



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Efecto del agregado de surfactantes sobre la degradación de PAH y la diversidad de la comunidad microbiana de suelos crónicamente contaminados

Tesista: Cecotti, Martina

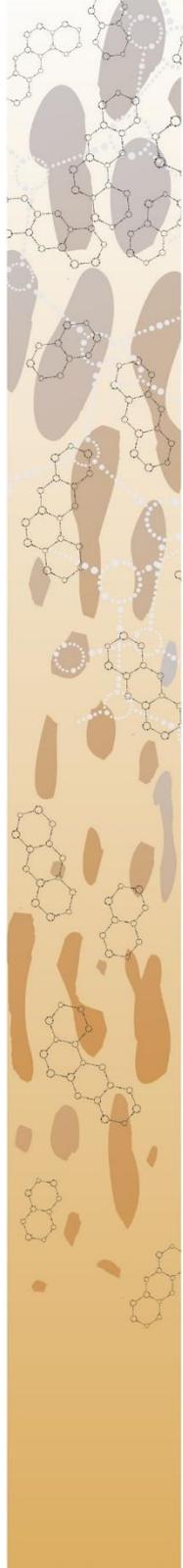
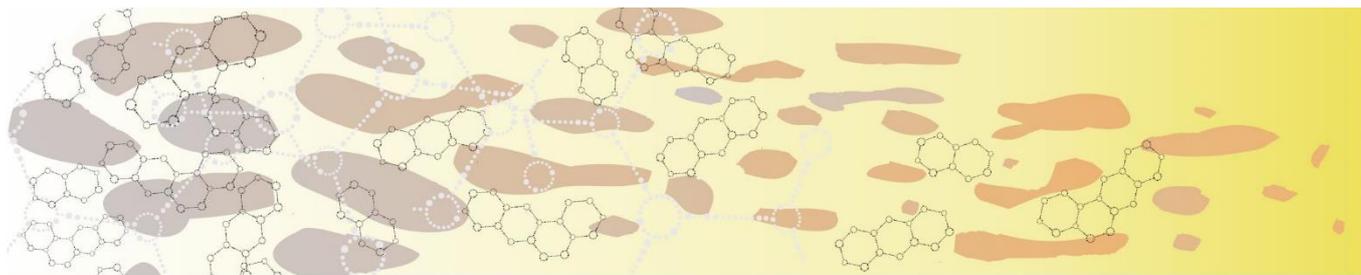
Director/a: Morelli, Irma Susana

Año: 2018

El presente trabajo, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Irma S. Morelli.

A mis padres y abuelos.

'Piano piano... si va lontano'



Agradecimientos

El presente trabajo de tesis doctoral fue logrado gracias a la excelente dirección de Irma, que me enseñó no sólo sobre biorremediación, sino que me mostró cómo encontrar las herramientas para seguir aprendiendo por mis propios medios, a abrir la mente y ver más allá de los resultados... ¡a disfrutar de la investigación! Gracias Irma por guiarme, acompañarme y comprenderme pacientemente en todos estos años.

Quiero agradecer a Bibi y Vero porque ambas fueron mis co-directoras extraoficiales. Gracias por lo que me transmitieron y lo que me ayudaron, tanto en lo académico como en la vida personal; gracias por su cariño.

Agradezco a CONICET por otorgarme la beca doctoral.

Gracias al CINDEFI, por permitirme trabajar en sus instalaciones para el desarrollo de mi tesis doctoral, además de presentarme muy buenos compañeros.

Gracias a la Facu de Ciencias Exactas por la formación que me brindó y que me permitió desenvolverme en el transcurso del doctorado.

Gracias a Pedro por su colaboración en la determinación de las MEEF.

Gracias a Marisa por su contribución en las determinaciones de tensión superficial.

Muchas muchas gracias a mis pás, no tengo palabras que alcancen para agradecerles todo lo que me brindaron. A Caro, porque me enseñó detalles de la vida que significaron todo (¡a vos te hace falta música!). A los tres ¡Gracias... TOTALES!

¡Gracias al afecto de toda mi familia! A Marinetta, por sus oídos, sesiones, risas, pacienciaaaa y ¡tantos momentos de la vida! A mis abuelos Inés, Vittorio y Abi por su amor incondicional.

Gracias Hu, gracias bonito por darme tanto cariño. Empecé el doctorado y empezamos nuestra vida juntos, ¡qué lindo crecer con vos! Gracias por hacerme reír y por la paciencia, en especial en estos últimos meses de nervios. ¡Gracias por tanto!

¡Agradezco al L5 completito! ¡Creciendo cada día más!

A Lauri y Caro, por su calidez y cariño presentes en el día a día.

A Sabri por acompañarme desde el comienzo, por enseñarme tantos ensayitos, por estar siempre atenta y dispuesta a charlar de lo que necesitara.

A Li y Nati por su buena onda de todos los días, gracias por sacarme sonrisas siempre.

A Viviani, por mostrarme nuevos puntos de vista y ayudarme a relajarme...un poco, no? ¡Gracias por tus abrazitos diarios!

A Este por escucharme siempre y confiar en mí.

A Mari, Marti y Juli, por su cálida compañía en el lab, durante el trabajo y en los recreítos.

A Pau por esos abrazos tan fortalecedores, gracias por tu cariño, confianza y por tus palabras alentadoras que no fallan.

A Marian por estar siempre cuando lo necesito, gracias por los consejos, abrazos, cariño y amistad.

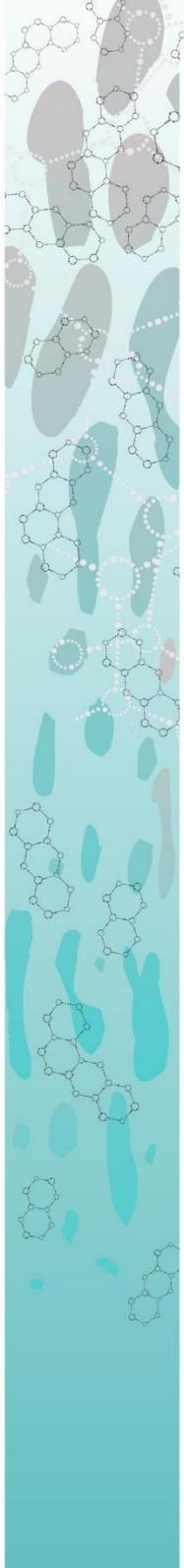
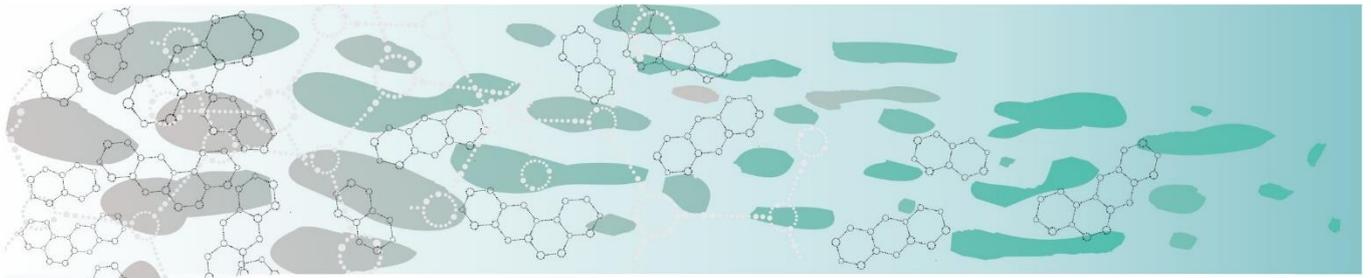
A Mari ¡doble colega! Gracias por acompañarme siempre en lo amargo y dulce de la vida ☺, gracias por tu amistad, apoyo y cariño.

A Ro y Carlitos, por esos mates tempraneros inolvidables que nos daban fuerzas para arrancar el día. Siempre con nosotras.

Quiero agradecerle a mi entrenadora preferida del verano '18, por las salidas llenas de energía y de charlas alentadoras. ¡Gracias Vane!

A mi familia Brandsense, gracias por tenerme presente en todo momento e invitarme a ser parte.

¡A mis amigos de la vida! Cande, Coti, Anto, Lu, Mel, Pauli, Emi, Sofi, Lu, Anto, Juan y Andrés, por su hermosa hermosa amistad. Gracias Mel y Pau por escucharme siempre y llenarme de cariño. Gracias Cand, Cot y Anto por tantas etapas compartidas y por acompañarnos en la vida. Gracias al grupete por estar, ¡siempre juntos!



