. Bacterias degradadoras de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con hidrocarburos. *Colloquium*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Ecuador.

Abhijit Sarma Roy, Reshita Baruah, Maina Borah, Anil Kumar Singh, Hari Prasanna Deka Boruah, Neelima Saikia, Manab Deka, Nipu Dutta, Tarun Chandra Bora. 2014. Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. *International Biodeterioration & Biodegradation* 94 (2014) 79-89.

Abraham Peele Karlapudi, T.C. Venkateswarulu, Jahnavi Tammineedi, Lohit Kanumuri, Bharath Kumar Ravuru, Vijaya ramu Dirisala, Vidya Prabhakar Kodali. 2018. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum* xxx (2018) 1-9.

Ajona, M., Vasanthi, P. 2021. Bioremediation of petroleum contaminated soils – A review. *Materials Today: Proceedings*. Journal homepage: www.elsevier.com/locate/matpr.

Akanit Wongbunmak, Sansanee Khiawjan, Manop Supphantharika, Thunyarat Pongtharangkul. BTEX- and naphthalene-degrading bacterium *Microbacterium esteraromaticum* strain SBS1-7 isolated from estuarine sediment. 2017. *Journal of Hazardous Materials* 339 (2017) 82–90.

Álvarez, A., Rueda, B., Paternina, R. 2014. Validación e implementación de un método analítico para la determinación gravimétrica de Hidrocarburos Totales en muestras de agua superficial y residual. *Memorias del II Seminario de Ciencias Ambientales Sue-Caribe & VII Seminario Internacional de Gestión Ambiental*.

Amar Jyoti Das, Rajesh Kumar. 2018. Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. *Bioresource Technology* 260 (2018) 233–240.

Anto Jeya Dayalan, Pramod Darwin, Prakash S. 2011. Comparative study on production, purification of penicillin by *Penicillium chrysogenum* isolated from soil and citrus samples. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (2011) 15-19.

Aramburu Domínguez, M. 2011. Extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos de muestras de interés medioambiental mediante ultrasonidos.

Audino, P. 2019. Argentine oil in the first decades of the twentieth century: a controversial beginning. *Análisis Económico*, vol. XXXIV, núm. 85.

Avramov, A., Couger, M., Hartley, E., Land, C., Wellendorf, R., Hanafy, R., Budd, C., French, D., Hoff, W., Youssef, N. 2016. Draft genome sequence of *Microbacterium oleivorans* strain Wellendorf implicates heterotrophic versatility and bioremediation potential. [Genomics Data](#) 10 (2016) 54-60.

Barreto Franco J., Reyna Gaspar, M. 2020. Revisión bibliográfica del uso de tecnologías de remediación para suelos contaminados por hidrocarburos. Tesis de

grado. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental. Universidad Cesar Vallejos. Peru.

Becerra Gutiérrez, L., Horna Acevedo, M. 2016. Isolation of biosurfactant producing microorganisms and lipases from wastewaters from slaughterhouses and soils contaminated with hydrocarbons. *Scientia Agropecuaria* 7 (1): 23 – 31.

Bellon-Fontaine, M., Rault, J., Van Oss, C. 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7(1996) 47 – 53.

Bin Liang, Hui Yun, Deyong Kong, Yangcheng Ding, Xiangkai Li, Alisa S. Vangnai, Aijie Wang. 2019. Bioaugmentation of triclocarban and its dechlorinated congeners contaminated soil with functional degraders and the bacterial community response. *Environmental Research*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108840>.

Brumano, L., Fernandes Antunes, F., Galeno Souto, S., dos Santos, J., Venus, J., Schneider, R., Silvério da Silva, S. 2017. Biosurfactant production by *Aureobasidium pullulans* in stirred tank bioreactor: New approach to understand the influence of important variables in the process *Bioresource Technology* 243 (2017) 264–272.

Cambarieri, L., Pucci, G., Acuña, A. 2019. Evolución de la comunidad microbiana nativa durante el proceso de biodegradación de un residuo procedente de estaciones de servicios. *AACINI – Revista Internacional de Ingeniería Industrial*, N°1 – junio de 2020 – pp. 5-16.

Canals, M. 2005. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Universitat de Barcelona. Facultat de Biologia. Departament de Microbiologia.

Callicó, A., Cedré, B., Sifontes, S., Torres, V., Pino, Y., . Callís, A., Esnard, S. 2004. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Vacci Monitor* 1 Año 13 No. 3.

Ccallo, A., Masco, F., Callata Churac, R., Vigo Rivera J., Calla Calla, J.. 2020. Biodegradation of plastic polymers by *Pseudomonas*. *Ciencia, Tecnología y Desarrollo* (2020) Volumen 6 Número (2): 46-59.

Cabana Saavedra, L. 2018. Evaluación de nuevos sistemas anfílicos con posible aplicación en la remediación de suelos contaminados. Instituto de Investigaciones en Físico-Química. Departamento de Química Orgánica .Facultas de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.

Chan-Quijano, J., Jarquín-Sánchez, A., Ochoa-Gaona, S., Martínez-Zurimendi, P., López-Jiménez, L., Lázaro-Vázquez, A. 2015. Directrices para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Teoría y Praxis*, núm. 17, enero-junio, 2015, pp. 123-144. Universidad de Quintana Roo Cozumel, México.

Collins, M., Jones, D., Kroppenstedt, R. 1983. Reclassification of *Brevibacterium imperiale* (Steinhaus) and "*Corynebacterium laevaniformans*" (Dias and Bhat) in a redefined Genus *Microbacterium* (Orla-Jensen), as *Microbacterium imperiale* comb. nov. and *Microbacterium laevaniformans* nom. rev.; comb. nov. *System. Appl. Microbiol.* 4, 65-78 (1983).

Cortes Miranda, P. 2015. Efecto del antraceno sobre el crecimiento *in vitro* del moho verde (*Trichoderma spp.*) y su potencial para desarrollar estrategias de biorremediación *in situ*. Tesis de Magister. Postgrado en estrategias para el desarrollo agrícola regional. Colegio de Post graduados. Institución de enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas. Campus Puebla.

Das, A., Kumar, R. 2018. Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. *Bioresource Technology* 260 (2018) 233–240.

Dell'Anno, F., Sansone, C., Ianora, A., Dell'Anno, A. 2018. Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: Current knowledge and future perspectives. *Marine Environmental Research* 137 (2018) 196–205.

Delpino, M. 2018. The argentine oil during Onganía's years: the new Hydrocarbons Law. Internal and external repercussions. *Ciclos*, Vol. XXV, Nro. 51, 2018 ISSN 1851-3735, 107-134.

Derrossi Meyer, D., Anderson Beker, S., Bücken, F., Ruaro Peralba, M., Guedes Frazzon, A., Osti, J., Andrezza, R., Oliveira Camargo, F., Menezes Bento, F. 2014. Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 95 (2014) 356-363.

Dong Wan Lee, Hanbyul Lee, Bong-Oh Kwon, Jong Seong Khim, Un Hyuk Yim, Beom Seok Kim, Jae-Jin Kim. 2018. Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. *Environmental Pollution* 241 (2018) 254-264.

Fan Yanga, Lili Li, Yang Si, Ming Yang, Xiaoyu Guo, Yingmin Hou, Xiaoyi Chen, Xianzhen Li. 2016. Complete genome sequence of a xanthan-degrading *Microbacterium* sp. strain XT11 with the potential for xantho-oligosaccharides production. *Journal of Biotechnology* 222 (2016) 19–20.

Ferhata, S., Mnifb, S., Badisa, A., Eddouaouda, K., Alouaouic, R., Boucherita, A., Mhirib, N., Moulai-Mostefac, N., Sayadib, S. Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65 (2011) 1182-1188.

Geetha S.J.a, Ibrahim M. Banatb, Sanket J. Joshi. 2018. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 14 (2018) 23–32.

Giraldo Zambrano, J. 2012. Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* Pb 25: evaluación de su actividad emulsificante y de remoción de metales pesados. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. Lima. Peru.

Gonzales M, Pucci G. 2022. Aislamientos de bacterias post tratamiento con gasoil - agua y centrifugación de fondo de tanques petroleros. *Revista peruana de biología* 29(2): **e21526** 001 - 006 (Mayo 2022). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v29i2.21526>.

Govindammal M. 2014. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on the Production of Biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens* isolated from Mangrove Ecosystem. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* 5(2) (2014) 108 – 115.

Hernández Castellanos, N. 2016. Establecimiento de un proceso de biorremediación usando *Stenotrophomonas maltophilia*. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

Hossain, F., Akter, A., Sohan, S., Sultana, N., Reza Kazi, A., Hoque, F. 2021. Bioremediation potential of hydrocarbon degrading bacteria: isolation, characterization, and assessment. *Saudi Journal of Biological Sciences*.

Hoppe-Seyler, T., Jaeger, B., Bockelmann, W., Geis, A., Heller, K. 2007. Molecular identification and differentiation of *Brevibacterium* species and strains. *Systematic and Applied Microbiology* 30 50–57.