Índice

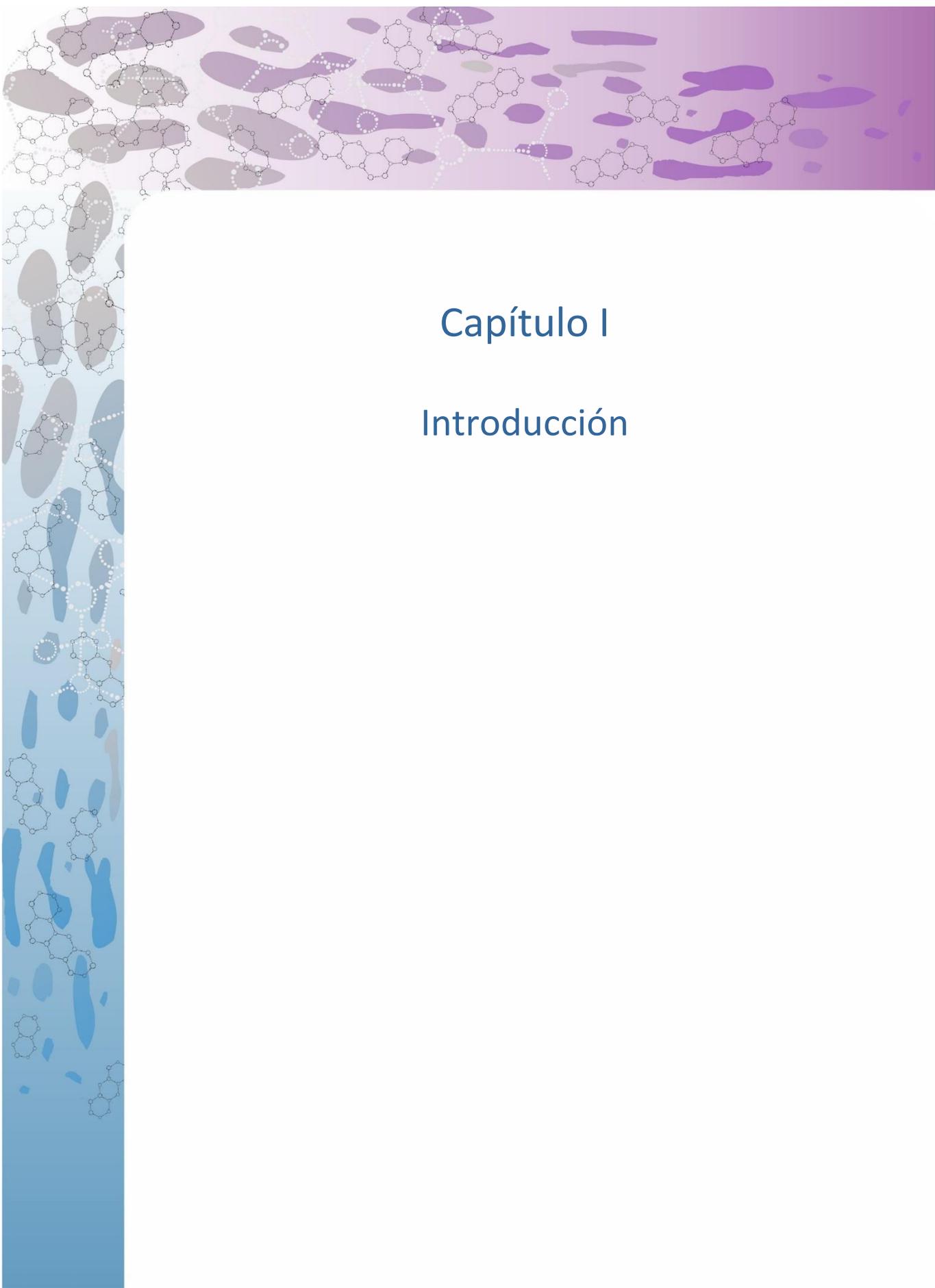
Índice

I. Introducción	19
I.1. El suelo	19
I.1.1. Suelos contaminados con hidrocarburos.....	21
I.2. Biorremediación de suelos contaminados con PAH	25
I.2.1. Biorremediación estimulada por surfactantes.....	30
I.2.1.1. Biosurfactantes.....	36
I.2.2. Estrategia de bioaumentación con bacterias degradadoras de PAH y productoras de biosurfactantes.....	39
II. Objetivos e Hipótesis	45
III. Materiales y Métodos	49
III.1. Materiales	49
III.1.1. Medios de cultivo	49
III.1.2. Buffers y soluciones.....	50
III.1.3. Otros reactivos	51
III.1.4. Muestras de suelo crónicamente contaminado	52
III.1.5. Cepas bacterianas	54
III.2. Métodos	55
III.2.1. Determinación de pH y conductividad eléctrica en suelo.....	55
III.2.2. Determinación de la capacidad de retención de agua.....	55
III.2.3. Determinación de la concentración micelar crítica de un surfactante en la fase acuosa de un suelo	55
III.2.4. Caracterización de cepas utilizadas en el bioaumentación	56
III.2.4.1. Presencia/ausencia de desarrollo de colonias características en R3A.....	57
III.2.4.2. Determinación de tensión superficial	57
III.2.4.3. Determinación de fenantreno remanente.....	57
III.2.5. Armado de microcosmos de suelo IPK.....	58
III.2.5.1. Tratamiento con la CMC de Triton X-100.....	58
III.2.5.2. Tratamiento con la CMC y dosis sub-CMC de Triton X-100	58
III.2.6. Armado de microcosmos de suelo prístino (P)	59
III.2.7. Armado de microcosmos de suelo MTC.....	59
III.2.7.1. Tratamiento con la CMC de Triton X-100.....	59
III.2.7.2. Microcosmos inoculados.....	60

III.2.7.3.	Tratamiento de los microcosmos con fertilizante.....	61
III.2.8.	Monitoreo de los microcosmos durante el período de incubación.....	61
III.2.8.1.	Determinación del porcentaje de humedad	61
III.2.8.2.	Determinación de tensión superficial en suspensiones de suelo	61
III.2.8.3.	Determinación de la concentración de hidrocarburos	62
III.2.8.4.	Determinación de la concentración de la fracción sorbida de hidrocarburos policíclicos aromáticos	63
III.2.8.5.	Matrices de excitación-emisión de fluorescencia de suelo.....	63
III.2.8.6.	Recuento de bacterias heterótrofas cultivables en R2A.....	65
III.2.8.7.	Recuento de bacterias cultivables degradadoras de PAH.....	65
III.2.8.8.	Recuento de bacterias cultivables degradadoras de hidrocarburos alifáticos	66
III.2.8.9.	Extracción de ADN total del suelo.....	66
III.2.8.10.	PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	66
III.2.8.11.	Análisis de secuenciación masiva.....	69
III.2.8.11.1.	Análisis de pirosecuenciación de muestras de IPK.....	69
III.2.8.11.2.	Análisis por Illumina de muestras de MTC	72
III.2.8.12.	PCR/DGGE.....	73
III.2.9.	Análisis estadístico	74
IV.	Efecto del surfactante Triton X-100 sobre la degradación de hidrocarburos y la comunidad bacteriana de un suelo crónicamente contaminado	77
IV.1.	Ensayo preliminar en microcosmos de suelo crónicamente contaminado tratado con Triton X-100 en la concentración micelar crítica	79
IV.1.1.	Determinación de la concentración micelar crítica de Triton X-100 en el suelo	79
IV.1.2.	Preparación de microcosmos.....	80
IV.1.2.1.	Efecto del Triton X-100 en la tensión superficial	80
IV.1.2.2.	Degradación de hidrocarburos.....	81
IV.1.2.3.	Análisis del efecto del Triton X-100 sobre la comunidad bacteriana del suelo	83
IV.1.2.3.1.	Recuento de bacterias cultivables.....	83
IV.1.2.3.2.	Dinámica de la comunidad bacteriana de los microcosmos mediante PCR/DGGE del gen 16S rARN.....	84
IV.2.	Estudio del efecto de la concentración de Triton X-100 en la biodegradación de PAH y en la estructura y dinámica de la comunidad bacteriana mediante ensayos de microcosmos	87
IV.2.1.	Efecto en la tensión superficial	87

IV.2.2.	Desorción y biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos.....	88
IV.2.3.	Degradación de hidrocarburos alifáticos	91
IV.2.4.	Monitoreo de Triton X-100	92
IV.2.5.	Matrices de excitación-emisión de fluorescencia	94
IV.2.6.	Análisis del efecto del Triton X-100 a las distintas concentraciones sobre la comunidad bacteriana del suelo	100
IV.2.6.1.	Recuento de bacterias heterótrofas cultivables en el medio R2A	100
IV.2.6.2.	Recuento de bacterias cultivables degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos	101
IV.2.6.3.	Recuento de bacterias cultivables degradadoras de hidrocarburos alifáticos	102
IV.2.6.4.	Análisis del potencial degradador de las comunidades bacterianas mediante PCR cuantitativa	103
IV.2.6.5.	Diversidad, estructura y composición de la comunidad bacteriana del suelo	105
IV.3.	Discusión	114
V.	Bioaumentación con cepa productora de surfactante: efecto sobre la degradación de hidrocarburos y la comunidad bacteriana de un suelo crónicamente contaminado	121
V.1.	Caracterización de las cepas utilizadas en la estrategia de bioaumentación: determinación de tensión superficial y degradación de fenantreno.....	123
V.2.	Caracterización de co-cultivos de las cepas utilizadas en el bioaumentación.....	126
V.3.	Ensayos de bioaumentación en microcosmos de suelo crónicamente contaminado.....	129
V.3.1.	Efecto en la tensión superficial	130
V.3.2.	Desorción y biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos.....	131
V.3.3.	Degradación de hidrocarburos alifáticos	137
V.3.4.	Monitoreo de Triton X-100	138
V.3.5.	Análisis del efecto de los tratamientos sobre la comunidad bacteriana del suelo	139
V.3.5.1.	Recuento de bacterias heterótrofas cultivables en R2A.....	139
V.3.5.2.	Recuento de bacterias cultivables degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos	142
V.3.5.3.	Diversidad, estructura y composición de la comunidad bacteriana del suelo	144
V.4.	Discusión	157

VI.	Conclusiones generales	171
VII.	Bibliografía	175
VIII.	Material suplementario	197
VIII.1.	Figuras y tablas suplementarias al Capítulo IV.....	197
VIII.2.	Figuras y tablas suplementarias al Capítulo V.....	211



Capítulo I

Introducción

I. Introducción

I.1. El suelo

Según el concepto de Atlas y Bartha (2001) y Nannipieri y col. (2003), “el suelo es un sistema estructurado, heterogéneo y discontinuo, fundamental e irremplazable, desarrollado a partir de una mezcla de materia orgánica, minerales y nutrientes capaces de sostener el crecimiento de los organismos y los microorganismos” (García y col., 2012).

Su formación es un proceso complejo que involucra cambios físicos, químicos y biológicos de la roca originaria. Los físicos implican la reducción del tamaño de las partículas sin ninguna alteración en su composición, y son causados por ciclos de hielo-deshielo, lluvia y otros efectos ambientales. Los químicos son originados por la separación de las partículas minerales de las rocas; su alteración o destrucción y la re-síntesis a compuestos sólidos estables se deben, principalmente, a la acción del agua, el oxígeno, el dióxido de carbono y los compuestos orgánicos (García y col., 2012).

Por su parte, los cambios biológicos son realizados por la comunidad que habita en el suelo: flora (plantas), macrofauna (invertebrados), mesofauna (artrópodos, anélidos, nemátodos y moluscos), microfauna (protozoos y algunos nemátodos) y microbiota (bacterias, hongos y algas). Estos cambios consisten en: la degradación y el aporte de materia orgánica, la producción de CO₂ en la respiración, la intervención en los ciclos biogeoquímicos de los elementos y los efectos mecánicos de los animales y las plantas, así como el fraccionamiento de las rocas por las raíces, entre otros (García y col., 2012). El 80-90% de los procesos son mediados por la microbiota (Nannipieri et al., 2003; Porta et al., 2003).

El suelo es un recurso indispensable para la vida que permite el desarrollo de las plantas, los animales y el hombre, siendo en este contexto la base fundamental para la explotación agropecuaria y forestal (García y col. 2012).

Existe una gran heterogeneidad de suelos, los cuales cumplen un amplio rango de funciones y son sometidos a variadas presiones (Tzilivakis y col. 2005), algunas de ellas se enumeran en la tabla I.1 y reflejan la necesidad de mantenerlo ‘vivo y sano’.

Tabla I.1. Diferentes funciones que puede cumplir el suelo. Adaptación de Tzilivakis y col. 2005.

Funciones	Descripción
Producción agrícola	Alimentos, otras producciones agrícolas esenciales para la supervivencia del hombre y silvicultura son totalmente dependientes del suelo. Casi toda la vegetación incluyendo la de la llanura, cereales y árboles, necesitan del suelo para obtener agua y nutrientes y para sostener sus raíces.
Almacenamiento, filtración y transformación	El suelo almacena y en parte transforma minerales, materia orgánica, agua y energía, y diversas sustancias químicas. Funciona como filtro natural del agua subterránea, la principal fuente de agua potable, y libera CO ₂ , metano y otros gases a la atmósfera.
Hábitat y pool genómico	El suelo es el hábitat de gran cantidad y variedad de organismos que viven en él, cada uno con patrones genéticos únicos, siendo partícipe de funciones ecológicas esenciales.
Ambiente físico y cultural para la humanidad	El suelo proporciona un soporte para la actividad humana y también es un elemento que aporta al patrimonio cultural y paisajístico.
Fuente de materias primas	Los suelos proporcionan materias primas tales como arcilla, arenas, minerales y turba.

I.1.1. Suelos contaminados con hidrocarburos

Las demandas de la sociedad de consumo hicieron de la contaminación un problema mundial a gran escala. El incremento de la contaminación ha llevado al deterioro pronunciado de la calidad ambiental y representa, en casos extremos, un importante desafío social que requiere encontrar maneras efectivas de revertir las condiciones negativas que afectan fuertemente la calidad de vida de las comunidades.

Los contaminantes del suelo pueden incluir una amplia variedad de compuestos, orgánicos e inorgánicos, que pueden derivar tanto de actividades antropogénicas como de fuentes naturales. El petróleo y sus derivados comprenden la mayor fuente de energía a nivel global y conllevan un gran riesgo de derrames accidentales durante actividades de exploración, refinación, procesos industriales y transporte (Bastida y col., 2016). Comprende mezclas de miles de diversos compuestos, mayoritariamente hidrocarburos, formados a partir de la fosilización o diagénesis sufrida por restos orgánicos sometidos a condiciones de elevada presión y temperatura durante millones de años. Así mismo, contienen derivados heteroatómicos sulfurados, nitrogenados y oxigenados, en menor medida, y también metales como hierro, vanadio, níquel, en forma de complejos organometálicos. La composición química de crudos procedentes de diversas regiones puede presentar gran variabilidad, aunque siempre son las mismas familias de hidrocarburos, en mayor o menor medida, las presentes en la mezcla de compuestos (Lladó, 2012) (Figura I.1):

- Hidrocarburos saturados, básicamente n-alcenos e isoprenoides pero también cicloalcenos. Contienen el número máximo de hidrógenos posibles.
- Hidrocarburos aromáticos, mono (con un anillo bencénico) o policíclicos (con más de uno) y/o con sustituyentes alquilados, representan entre un 1 y un 20% de los hidrocarburos totales en la mayoría de crudos.
- Compuestos polares (resinas y asfaltenos), más complejos, con azufre, nitrógeno y/u oxígeno y pueden contener también metales.

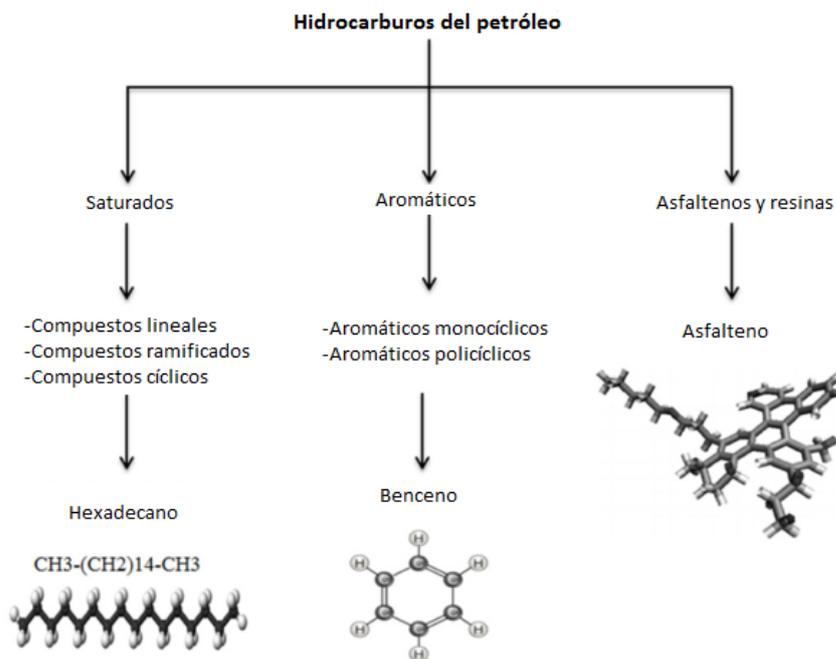


Figura I.1. Hidrocarburos del petróleo (Lladó, 2012).

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) están conformados por la fusión de dos o más anillos bencénicos. Se presentan como sólidos incoloros o bien de coloración blanquecina o amarillo-pálida, con baja solubilidad en agua, altos puntos de fusión y ebullición, baja presión de vapor y alta hidrofobicidad, representada por el coeficiente de reparto n-octanol/agua ($\log K_{ow}$). A medida que aumenta su peso molecular, disminuye su solubilidad en agua, aumentan sus puntos de fusión y ebullición y disminuye la presión de vapor. En este contexto, pueden clasificarse en dos grupos: PAH de bajo peso molecular, aquellos con 2 o 3 anillos (LMW, del inglés *Low Molecular Weight*) y alto peso molecular, con más de 4 anillos fusionados (HMW, del inglés *High Molecular Weight*) (Kuppusamy y col., 2017).

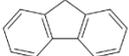
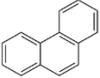
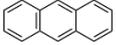
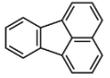
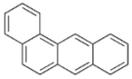
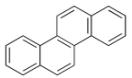
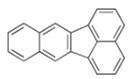
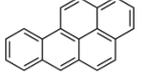
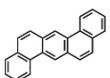
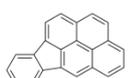
Los PAH fueron quizás los primeros carcinógenos ambientales reconocidos como tales. Su presencia en gran parte de componentes ambientales, su resistencia a la biodegradación, su potencial bioacumulación, toxicidad, carcinogenicidad y mutagenicidad han significado una gran preocupación (Haritash y Kaushik, 2009). Si bien los PAH sin metabolizar pueden tener efectos tóxicos, es de crucial importancia el efecto de los metabolitos reactivos, como los epóxidos y dihidrodioles, de algunos PAH que pueden unirse a las proteínas celulares y al ADN; estos daños celulares pueden llevar a

mutaciones, desarrollo de malformaciones, tumores y cáncer (Abdel-Shafy y Mansour, 2016). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), la Organización Mundial de la Salud (WHO) y la Comunidad Económica Europea (CEE) han considerado a 16 PAH como contaminantes prioritarios (Tabla I.2).

Diversos organismos y agencias han establecido clasificaciones para determinar la carcinogenicidad de sustancias químicas. Actualmente la más aceptada es la clasificación de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, conocida por sus siglas en inglés IARC (*International Agency for Research on Cancer*), una agencia con sede en Lyon (Francia), dependiente de la Organización Mundial de la Salud. La clasificación de la IARC tiene cuatro grupos principales (Agudo, 2009) que abarcan desde sustancias que probablemente no son carcinogénicas para los seres humanos (Grupo 4), sustancias de las que no se tiene información suficiente sobre su carcinogenicidad, sustancias cuya toxicidad ha sido probada en animales pero no en hombres, hasta las que ya son conocidas como carcinógenas (Grupo 1). La IARC ha clasificado un único PAH, el benzo(a)pireno, como carcinógeno para el ser humano (Grupo 1).

Además de la contaminación por derrames de petróleo, otras actividades antropogénicas como incineraciones de combustibles fósiles, de alquitrán de hulla, de maderas, basura, desperdicios industriales, aceite de lubricación y filtros de aceite usados son fuente de liberación de PAH al medio ambiente (Haritash y Kaushik, 2009). Por otra parte, existen fuentes de contaminación naturales con estos compuestos, como lo son los incendios forestales y de pastizales, filtraciones naturales de hidrocarburos, erupciones volcánicas y exudados de árboles. La combustión incompleta derivada tanto de causas naturales como antropogénicas, ha sido reportada como el proceso que mayormente contribuye a la liberación de PAH en el ambiente. Los PAH liberados a la atmósfera son continuamente depositados en el suelo por diferentes procesos (Abdel-Shafy y Mansour, 2016).

Tabla I.2. Propiedades de los 16 PAH clasificados como contaminantes prioritarios por EPA.

PAH	Estructura química	Peso molecular	Solubilidad en agua (mg/L) a 25°C	Log (K _{ow})
Naftaleno		128,2	31,9	3,5
Acenafteno		152,2	4,4	3,95
Acenaftileno		152,2	3,9	3,94
Fluoreno		166,2	1,8	4,28
Fenantreno		178,2	1,2	4,57
Antraceno		178,2	0,066	4,68
Fluoranteno		202,3	0,25	5,23
Pireno		202,3	0,14	4,47
Benzo(a)antraceno		228,3	0,002	5,91
Criseno		228,3	0,003	5,81
Benzo(b)fluoranteno		252,3	0,0016	5,74
Benzo(k)fluoranteno		252,3	0,0008	6,06
Benzo(a)pireno		252,3	0,004	6,13
Benzo(g,h,i)perileno		276,3	0,0005	6,22
Dibenzo(a,h)antraceno		278,4	0,0005	6,84
Indeno(1,2,3-c,d)pireno		276,3	Insoluble	6,20

Los datos fueron obtenidos de bibliografía (Pearlman y col., 1984; De Maagd y col., 1998; Friedrich y col., 2000; Elliot y col., 2011; Madueño, 2013).

En el año 1993 se promulgó la Ley Nacional 24.051 de Residuos Peligrosos, cuyo Decreto reglamentario (número 831/93) cita las concentraciones permitidas de distintos contaminantes en suelos de distintos usos: agrícola, residencial e industrial (Peluffo,

2016). En la Tabla I.3 se pueden observar los niveles guía de calidad de suelo para los PAH analizados en el presente trabajo de tesis que figuran en la lista de Residuos peligrosos de dicha ley.

Tabla I.3. Niveles guía de calidad de suelos con distintos usos para PAH (Ley 24.051 de Residuos peligrosos, Decreto 831/93).

PAH	CAS	Uso agrícola	Uso residencial	Uso industrial
Fenantreno	85-01-8	0,1	5	50
Pireno	129-00-0	0,1	10	100
Benzo (a) antraceno	56-55-3	0,1	1	10
Benzo (b) fluoranteno	205-99-2	0,1	1	10
Benzo (k) fluoranteno	207-08-9	0,1	1	10
Benzo (a) pireno	50-32-8	0,01	1	10

En julio de 2002, el Congreso Nacional sancionó la ley de presupuestos mínimos de gestión integral de residuos industriales y de actividades de servicios. La ley 25.612 fue dictada con el objeto de reemplazar íntegramente a la ley 24.051. Sin embargo, al día de hoy la reglamentación de la ley 24.051 se mantienen temporariamente vigente, incluyendo (i) las categorías sometidas a control, (ii) las características de peligrosidad de un residuo y (iii) las operaciones de eliminación (incluyendo la reutilización y el reciclado de los desechos).

Debido a su persistencia y a su probada toxicidad y carcinogenicidad, es necesario dedicar esfuerzos para identificar el mejor método para remediar los suelos contaminados con este tipo de contaminantes.

I.2. Biorremediación de suelos contaminados con PAH

La biorremediación es la estrategia de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos más ampliamente utilizada, donde se aprovechan e incentivan los procesos de biodegradación naturales para transformar y degradar contaminantes orgánicos. Hoy en día, ha demostrado ser una tecnología costo-competitiva con respecto a otras opciones que existen en el marco de la remediación de suelos como lo

son la extracción química, incineración y desorción térmica. Adicionalmente es ambientalmente amigable y una de sus ventajas frente a otras estrategias es que el suelo tratado retiene muchas de sus funciones claves, lo que permite que se vuelva a utilizar y le proporciona nuevamente valor económico (Desai y col., 2010; Ortega-Calvo y col., 2013).

La capacidad metabólica de las poblaciones microbianas, frente a los contaminantes presentes en un suelo, es el fundamento sobre el que se sustenta la tecnología de la biorremediación. Generalmente, en un suelo con contaminación recurrente o con episodios previos de contaminación, las poblaciones microbianas autóctonas se habrán seleccionado en favor de la metabolización del contaminante, el cual puede ser transformado con mayor rapidez que la materia orgánica húmica del suelo (Lladó, 2012). Cuando se monitorea la remediación de un suelo contaminado a medida que ocurre mediante procesos naturales *in situ*, se denomina atenuación natural e incluye la degradación biológica mayoritariamente, aunque también ocurre por volatilización, dispersión, dilución y sorción de los contaminantes por la materia orgánica y minerales del suelo. La atenuación natural puede encontrarse limitada por la disminución en la biodisponibilidad de diferentes sustratos necesarios para la actividad microbiana como pueden ser los aceptores de electrones y nutrientes, motivo por el cual la determinación de la composición del suelo puede resultar útil como indicador del potencial biodegradador. Si bien puede implicar la eliminación completa de los contaminantes y reducir considerablemente los costos de remediación, es un proceso muy lento que requiere de mayores tiempos de monitoreo que las otras tecnologías, podría generar sub-productos de degradación potencialmente más tóxicos que los compuestos iniciales y provocar la desorción o re-solubilización de contaminantes (Mulligan y Yong, 2004). Adicionalmente, los componentes inhibitorios o tóxicos de las mezclas de contaminantes pueden atenuar el potencial degradador microbiano y constituir factores de estrés importantes (Megharaj y col., 2011).