Huayasco, I. 2020. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos mediada por *Pseudomonas sp.* en biorreactores. Universidad Agraria de la Selva. Escuela de posgrado. Maestría en Agroecología. Mención Gestión de Suelos y Agua. Peru.

Jacobs Sera, D., Abad, LA., Alvey, RM., Anders, KR., Aull, HG., Bhalla, SS., et al. (2020). Genomic diversity of bacteriophages infecting *Microbacterium spp.* PLoS ONE 15(6): e0234636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234636>.

Kavitha Ramadass, Mallavarapu Megharaj, Kadiyala Venkateswarlu, Ravi Naidub. 2018. Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil: Impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas sp.* on bioremediation. Science of the Total Environment 636 (2018) 968–974.

Lara Severino, R., Gomez Olivan, L., Sandoval Trujillo, A., Isaac – Olive, K., Ramirez – Duran, N. 2017. Búsqueda de capacidad productora de biosurfactantes en actinobacterias haloalcalofilas haloalcalotolerantes. Rev. Int. Contam. Ambie. 33 (3) (2017) 529-539.

Leadin S.Khudur, Esmaeil Shahsavari, Grant T.Webster, Dayanthi Nugegoda, Andrew S.Ball. 2019. The impact of lead co-contamination on ecotoxicity and the bacterial community during the bioremediation of total petroleum hydrocarbon-contaminated soils. Environmental Pollution 253 (2019) 939-948.

Leiyu Feng, Xiupeng Jiang, Yanning Huang. Dongdong Wen, Tianyu Fu, Rongbing Fu. 2021. Petroleum hydrocarbon-contaminated soil bioremediation assisted by isolated bacterial consortium and sophorolipid Environmental Pollution 273 (2021) 116476.

LEY 24.051. Residuos peligrosos - Generación, manipulación, transporte y tratamiento - Normas. Sanción: 17 de Diciembre 1991. Promulgación: 8 de Enero 1992. Publicación: B.O. 17/1/92.

LEY PROVINCIAL N°1875 (B.O. 1/2/91) (TEXTO MODIFICADO POR LEY N° 2267 – B.O. 23/12/98). Ley N° 1875. Sancionada: 21/12/90. Promulgada: Decreto N° 5167 del 21/12/90. Publicada: B.O. el 1/2/91. Ley N° 2267. Sancionada: 27/11/98. Promulgada: Decreto N° 4468 del 16/12/98. Publicada: B.O. el 23/12/98.

Martinez Villalba J. 2017. Influencia del pH y temperatura en el crecimiento de bacterias hidrocarburolicas aisladas en suelos contaminados por hidrocarburos. Coloquio de investigación. Universidad Iberoamericana Torreon.

Mandana Ohadi, Gholamreza Dehghannoudeha, Hamid Forootanfar, Mojtaba Shakibaie, Majid Rajaei. 2018. Investigation of the structural, physicochemical properties, and aggregation behavior of lipopeptide biosurfactant produced by *Acinetobacter junii* B6. *International Journal of Biological Macromolecules* 112 (2018) 712–719.

Mejeha, O., Head, I., Sherry, A., McCann, C., Leary, P., Jones, D., Gray, N. 2019. Beyond N and P: The impact of Ni on crude oil biodegradation. *Chemosphere* 237 (2019) 124545.

Mohsen Mohamed Selim Asker, Youssri Mohamed Ahmed, Mohamed Fawzy Ramadan. 2009. Chemical characteristics and antioxidant activity of exopolysaccharide fractions from *Microbacterium terregens*. *Carbohydrate Polymers* 77 (2009) 563–567.

Nievas, M., Commendatore, M., Esteves, J., Bucala V. 2008. Biodegradation pattern of hydrocarbons from a fuel oil-type complex residue by an emulsifier-

producing microbial consortium. *Journal of Hazardous Materials* 154 (2008) 96–104.

Rosa Aznar Novella. 1991. "Caracterización fenotípica y genotípica de cepas ambientales de *Pseudomonas*. Universidad de Valencia. Facultad de Biología. Departamento de Microbiología. Valencia. España.

Obeso Rodríguez, J. 2017. Síntesis de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida*: estudios bioquímicos, genéticos y ultraestructurales. Tesis doctoral. Universidad de León. Facultad de Veterinaria. Departamento de Biología Molecular. Área de Bioquímica y Biología Molecular.

Olivera, N., Esteves, L., Commendatore, M. 1997. Alkane biodegradation by a microbial community from contaminated sediments in Patagonia, Argentina. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 40, No. 1. (1997) 75-19.