Los tratamientos de biorremediación pueden clasificarse en *in situ* o *ex situ* según se realicen en el mismo predio contaminado o fuera de él, lo que implica su excavación y transporte hasta el lugar donde vaya a ser tratado (Lladó, 2012). Además de la bioatenuación, otras estrategias que pueden aplicarse *in situ* son el bioaumentación y la

bioestimulación. El bioaumentación consiste en la inoculación de microorganismos que, debido a su amplia biodiversidad y gran potencial catabólico, se han convertido en una herramienta atractiva para la remediación de suelos contaminados. En aquellos casos de contaminación puntual o de compuestos recalcitrantes, puede ser necesaria la inoculación de poblaciones alóctonas, con capacidades degradativas especializadas, para posibilitar la degradación de los contaminantes existentes (Lladó, 2012).

La bioestimulación consiste en la estimulación de la transformación de contaminantes por los microorganismos, que generalmente es dependiente del suministro de carbono, nutrientes como N y P, de la temperatura, disponibilidad de oxígeno, pH del suelo, potencial redox e incluso del tipo, concentración y biodisponibilidad de los contaminantes. El suministro de nutrientes para favorecer la degradación microbiana suele agregarse en forma de fertilizantes, ya sean solubles en agua, de lenta liberación o hidrofóbicos.

La interacción entre microorganismos degradadores, la matriz del suelo contaminado y los contaminantes juegan un rol relevante en el proceso de biorremediación. Cuando un contaminante llega al suelo, es sometido a varios procesos que determinan su eliminación o persistencia en la matriz. Su eliminación puede ser tanto biótica como abiótica y ocurre a diferentes velocidades a través de volatilización, foto-oxidación, oxidación química, lixiviación, degradación microbiana, absorción por plantas, entre otros (Figura I.2) (Stokes y col., 2006; Haritash y Kaushik, 2009). Una vez depositados, los contaminantes tendrán determinada movilidad dependiendo de su sorción a la matriz del suelo, la cual depende a su vez del tamaño de las partículas y poros, así como de las propiedades del compuesto (Abdel-Shafy y Mansour, 2016). La materia orgánica es uno de los factores más importantes, ya que tiene una influencia dominante en las interacciones entre el suelo y los contaminantes orgánicos. En el caso particular de los PAH, a medida que aumenta el número de anillos, se tornan más difíciles de degradar por su menor volatilidad y solubilidad y mayor sorción al suelo (Mulligan, 2005). El porcentaje de materia orgánica controla el fraccionamiento de los hidrocarburos en la fase orgánica del suelo y el grado de sorción, afectando la tasa de degradación (Koshlaf y Ball, 2017).

La figura I.3 muestra a modo de ejemplo tres tipos de contaminantes con patrones de eliminación del suelo diferentes (Stokes y col., 2006; Kuppusamy y col., 2017). El tipo A describe el comportamiento de un químico con muy baja solubilidad en agua, no volátil y no degradable, que en consecuencia persiste en el suelo por mucho tiempo; este podría ser el caso de los PAH de HMW recalcitrantes. El tipo B representa un contaminante con comportamiento bifásico, donde inicialmente es eliminado del suelo pero a medida que transcurre el tiempo de contacto con la matriz del suelo, tanto la tasa como el grado de eliminación disminuyen; este puede ser el ejemplo de PAH de HMW que se encuentran moderadamente biodisponibles. El tipo C es rápida y casi completamente eliminado del suelo, lo que suele suceder a PAH de LMW (Stokes y col., 2006; Kuppusamy y col., 2017).

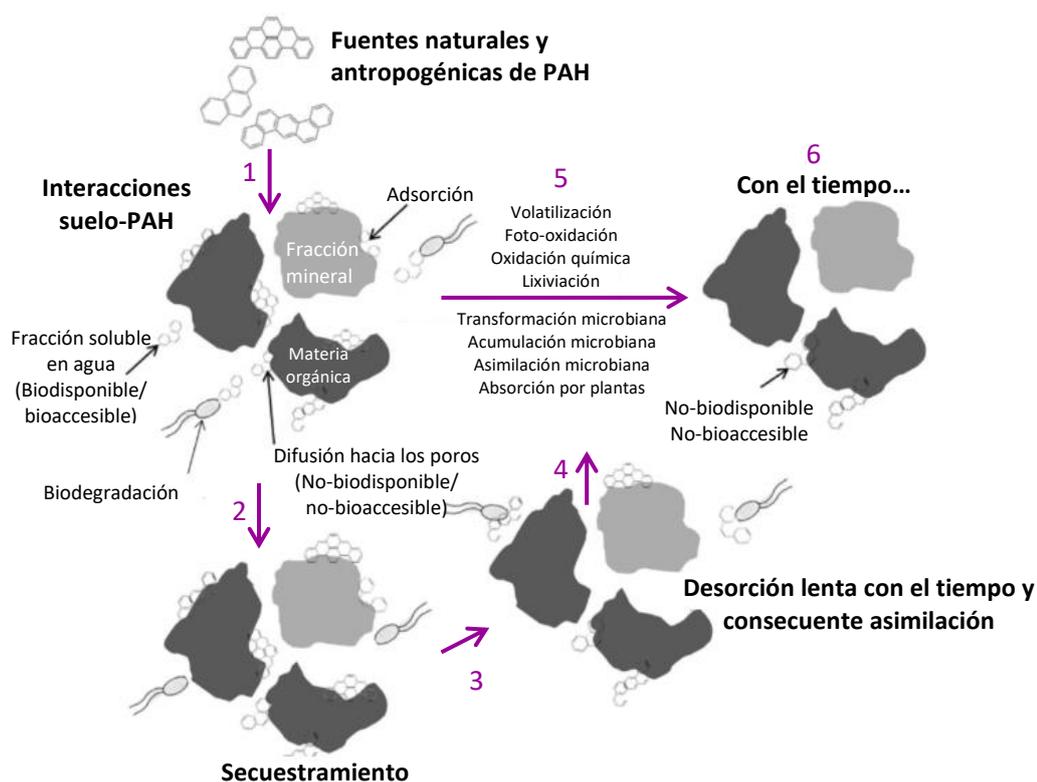


Figura I.2. Esquema de las interacciones entre PAH y los diferentes componentes del suelo.

Imagen adaptada de Kuppusamy y col. (2017).

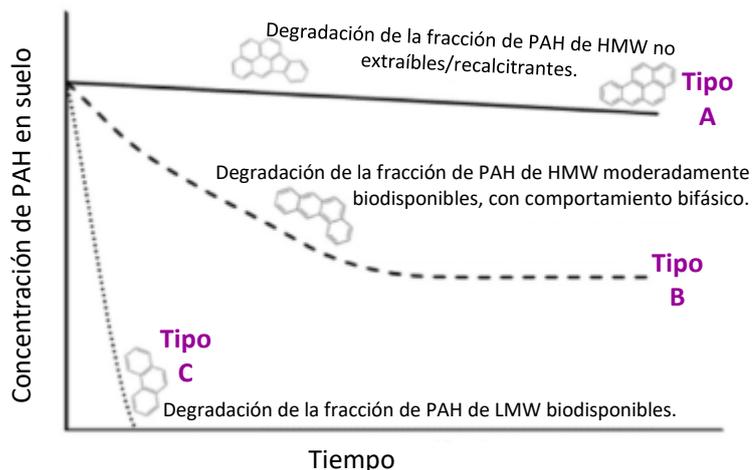


Figura I.3. Patrones de eliminación de tres diferentes tipos de contaminantes luego de que hubieran llegado al suelo. Imagen adaptada de Stokes y col. (2006) y Kuppusamy y col., (2017).

Como se aprecia en la figura I.2, a medida que transcurre el tiempo de contacto suelo-contaminante, la asociación entre ellos se vuelve cada vez más fuerte, disminuyendo la fracción que podría ser utilizada o transformada por la comunidad microbiana del suelo, además de presentar potencial toxicidad. Esta fracción es definida como ‘fracción biodisponible’ según Ortega-Calvo y col. (2013) y Koshlaf y Ball (2017). En este marco, Semple y col. (2004) hace una distinción entre los conceptos biodisponibilidad y bioaccesibilidad: un compuesto biodisponible es aquel que se encuentra libremente disponible para atravesar la membrana celular de un organismo en el medio donde habita este último en un determinado momento; mientras que un compuesto bioaccesible es aquel que está disponible para atravesar la membrana celular del organismo si el organismo tiene acceso a él, incluyendo a los contaminantes que están biodisponibles y potencialmente biodisponibles.

La biodisponibilidad de los contaminantes involucra entonces procesos de adsorción y desorción, transporte y transformación por los microorganismos, siendo la desorción la que determina la susceptibilidad del suelo hacia la degradación microbiana (Megharaj y col., 2011; Ren y col., 2017). Debe considerarse que las concentraciones residuales de PAH luego de un proceso de biorremediación pueden limitar el uso del área tratada, o incluso impedir su uso, si no llegan a los requerimientos legales (Ortega-Calvo y col., 2013).

I.2.1. Biorremediación estimulada por surfactantes

La aplicación de surfactantes, moléculas anfipáticas que aumentan la solubilidad en agua de compuestos hidrofóbicos, podría mejorar la efectividad de los procesos de biorremediación de suelos crónicamente contaminados con PAH (Bautista y col., 2009). Esta estrategia de bioestimulación ha sido denominada SEBR, del inglés *Surfactant Enhanced Bioremediation*.

La estructura química de las partes hidrofóbicas e hidrofílicas de los surfactantes pueden tener grandes diferencias entre las distintas moléculas. En base a la naturaleza de la cabeza hidrofílica pueden clasificarse en surfactantes no-iónicos e iónicos (catiónicos, aniónicos y zwitteriónicos -combinación de ambos grupos) (Ishiguro y Koopal, 2016). Existen moléculas con dos o más grupos hidrofílicos o hidrofóbicos denominadas surfactantes gemini. Las moléculas tensioactivas pueden clasificarse también según su origen en surfactantes químicos (sintéticos) o naturales (biosurfactantes) (Lamichhane y col., 2017). Los biosurfactantes pueden sintetizarse por microorganismos (glicolípidos, lipopéptidos) o plantas (saponina). En la figura I.4 se ejemplifican los distintos tipos de surfactantes.