Ortiz, E., Núñez, R., Fonseca, E., Oramas, J., Almazán, V., Cabranes, Y., Miranda, A., Barbán, O., Martínez, C., Díaz, Y., Borges, G. 2005. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Contribución a la Educación y la Protección del Medio Ambiente.*, (6). p. 51-60.

Osman, Y., Elrazak, A., Khater, W. 2016. Microbial biopolymer production by *Microbacterium* WA81 in batch fermentation. *Egyptian journal of basic and applied sciences* 3 (2016) 250–262.

Pacwa-Płociniczak, M., Płociniczak, T., Iwan, J., Zarska, M., Chorazewski, M., Dzida, M., Piotrowska-Seget, Z. 2016. Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits. *Journal of Environmental Management* 168 (2016) 175-184.

Paíga, P., Mendes, L., Albergaria, J., Delerue Matos, C. 2011. Determination of total petroleum hydrocarbons in soil from different locations using infrared spectrophotometry and gas chromatography. Repositório Científico do Instituto Politécnico do Porto.

Paladino, G. 2016. Evaluación de alternativas de biotratamiento y reuso de recortes de perforación de pozos de gas y petróleo, mediante la aplicación de residuos y enmiendas orgánicas. Tesis de doctorado. Universidad Nacional del Comahue. Centro Regional Universitario Bariloche.

Pantaroto de Vasconcellos, S., Crespim, E., Feitosa da Cruz, G., Barbosa Senatore, D., Marques Simioni, K., Vaz dos Santos Neto, E., Marsaioli, A., Maia de Oliveira, V. 2009. Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *Organic Geochemistry* 40 (2009) 574–588.

Patel, M., Desai, A. 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Letters in applied Microbiology*. 1997, 25, 91-94.

Pere Joan Pont Antona. 2015. Caracterización taxonómica de nuevas cepas del género *Pseudomonas*. Memòria del Treball de Fi de Grau. Facultat de Ciències. Universitat de les Illes Balears.

Peressutti, S. 2021. Characterization of hydrocarbon degrading bacteria at EPEA station (38° 28' S-57° 41' W) Atlantic Coast. *Marine and Fishery Science* 34 (1). <https://doi.org/10.47193/mafis.3412021010304>.

Pérez Vargas, J., Anaya Reza, O., Chang Solis, C., Membrillo Venegas, I., Calva Calva, G. 2010. Producción de biosurfactantes por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno crecidas en hidrocarburos. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, vol.

41, 2010, pp. 1-9. Centro Nacional de Investigaciones Científicas. La Habana, Cuba.

Perfumo, A., Banat, I., Marchant, R. 2017. Going Green and Cold: Biosurfactants from Low-Temperature Environments to Biotechnology Applications. *Trends in Biotechnology*, March 2018, Vol. 36, No. 3.

Pode D. 1996. Natural atenuacion of soils En Seminar Series on Bioremediation of Hazardous waste sites: Parctical aproaches to implementation EPA 1625/R-96/001.

Raiger lustman, Laura J., López, Nancy I. 2009. Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Química Viva*, vol. 8, núm. 3, diciembre, 2009, pp. 146-161. Universidad de Buenos Aires Buenos Aires, Argentina.

Risuleo, F. Historia del petróleo en la Argentina. 2012. - 1a ed. – FODECO. Buenos Aires.

Ritu Tripathia, Jyoti Singh, Randhir kumar Bharti, Indu Shekhar Thakura. 2014. Isolation, Purification and characterization of lipase from *Microbacterium* sp. and its application in biodiesel production. *Energy Procedia* 54 (2014) 518 – 529.

Rodríguez-Uribe, M., Peña-Cabriales, J., Rivera-Cruz, M., Délano-Frier, J. 2021. Native bacteria isolated from weathered petroleum oil-contaminated soils in Tabasco, Mexico, accelerate the degradation petroleum hydrocarbons in saline soil microcosms. [Environmental Technology & Innovation 23](#) (2021) 101781.

Rupa Iyer, Ashish Damani, Brian Iken. 2017. Whole genome sequencing of *Microbacterium* sp. AISO3 from polluted San Jacinto River sediment reveals high bacterial mobility, metabolic versatility and heavy metal resistance. *Genomics Data* 14 (2017) 10–13.

Rupshikha Patowary, Kaustuvmani Patowary, Mohan Chandra Kalita, Suresh Deka. 2018. Application of biosurfactant for enhancement of bioremediation process of crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 129 (2018) 50–60.

Saggu, S., Jha, G., Mishra, P. 2019. Enzymatic degradation of biofilm by metalloprotease from *Microbacterium* sp. SKS10. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7:192. doi: 10.3389/fbioe.2019.00192.