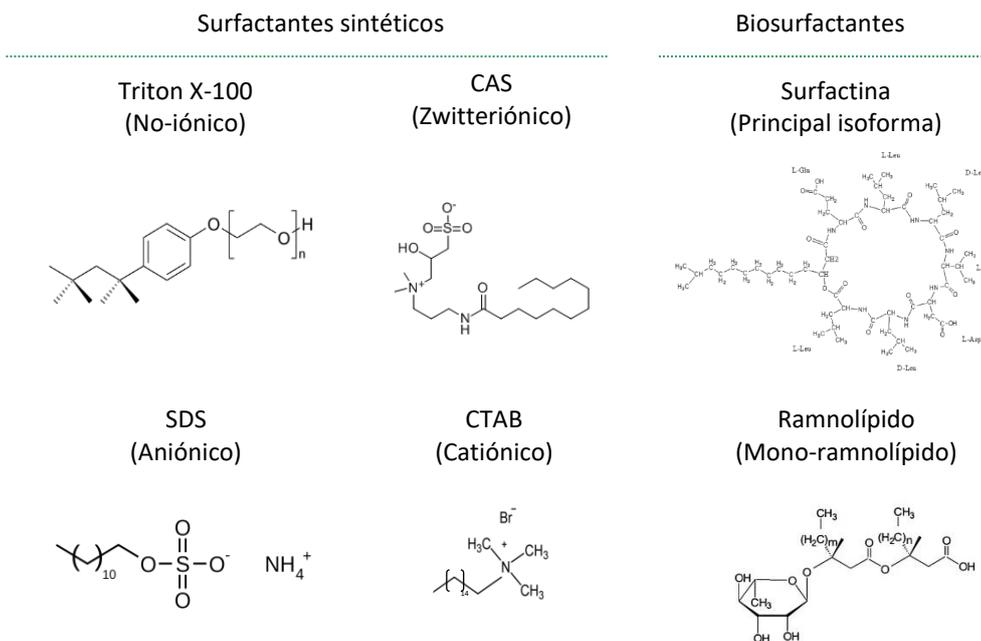


Figura I.4. Estructuras químicas de distintos ejemplos de surfactantes. CAS: cocamidopropilhidroxisultaína; SDS: dodecil sulfato de sodio; CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio.

En una solución acuosa, los monómeros de surfactantes se disponen entre las fases inmiscibles líquido-aire como también líquido-líquido (Li y Chen, 2009) disminuyendo la fuerza de repulsión entre las mismas y en consecuencia la tensión superficial e interfacial (Souza y col., 2014) (Figura I.5). A partir de cierta concentración denominada Concentración Micelar Crítica (CMC), las interacciones hidrofóbicas entre moléculas de surfactante predominan respecto a las interacciones hidrofílicas surfactante/agua, de forma que comienzan a asociarse espontáneamente en estructuras laminares o esféricas con una fase hidrofóbica en el interior. La forma de los agregados depende de la estructura de las moléculas de surfactante, del número de grupos hidrofóbicos, del grado de insaturación y ramificación de la cadena, de las interacciones entre las cabezas hidrofílicas, de su grado de hidratación, entre otros (Ishiguro y Koopal, 2016). Los surfactantes iónicos forman micelas con mayor dificultad que los no-iónicos de igual longitud de cadena alquílica debido a que se necesita mayor concentración para sobrepasar la repulsión electrostática entre los grupos hidrofílicos de los surfactantes iónicos durante la formación de agregados (Mao y col., 2015).

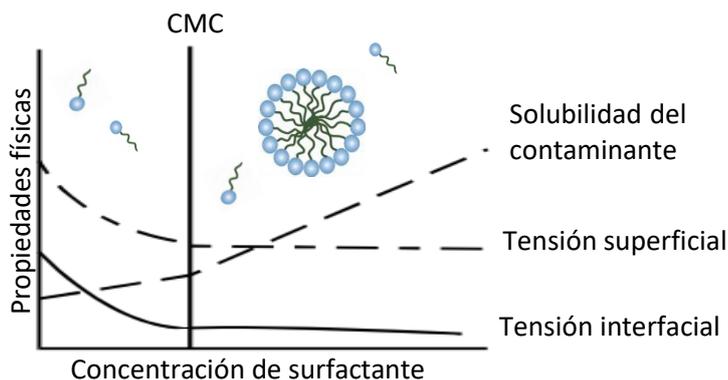


Figura I.5. Esquema de la variación de la tensión superficial, tensión interfacial y la solubilidad del contaminante con la concentración de surfactante. Adaptación de Mulligan y col. (2001).

Al aplicar un surfactante en un sistema heterogéneo de un suelo contaminado, la cabeza hidrofílica de los monómeros de surfactante tiende a disponerse en la fase acuosa del suelo mientras que la cola hidrofóbica interacciona con las partículas del suelo o los contaminantes llevando a su acumulación en las interfaces suelo-líquido y líquido-líquido y a una disminución en la tensión superficial e interfacial. A medida que aumente la concentración del surfactante, llegará una instancia en que alcance la CMC en la fase acuosa de este sistema y comiencen a formarse las micelas (Mao y col., 2015). Debido a la gran sorción de las moléculas tensioactivas al suelo, mayores concentraciones de surfactante serán necesarias para alcanzar la CMC en la fase acuosa del sistema suelo/agua con respecto a una solución acuosa (Adrion y col., 2016).

En bibliografía se han propuesto y estudiado distintos mecanismos mediante los cuales los surfactantes podrían solubilizar contaminantes, como los PAH, en un suelo contaminado:

- *Solubilización micelar.* Implica la partición de PAH en las micelas a concentraciones de surfactante por encima de la CMC en la fase acuosa, aumentando la tasa de desorción al aumentar el gradiente de concentración entre el sorbente y la fase acuosa (Adrion y col., 2016). No obstante, mientras se ha demostrado en algunos estudios que PAH disueltos en la fase micelar no se encontraban disponibles para ser degradados (Makkar y Rockne, 2003; de la Cueva y col., 2016), en otros no se observó limitación de la biodisponibilidad por

la solubilización en micelas (Li y Chen, 2009; Makkar y Rockne, 2003). Sería entonces la biodisponibilidad de los hidrocarburos solubilizados la que determinaría el proceso general de biodegradación de dicho sustrato, lo que depende tanto de la estructura molecular y concentración del surfactante como de la comunidad microbiana involucrada (Li y Chen, 2009).

- *Modificación de la matriz del suelo contaminada.* Este fenómeno se ha observado en concentraciones de surfactante tanto por debajo como por encima de la CMC en la fase acuosa del suelo (Adrion y col., 2016). Los efectos hipotéticos sobre la matriz incluyen el aumento en las difusividades del sistema (Yeom y col., 1996) y cambios en la humectabilidad del sistema (Bezza y Chirwa, 2017). La humectabilidad se define como la tendencia de un fluido de adherirse y extenderse sobre la superficie de un sólido. Dicha propiedad se modifica al acumularse los monómeros de surfactante en las interfaces suelo-contaminante y suelo-agua, disminuyendo la tensión interfacial y aumentando el contacto entre las fases acuosa y sólida, promoviendo así la separación del contaminante de las partículas del suelo (de la Cueva y col., 2016; Bezza y Chirwa, 2017).

Hasta la fecha, se han utilizado distintas técnicas que permiten medir la biodisponibilidad de PAH, como lo son: la extracción no-exhaustiva por solvente orgánico como n-butanol o hexano; extracción acuosa en los lavados de suelo; extracción acuosa con un carrier hidrofóbico como perlas de Tenax TA, Amberlite XAD-2, ciclodextrinas o discos con C18; extractantes de fase sólida (SPE, del inglés *Solid Phase Extractants*), consistentes en una fase sólida hidrofóbica con membranas C18 o Tenax TA; y la oxidación química, como la aplicación de persulfato (Riding y col., 2013).

En general, el orden de capacidad de solubilización de PAH por los diferentes tipos de surfactantes sintéticos que se han probado es: no-iónicos > catiónicos > aniónicos (Lamichhane y col., 2017).

Si bien se ha corroborado la capacidad de surfactantes de estimular la solubilidad y disolución de hidrocarburos en suelos contaminados, se han reportado resultados contradictorios sobre su habilidad en promover la biodegradación de los contaminantes. Resulta necesario realizar estudios que permitan determinar el verdadero efecto que la

solubilización/movilización tiene sobre la utilización microbiana de los hidrocarburos (Li y Chen, 2009).

Existen distintas hipótesis sobre los mecanismos a través de los cuales los surfactantes podrían estimular la biodegradación de PAH (Li y Chen, 2009; Makkar y Rockne, 2003):

- Aumento de la solubilidad y consecuente biodisponibilidad del sustrato para las bacterias por liberación del hidrocarburo desde la micela.
- Transporte del hidrocarburo a través de la membrana celular facilitado por el contacto célula-surfactante-contaminante.
- Estimulación por el surfactante de la adsorción de las células a las partículas del suelo ocupadas por hidrocarburos, disminuyendo la longitud del camino de difusión entre las zonas de adsorción y utilización por el microorganismo.
- Facilita el contacto de los microorganismos con la interface hidrocarburo/agua.
- Facilita el contacto de microorganismos con contaminantes hidrofóbicos a través de cambios en la hidrofobicidad de la membrana celular.

Por otra parte, los surfactantes también podrían producir efectos inhibitorios sobre la biodegradación (Li y Chen, 2009; Paria, 2008; Elgh-Dalgren y col., 2011), cuyas causas podrían explicarse por:

- Un efecto tóxico del surfactante sobre los microorganismos nativos.
- Un aumento en la toxicidad del sistema causada por la solubilización y movilización de co-contaminantes.
- Utilización preferencial del surfactante como fuente de carbono y energía.
- Inhibición del contacto entre microorganismos e hidrocarburos por la formación de micelas.

Adicionalmente, Colores y col. (2000) demostraron que la adición de surfactante causa dramáticos cambios en la estructura de la comunidad microbiana presente en un

suelo recientemente contaminado con fenantreno y que estos cambios podrían correlacionarse con la inhibición en la degradación del contaminante.

Los surfactantes iónicos suelen presentar mayor toxicidad que los no-iónicos, ya que la carga negativa de la superficie celular favorece la entrada de moléculas cargadas, principalmente los catiónicos que se encuentran cargados positivamente. En base a resultados empíricos, el orden creciente en que los surfactantes sintéticos han evidenciado toxicidad es: no-iónicos < aniónicos < catiónicos (Li y Chen, 2009).

La toxicidad de un surfactante puede producirse por la interacción tanto con los lípidos como con las proteínas de las membranas celulares, ambos esenciales para las funciones celulares (de la Cueva y col., 2016; Mao y col., 2015). En concentraciones mayores a la CMC pueden formar micelas mixtas junto con lípidos de membrana celular, derivando en necrosis y lisis celular; en concentraciones por debajo de la CMC, los monómeros pueden incorporarse en la doble membrana lipídica perjudicando la función de barrera e incluso pueden llegar al interior celular y desencadenar la apoptosis (Li y Chen, 2009). Sin embargo, el efecto tóxico también depende de la estructura del surfactante, ya que se ha visto que el mismo decrece con el aumento de la hidrofiliidad (Li y Chen, 2009).

Por lo descrito en esta sección, ante el diseño de un proceso de biorremediación estimulado por surfactantes es necesario relacionar la dinámica de la comunidad microbiana con la efectividad de los surfactantes en suelos contaminados con mezclas complejas, y no asumir que la comunidad microbiana del suelo es una variable que permanece constante con el agregado de distintas concentraciones de surfactante. Se ha encontrado que para un mismo cultivo bacteriano, diferentes surfactantes pueden generar efectos diferentes, y por otro lado, un mismo surfactante puede impactar de distinta manera cuando diferentes microorganismos están involucrados en el proceso (Li y Chen, 2009).

Para una implementación exitosa de SEBR deben evaluarse varios aspectos como la capacidad del suelo de adsorber el surfactante, la capacidad del surfactante de solubilizar/eluir los contaminantes diana, la toxicidad y biodegradabilidad del surfactante; además de otros aspectos como los costos y la escala del predio a ser tratado. Adicionalmente, un surfactante aplicable debería tener una baja CMC y poder

ser eficiente aplicado en bajas dosis de manera de disminuir los costos del tratamiento (Mao y col., 2015).

Si bien en estas estrategias se busca el aumento de la biodisponibilidad de los hidrocarburos, se llega a una situación de compromiso donde es necesario encontrar el balance adecuado de forma de estimular la biorremediación limitando los efectos tóxicos sobre la comunidad microbiana nativa (Ortega Calvo y col., 2013).

I.2.1.1. Biosurfactantes

Los biosurfactantes (BioS) son surfactantes naturales sintetizados como productos extracelulares o como parte de las membranas celulares de bacterias, levaduras, hongos o plantas a partir de diferentes sustratos, incluyendo azúcares, aceites, alcanos, entre otros (de França y col., 2015). Se pueden clasificar en cinco clases en base a su estructura química natural y a su origen microbiano: (1) glicolípidos, (2) fosfolípidos y ácidos grasos, (3) lipopéptidos o lipoproteínas, (4) surfactantes poliméricos y (5) surfactantes particulados (Chen y col., 2015). Los glicolípidos, como los lípidos de trealosa y ramnolípidos, o lipopéptidos, como la surfactina, forman parte de los BioS de bajo peso molecular; los de alto peso molecular, incluyen polisacáridos anfipáticos, proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas o mezclas complejas de estos biopolímeros.

Las partes hidrofílicas de los BioS pueden ser polisacáridos, fosfatos, aminoácidos, carbohidratos, estructuras polihidroxi o péptidos cíclicos; las partes hidrofóbicas son usualmente cadenas hidrocarbonadas alifáticas (Mao y col., 2015).

Los BioS son prometedores substitutos de los surfactantes sintéticos por sus cualidades únicas como su mayor capacidad de ser biodegradados, menor toxicidad, compatibilidad ecológica, mayor actividad tensioactiva, menor CMC, resistencia a mayores rangos de pH, salinidad y temperatura (Mulligan y col., 2011; Joy y col., 2017). La mayor desventaja de su aplicación es el alto costo de producción y recuperación relativo, así como la complejidad de su producción masiva (Li y Chen, 2009). Sin embargo, se ha investigado y probado la posibilidad de la síntesis de BioS a partir de

materias primas renovables con el fin de aspirar a una producción costo-efectiva (Abdel-Mawgoud y col., 2008; Chen y col., 2015; de França y col., 2015; Zhi y col., 2017).

Los BioS presentan mecanismos comparables a los de los surfactantes sintéticos, como la estimulación en la desorción de hidrocarburos a partir de la disminución en la tensión interfacial o la solubilización micelar; asimismo, se han señalado algunas particularidades de estos surfactantes naturales. Se ha demostrado, por ejemplo, la capacidad de formar agregados por debajo de la CMC que, al igual que las micelas, favorecerían la solubilización aparente de los hidrocarburos y su biodegradación a partir de la formación de hemimicelas sobre la membrana celular (Zeng y col., 2018). Asimismo, estos tensioactivos naturales pueden provocar cambios favorables en las membranas de microorganismos capaces de degradar los hidrocarburos que les permiten aumentar la interacción entre las células y los contaminantes, factor relevante en la eficiencia de la biodegradación (Al-Tahhan y col., 2000; Hua y col., 2003; Mulligan, 2005; Bouchez-Naitali y Vandecasteele., 2008; Bezza y Chirwa, 2017).

Si bien gran parte de los biosurfactantes puede formar agregados micelares, los BioS poliméricos, con grupos hidrofóbicos distribuidos por toda la molécula (como ocurre en el caso de emulsificantes de *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1), suelen formar estructuras multimoleculares en solución acuosa saturada (Makkar y Rockne, 2003). Por lo que podrían aumentar la solubilidad de PAH de sorción lenta por mecanismos diferentes a la solubilización micelar (Bamforth y Singleton, 2005). Adicionalmente, los BioS de alto peso molecular suelen ser efectivos emulsificantes, incrementando el área de la fase hidrocarbonada y, en consecuencia, la tasa de biodegradación (Bouchez-Naitali y Vandecasteele, 2008; Rosenberg y Ron, 1999).

Los BioS lipopeptídicos se encuentran entre los más populares y eficientes en cuanto a su capacidad tensioactiva. Son generalmente sintetizados por cepas pertenecientes al género *Bacillus* y forman parte del grupo de antibióticos antibacterianos y antifúngicos de dichas cepas (Mnif y col., 2014). Los BioS lipopeptídicos más conocidos se dividen en tres grupos: surfactinas, iturinas y fengicinas; cada grupo consiste en isoformas y series de homólogos que presentan algunas diferencias en sus propiedades fisicoquímicas. Dichas diferencias son debidas principalmente a variaciones en la longitud (C12-C16) y ramificación de la cadena de

ácido graso hidroxilada así como a reemplazos de los aminoácidos del anillo peptídico. Las variaciones en su estructura estarían genéticamente determinadas dependiendo de la cepa, o incluso de las condiciones operacionales durante la producción del BioS (de França y col., 2015).

La surfactina (Figura I.4) es uno de los BioS más efectivos conocidos a la fecha que pertenece a la familia de lipopéptidos secretados por cepas de *Bacillus subtilis*, naturalmente encontradas en suelo. Estas bacterias suelen producir el BioS en un rango de temperaturas entre 25 – 37 °C (Chen y col., 2015). La estructura química de la surfactina tiene un bucle peptídico común de siete aminoácidos (L-asparagina, L-leucina, ácido glutámico, L-leucina, L-valina y dos D-leucinas) con una larga cadena de ácido graso hidrofóbica. Es un excelente tensioactivo, pudiendo disminuir la tensión superficial del agua desde 72 a 27 mN/m a bajas concentraciones, por lo que ha ido adquiriendo intereses en aplicación industrial (Abdel-Mawgoud y col., 2008; de França y col., 2015). Adicionalmente posee bajos valores de CMC en solución acuosa, alrededor de 23 mg/L, principal requisito dentro de la efectividad de surfactantes (Souza y col., 2014; Chen y col., 2015).

Se han registrado varios antecedentes sobre la efectividad de surfactina en la remoción de hidrocarburos y la consecuente estimulación en su biodegradación (Whang y col., 2008; Lai y col., 2009; de França y col., 2015; Mnif y col., 2017). De França y col. (2015) estudiaron la capacidad de remoción de hidrocarburos en muestras de arena contaminada a través de distintos tratamientos en cultivos batch: surfactina purificada, sobrenadante de un cultivo de *Bacillus subtilis* sin células y surfactantes sintéticos (Triton X-100 y SDS). En primer lugar, notaron porcentajes similares de remoción entre el biosurfactante purificado y el sobrenadante del cultivo conteniendo este mismo, que a su vez se diferenciaron del control sin surfactante. Esto indicaría que la eficiencia no depende de la pureza del BioS. Por otro lado, los surfactantes sintéticos mostraron porcentajes levemente menores de remoción de hidrocarburos, demostrando la efectividad del bioproducto. En mayor escala, Whang y col. (2008) registraron que tanto la aplicación de un ramnolípido como surfactina en biopilas de suelo contaminado con diesel, en contraste con el control sin BioS, aumentaron significativamente la degradación de los hidrocarburos totales presentes. Poco se conoce sobre el efecto de

la surfactina producida *in situ*, estrategia que permitiría reducir aún más los costos de potenciales tratamientos con BioS sobre suelos contaminados.

I.2.2. Estrategia de bioaumentación con bacterias degradadoras de PAH y productoras de biosurfactantes

La aplicación de microorganismos degradadores de hidrocarburos en simultáneo con productores de biosurfactantes brindaría una doble ventaja, donde los biosurfactantes podrían aumentar la biodisponibilidad de los sustratos hidrofóbicos y modificar la hidrofobicidad de la membrana celular, lo que permitiría a las bacterias degradadoras interactuar libremente con el contaminante (Megharaj y col., 2011; Lim y col., 2016).

Varios investigadores han implementado la estrategia de biorremediación mediante el bioaumentación con cepas del género *Pseudomonas* degradadoras de hidrocarburos en conjunto con cepas productoras de BioS del mismo género (Providenti y col., 1995; Dean y col., 2001; Kumar y col., 2006). Providenti y col. (1995), estudiaron el efecto de la inoculación de las dos cepas especializadas tanto en sistemas batch de suelo prístino contaminado artificialmente con fenantreno como en sistemas de suelo crónicamente contaminado con creosota. En el primer suelo, se observó menor o nula degradación con respecto al control. En el suelo contaminado con creosota, la co-inoculación con ambas cepas presentó el mayor porcentaje de mineralización de fenantreno. Dean y col. (2001) trabajaron sobre un suelo estéril contaminado artificialmente con fenantreno y evaluaron el efecto de la co-inoculación de una cepa productora de BioS con dos cepas distintas degradadoras de hidrocarburos. Se registraron mejoras en la mineralización de fenantreno con una de las cepas degradadoras, mientras que con la segunda cepa no se observaron cambios con respecto al control. Esto sugeriría que el comensalismo entre la producción de BioS y la degradación de hidrocarburos podría ser dependiente de la especie.

Por otra parte, Mnif y col. (2017) trabajaron con una cepa *Bacillus subtilis* productora de BioS y un consorcio degradador de hidrocarburos. Observaron que la co-

inoculación de la cepa y el consorcio sobre sistemas batch de suelo contaminado artificialmente con diésel logró estimular la degradación de los hidrocarburos, sin mostrar diferencias significativas con un tratamiento en paralelo inoculado con el consorcio y tratado con el BioS purificado.

La estrategia de bioaumentación, donde se inoculan poblaciones altamente concentradas y especializadas (cepas puras o consorcios microbianos) en el suelo contaminado, conlleva desafíos a la hora de su aplicación, incluyendo: la identificación y cultivo de las cepas más apropiadas; la cosecha de sus células o extractos enzimáticos; la liberación de estos productos al medio ambiente; y la posterior manipulación del entorno para promover la supervivencia, el crecimiento y la expresión de las actividades deseadas (Burns y col., 2013).

Desde una perspectiva ecológica el bioaumentación resulta una aplicación práctica del fenómeno de invasión (Festa, 2016). Según Mallon y col. (2015b) la invasión de un microorganismo a una comunidad consiste en un proceso de tres etapas: introducción, establecimiento, crecimiento y propagación e impacto. En el caso del bioaumentación, la introducción ocurriría durante la inoculación de los microorganismos especializados utilizados en el tratamiento. Los factores abióticos como el pH, temperatura y salinidad, representan la primera barrera que deben superar los invasores. Su habilidad de resistir a las condiciones del nuevo ambiente seguido de la supervivencia ante las barreras bióticas de los microorganismos nativos, significa la transición hacia la segunda etapa: el establecimiento, donde los invasores se mantienen viables. A continuación, dependiendo el grado en que el microorganismo pueda tener acceso a los recursos locales, llegará a la etapa de crecimiento y propagación. La utilización de los recursos por el invasor alterará la red compleja de especies que interactúan entre sí en las comunidades microbianas. El impacto generado puede ser neutro, beneficioso o perjudicial. Cabe destacar que suele pasarse por alto la posibilidad de observarse un impacto en invasiones que han fracasado debido a que durante la etapa del establecimiento puede ocurrir, en baja medida, cierto crecimiento (Mallon y col., 2015b).