Senila, M., Level, E., Senila, L., Cadar, O., Roman, M., Miclean, M. 2015. Analytical capability and validation of a method for total petroleum hydrocarbon determination in soil using GC-FID. *Studia UBB CHEMIA, LX, 2, Tom I, 2015* (p. 137-146).

Seung-Woo Jeonga, Jongshin Jeonga, Jaisoo Kimb. 2015. Simple surface foam application enhances bioremediation of oil-contaminated soil in cold conditions. *Journal of Hazardous Materials* 286 (2015) 164–170.

Seyler, T., Jaeger, B., Bockelmann, W., Geis, A., Heller, K. 2007. Molecular identification and differentiation of *Brevibacterium* species and strains. *Systematic and Applied Microbiology* 30 (2007) 50–57.

Silva, R., Grossi, V., Olivera, N., Alvarez, H. 2010. Characterization of indigenous *Rhodococcus* sp. 602, a strain able to accumulate triacylglycerides from naphthyl compounds under nitrogen-starved conditions. *Research in Microbiology* 161 (2010) 198-207.

Silva-Castro, G., Rodelas, B., Perucha, C., Laguna, J., González-López, J., Calvo., C. 2013. Bioremediation of diesel-polluted soil using biostimulation as post-treatment after oxidation with Fenton-like reagents: Assays in a pilot plant. *Science of the Total Environment* 445–446 (2013) 347–355.

Singh, A. Van Hamme, J., Ward, O. 2008. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances* 25 (2007) 99–121.

Singh, A., Van Hamme, J., Ward, O., 2007. Research review paper. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances* 25 (2007) 99–121.

Soares da Silva, R., Almeida, D., Hugo Meira, M., Silva, E., Farias, C., Rufino, R., Luna, J., Sarubbo, L. 2017. Production and characterization of a new biosurfactant from *Pseudomonas cepacia* grown in low-cost fermentative medium and its application in the oil industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 12 (2017) 206–215.

Sulbarán Mora, M., Bahsas, A., Velásquez, W., Otoniel Rojas, J. 2005. Caracterización de Biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* fluorescentes aisladas de emulsiones de petróleo pesado. *Ciencia* 13(2) (2005) 228 – 239.

Sunita J. Varjani, Vivek N. Upasani. 2017. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource Technology* 232 (2017) 389–397.

Sunita Varjani, Vivek N. Upasani, Ashok Pandey. 2020. Bioremediation of oily sludge polluted soil employing a novel strain of *Pseudomonas aeruginosa* and phytotoxicity of petroleum hydrocarbons for seed germination. [Science of The Total Environment](#). 1 (2020) 139766.

Szulc, A., Ambrozewicz, D., Sydow, M., Lawniczak, L., Piotrowska-Cyplik, A., Marecik, R., Chrzanowski, L. 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 (2014) 121-128.

Trujillo Toro, M., Ramírez Quirama, J. 2012. Bioremediation in soil contaminated with hydrocarbons in Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental – Volumen 3 Número 2*. ISSN 2145-6097.

Valenzuela, S., Oswaldo, J. 2018. Caracterización bioquímica y molecular de bacterias asociadas a nódulos de cuatro leguminosas en la provincia de Santa Elena, Ecuador. *Ciencia ergo-sum*, vol. 25, núm. 1.

Vecino. X., Rodríguez-López, L., Gudiña, E., Cruz, J., Moldes, A. Rodrigues, L. 2017. Vineyard pruning waste as an alternative carbon source to produce novel biosurfactants by *Lactobacillus paracasei*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 55 (2017) 40–49.

Wisconsin Department of Natural Resources Laboratory Certification Program. 1996. Analytical detection limit guidance & Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits. PUBL-TS-056-96.

Xiaoqiang Jia, Yun He, Lei Huang, Dawei Jiang, Wenyu Lu. 2019. n-Hexadecane and pyrene biodegradation and metabolization by *Rhodococcus* sp. T1 isolated from oil contaminated soil. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 27 (2019) 411–417.

Zawierucha, I., Malina, G. 2006. Bioaugmentation as a method of biodegradation enhancement in oil hydrocarbons contaminated soil. *Ecohydrology for Implementation of the European Water Framework Directive* Vol. 6 No 1- 4, 163-169.

Zuno Floriano, F., Estrada de los Santos, P., Gallegos Infante, J., Rocha Gúzman, N., Aldana Madrid, M., Virgen Calleros, G., Miller, M., Muñoz Ruiz, C. 2009.

Production of Potato Seedling in vitro Inoculated with *Pseudomonas* sp. Terra Latinoamericana 27: 207-217.