Dentro de la resistencia biológica a la que se enfrenta el invasor durante la etapa del establecimiento, Mallon y col. (2015b), a partir de fundamentos empíricos,

expusieron que la diversidad biológica está inversamente relacionada con el éxito de la invasión. Experimentos donde se estudió el efecto de amplios gradientes de diversidad, logrados mediante el método de dilución-extinción, y otros donde se utilizaron comunidades modelo, permitieron comprobar que la riqueza y equitatividad de especies son factores que contribuyen a la resistencia ante la invasión de comunidades microbianas nativas. Se ha llamado a este fenómeno, el efecto de diversidad-invasión (Mallon y col, 2015b). En comunidades con mayor riqueza de especie y mayor equitatividad, habrá mayor diversidad de capacidades de utilización de recursos, por lo que tendrían mayor resistencia a la invasión, principalmente al bloquear el acceso a los recursos disponibles (Figura I.6, recuadros A a C). En este contexto, un alto suministro de recursos debería, al menos temporalmente, desacoplar la relación entre diversidad e invasión debido a un cambio en la disponibilidad de recursos de baja a alta, lo que se espera que genere una distensión en la competencia (Figura I.6, recuadros D). El invasor estará entonces en ventaja, podrá crecer y lograr una invasión exitosa incluso ante comunidades altamente diversas (Mallon y col., 2015a).

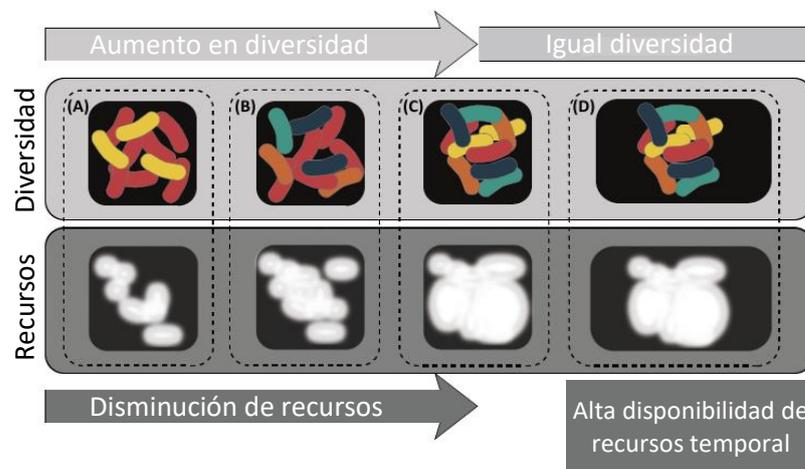
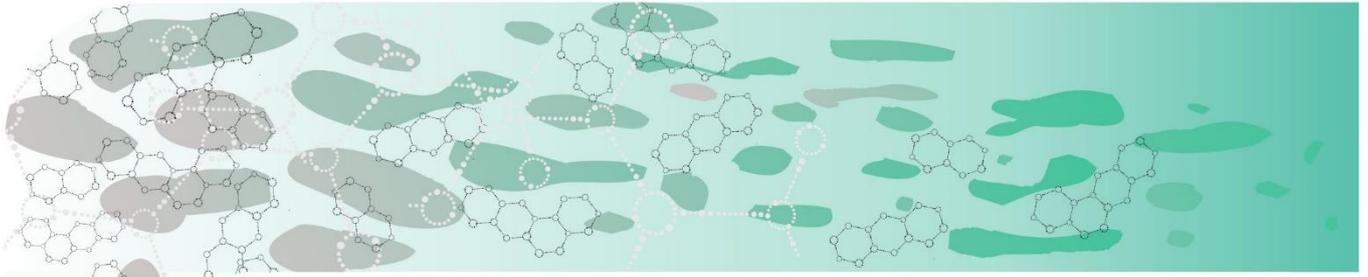


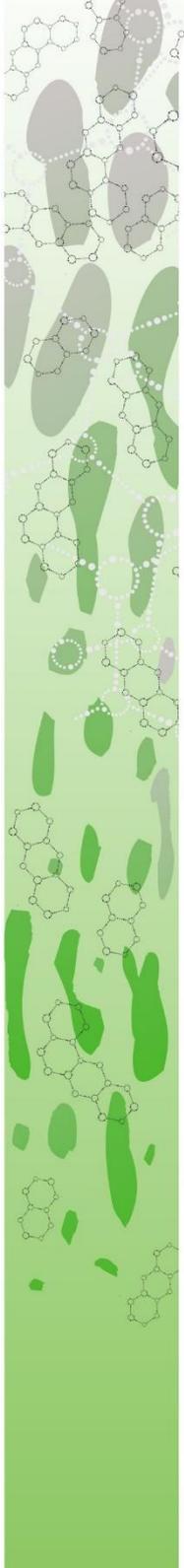
Figura I.6. Proceso de interacción entre la diversidad y la disponibilidad de recursos involucrado en la resistencia a la invasión. La serie de figuras superiores sobre fondo gris claro muestra comunidades con riqueza de especies y equitatividad creciente (hasta el recuadro (C)), con abundancia celular similar. Las figuras inferiores sobre fondo gris oscuro indican la cantidad de recursos totales disponibles para la comunidad (representada en negro) y la proporción que está siendo consumida (en blanco). Esta imagen fue adaptada de Mallon y col. (2015b).

Es así que en los intentos de contribuir al mejoramiento de los conocimientos básicos que permitan evaluar y mejorar las tecnologías de biorremediación, tanto de las estrategias SEBR como del bioaumentación, no sólo debe tenerse en cuenta el análisis del grado de degradación de los hidrocarburos alcanzado en el tratamiento, sino que es fundamental el estudio de los cambios producidos en las comunidades microbianas del sistema y su relación con la efectividad del proceso.



Capítulo II

Objetivos e Hipótesis



II. Objetivos e Hipótesis

La biorremediación es el proceso que aprovecha e incentiva los procesos de biodegradación naturales para transformar y degradar contaminantes orgánicos. Hoy en día, ha demostrado ser una tecnología costo-competitiva con respecto a otras opciones que existen en el marco de la remediación de suelos como lo son la extracción química, incineración y desorción térmica. Hasta la actualidad, sin embargo, han aparecido diversas limitaciones al momento de la aplicación de las distintas estrategias. En este contexto, se plantean como objetivos generales:

- Contribuir al mejoramiento de los conocimientos básicos que permitan evaluar y mejorar las tecnologías de biorremediación.
- Caracterizar la diversidad genética de la comunidad microbiana de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) y su respuesta a los cambios en la biodisponibilidad de los mismos.

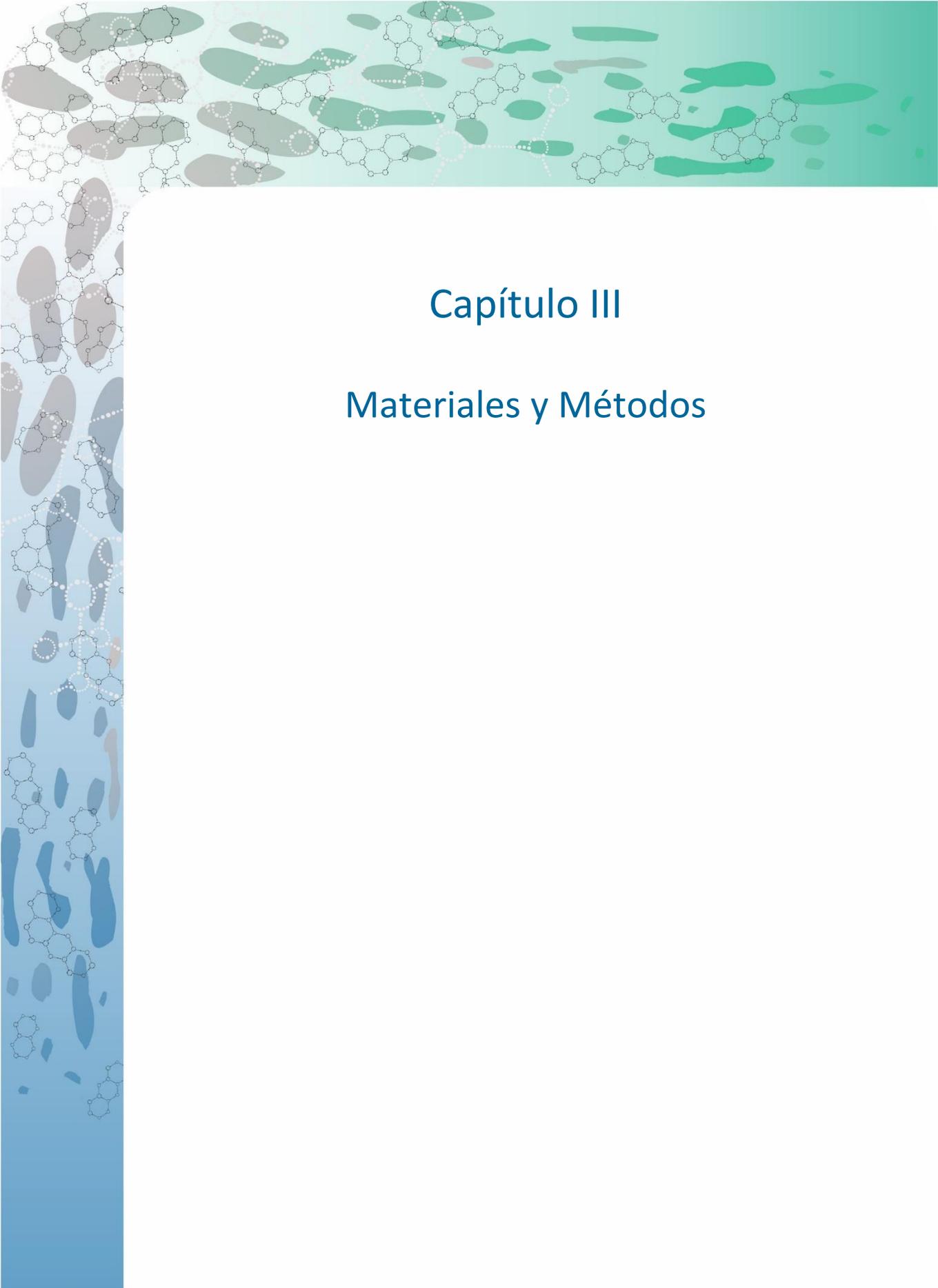
Y como objetivos específicos:

- Estudiar el efecto del agregado de un surfactante sintético y la inoculación de una cepa productora de biosurfactante sobre la cinética de degradación y desorción de los PAH.
- Relacionar la efectividad de los tratamientos con los cambios producidos por los mismos sobre la diversidad genética (secuenciación masiva de genes 16S rARN de muestras de ADN total de suelo) de los suelos contaminados.

Las hipótesis propuestas en el presente trabajo de tesis son:

- La biodisponibilidad de los PAH es el principal factor que limita la degradación de los mismos en suelos crónicamente contaminados con mezclas complejas de hidrocarburos.
- La aplicación de surfactantes podría mejorar la efectividad de los procesos de biorremediación de suelos crónicamente contaminados con PAH.

- La adición de surfactantes produciría cambios en la estructura y dinámica de la comunidad bacteriana del suelo.
- La aplicación de microorganismos degradadores de hidrocarburos en simultáneo con productores de biosurfactantes brindaría una doble ventaja en la mejora de la efectividad de los procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.



Capítulo III

Materiales y Métodos

III. Materiales y Métodos

III.1. Materiales

III.1.1. Medios de cultivo

Para cada medio de cultivo se indica la composición en g/L de agua destilada. En cada caso se ajustó el pH hasta el valor correspondiente con solución de NaOH o HCl 10%. Se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Caldo R2 y ágar R2 (R2A) (Reasoner y Geldreich, 1985)

0,5 g Extracto de levadura

0,5 g Proteosa peptona

0,5 g Hidrolizado de caseína, ácido

0,5 g Glucosa

0,5 g Almidón

0,3 g Acido pirúvico, sal sódica

0,3 g K₂HPO₄

0,05 g MgSO₄·7H₂O

El pH se ajustó a 7,2. Para obtener R2A se agrega ágar agar en una proporción de 15 g/L al caldo de cultivo.

Caldo R3 y ágar R3 (R3A) (Reasoner y Geldreich, 1985)

1 g Extracto de levadura

1 g Proteosa peptona

1 g Ácidocasamino

1 g Glucosa

1 g Almidón

0,5 g Acido Pirúvico

0,6 g K₂HPO₄

0,1 g MgSO₄·7H₂O

El pH se ajustó a 7,2. Para obtener R3A se agrega ágar agar en una proporción de 15 g/L al caldo de cultivo.

Caldo Luria Bertani (LB) y ágar LB

10 g Triptona

5 g Extracto de levadura

5 g NaCl

El pH se ajusta a 7,2. Para obtener ágar LB se agrega ágar agar en una proporción de 15 g/L al caldo de cultivo.

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

5 g NaCl

1 g K₂HPO₄

1 g (NH₄)H₂PO₄

1 g (NH₄)₂SO₄

0,2 g MgSO₄

3 g KNO₃

El pH se ajustó a 7,2.

III.1.2. Buffers y soluciones

Solución fisiológica

NaCl 0,85 % (p/v) en agua destilada.

Solución CaCl₂ y NaN₃ para la determinación de la fracción biodisponible de hidrocarburos

CaCl₂ 0,1 M y NaN₃ 0,1 M.

Solución mix de hidrocarburos policíclicos aromáticos

Se indica la composición de la solución en g/L de pentano (97%, Cicarelli) de una solución con mezcla de cuatro hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH). Se conservó refrigerada.

0,5 g Antraceno (99%, Carlo Erba)

0,5 g Dibenzotiofeno (98%, Aldrich Chemical Company)

1 g Fenantreno (99,5%, Carlo Erba)

0,5 g Fluoreno (99,5%, Carlo Erba)

Buffer TAE

Se indica la composición del buffer 40X en g/L de agua destilada.

193,6 g TRIS (Cicarelli)

45,7 ml Ácido acético glacial (Anedra)

14,9 g EDTA (Anedra)

El pH se ajusta a 7,4. Para preparar buffer TAE 1X, 25 ml de buffer 40X se llevan a 1 L con agua destilada.

Solución de agarosa 1,2%

Se prepara una solución de agarosa (GE Healthcare) 1,2% p/v en buffer TAE 1X.

Soluciones para Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

Las soluciones se muestran en la tabla III.1.

Tabla III.1. Soluciones para la preparación del gel desnaturizante urea-formamida. Se indica la composición en 1 L de agua destilada.

Componentes	Solución 0%	Solución 80%
Acrilamida/bisacrilamida 30%, 29:1 (BIO-RAD)	20 ml	20 ml
TAE 1X pH 7,4	25 ml	25 ml
Urea (Cicarelli)	-	338 g
Formamida (Appli Chem Panreac)	-	320 ml

III.1.3. Otros reactivos

Triton[®] X-100 (ultrapuro, USB Corporation, USA): surfactante no iónico formado por una mezcla de compuestos p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenoxipolietilenglicoles que en promedio tienen 9,5 subunidades de etilenglicoles, con un peso molecular promedio de 625 g/mol (Figura III.1).

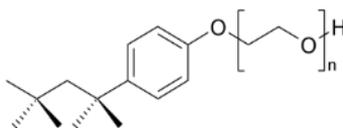


Figura III.1. Estructura de Triton X-100.

Nitrofoska[®] (NPK): fertilizante compuesto granulado que contiene 12% de nitrógeno, 5% de fósforo, 14% de potasio, 3,6% de calcio, 1,2% de magnesio y 6% de azufre.

III.1.4. Muestras de suelo crónicamente contaminado

Se trabajó sobre dos suelos crónicamente contaminados denominados:

- IPK: suelo proveniente de una zona perteneciente a una planta petroquímica aledaña a la ciudad de Ensenada. Este suelo fue utilizado en un tratamiento de Landfarming de un barro petroquímico, el cual se llevó a cabo durante dos años con recargas sucesivas. Más de 10 años después de finalizado el tratamiento, se tomaron las muestras que se estudiaron en el presente trabajo.
- MTC: suelo crónicamente contaminado proveniente de reservorios de la actividad petrolera de Mendoza. En el laboratorio fue artificialmente contaminado con cuatro PAH: fluoreno, fenantreno, antraceno y pireno (95%, Avocado Research Chemicals Ltd) disueltos en acetona (PA, Dorwil), procedimiento que se repitió dos veces en un período de tres meses alcanzándose concentraciones finales de 375 mg/kg, 1.196 mg/kg, 395 mg/kg y 432 mg/kg de suelo seco respectivamente. Pasados tres meses luego de la última intervención, se tomaron las muestras que se estudiaron en el presente trabajo.

La caracterización de ambos suelos se muestra a continuación en la Tabla III.2.

Tabla III.2. Caracterización de los suelos estudiados.

Determinaciones	IPK	MTC
C.I.C. (cmol _c /kg) ^{(a)*}	27,9	10,66
Carbono orgánico (C, %) ^(b)	2,20	3,63
Materia orgánica (MO, %) ^(c)	3,78	6,26
Nitrógeno total (N, %) ^(d)	0,2	0,21
Fósforo (P, mg/kg) ^(e)	8,33	52
C/N	11	17,3
Textura ^(f)	Franco	Franco-arenoso
Arena (%) ^(f)	44,4	77,8
Limo (%) ^(f)	40,0	6,0
Arcilla (%) ^(f)	15,6	16,2
pH ^(g)	7,7	7,7
Conductividad eléctrica (mS/cm) ^(g)	0,63	4,03
Capacidad de retención de agua (%) ^(h)	27,5	7,3
Hidrocarburos alifáticos identificados (mg/kg) ⁽ⁱ⁾	224,5	118,5
PAH identificados (mg/kg) ⁽ⁱ⁾	573,6	2.136,4

*Las determinaciones (a) a (f) fueron realizadas en el Laboratorio de Edafología de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata.

^(a)Capacidad de intercambio catiónico; método con acetato de amonio N pH 7, evaluación por destilación.

^(b)Método de Walkey-Black modificado.

^(c)MO (%) = 1,72 x C (%)

^(d)Digestión húmeda, evaluación por método Microkjeldahl.

^(e)Método BrayKurtz N° 1.

^(f)Densimetría, método Bouyucus.

^(g)Método de Sección III.2.1.

^(h)Método de Sección III.2.2.

⁽ⁱ⁾CG – FID, sección III.2.7.3

III.1.5. Cepas bacterianas

Bacillus subtilis NCIB 3610: cepa de *Bacillus subtilis* proporcionada por el Dr Roberto Grau, investigador de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario (UNR), Santa Fé, Argentina. Tiene la capacidad de producir el surfactante surfactina, de naturaleza lipopeptídica, que interviene en la formación biofilms y en su movilización sobre superficies (Kearns y col., 2003; McLoon y col., 2011). Son bacilos Gram positivos que en medio R3A desarrollan colonias blancas grandes de aspecto mucoso. En el presente trabajo se la nombrará como B *srf*⁺.

Bacillus subtilis NCIB 3610 *srf*⁻: cepa mutante de *Bacillus subtilis* NCIB 3610 (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR) también proporcionada por el Dr Roberto Grau. Esta cepa tiene una delección en el primer gen del operón que codifica para surfactina, con una inserción de un gen de resistencia a cloranfenicol, por lo que no produce el biosurfactante y es resistente a dicho antibiótico (5 µg/ml). En el presente trabajo se la nombrará como B *srf*⁻.

Sphingobium sp. AM: cepa aislada de un consorcio bacteriano degradador de fenantreno aislado de un suelo crónicamente contaminado proveniente de una zona aledaña a la ciudad de La Plata (Festa y col., 2013). Son bacilos Gram negativos cuyo desarrollo en medio R3A genera colonias pequeñas, amarillas y de contorno definido. Esta cepa posee la capacidad de degradar fluoreno, fenantreno y antraceno *in vitro*. Adicionalmente, se ha visto que su inoculación en un suelo prístino contaminado artificialmente con fenantreno produjo un efecto estimulador sobre la eliminación del mismo (Festa y col., 2016).

III.2. Métodos

III.2.1. Determinación de pH y conductividad eléctrica en suelo

Para la determinación de estas medidas se mezclaron 5 g de suelo con 5 ml de agua bidestilada y se agitaron durante 1 h a 240 rpm (Mora y col., 2014). Luego de reposar durante 10 minutos, se realizaron las lecturas con los electrodos correspondientes. Para la medida de pH se utilizó el electrodo de vidrio A1131B (Adwa AD8000), que fue calibrado previamente con los buffers comerciales Adwa de pH 4, 7 y 10. Para la medida de conductividad eléctrica (CE) se utilizó el electrodo A76309 (Adwa AD8000), que fue calibrado con la solución comercial de 1.413 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

III.2.2. Determinación de la capacidad de retención de agua

En primer lugar se secó el suelo a ensayar hasta peso constante en estufa de 105 °C y se pesaron 100 g. Se armó un sistema formado por una columna plástica con uno de sus extremos tapado con gasa (asegurada con una bandita elástica) y se registró su peso. Los 100 g de suelo seco se colocaron en el interior de la columna y se volvió a pesar el sistema. Se agregó agua sobre el suelo hasta observar que se acumulaba en la superficie y se dejó escurrir por 24 hs. Al cabo de ese tiempo, se registró el peso del sistema y por diferencia se determinó la capacidad de retención de agua (en inglés, *Water holding capacity, WHC*) como g de agua retenidos por 100 g de suelo seco, en porcentaje.

III.2.3. Determinación de la concentración micelar crítica de un surfactante en la fase acuosa de un suelo

La determinación de la concentración micelar crítica (CMC) de un surfactante en la fase acuosa de los suelos se llevó a cabo mediante la medida de la tensión superficial (TS) de suspensiones acuosas del suelo para diferentes concentraciones del surfactante. Las medidas de TS fueron realizadas con la colaboración de la Dra Marisa Viera. El

protocolo seguido se basó en el utilizado por Bueno-Montes y col. (2011). En erlenmeyers de 250 ml de capacidad, se armaron sistemas por triplicado con 2,8 g de suelo húmedo y 70 ml de solución acuosa del surfactante en concentraciones crecientes. Se incubaron por 24 hs en agitación, a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 4.000 rpm por 10 minutos en falcon de 50 ml y se determinó la tensión superficial de los sobrenadantes obtenidos utilizando el tensiómetro de anillo de Du Nouy (F.B.R., Argentina). Los resultados obtenidos de tensión superficial se graficaron en función del logaritmo en base 10 de la concentración conocida del surfactante. La CMC en la fase acuosa del suelo corresponde al punto de inflexión de la curva (cambio de pendiente).

III.2.4. Caracterización de cepas utilizadas en el bioaumentación

Este ensayo se realizó en frascos de vidrio estériles de 120 ml de capacidad. Se preparó una solución de fenantreno en acetona de 10 mg/ml. Sobre cada frasco se adicionó 1 ml de dicha solución y se dejó evaporar el solvente bajo campana.

En triplicados, se agregaron 50 ml de MML estéril en las siguientes condiciones:

- Sin agregado de peptona.
- Con 0,3% p/v de peptona.
- Con 0,5% p/v de peptona.

Cada sistema contuvo de esta manera, 200 mg/L de fenantreno.

Finalmente, por triplicado, los sistemas fueron inoculados de la siguiente manera:

- Inoculación con la cepa *Sphingobium* sp AM en 10^5 UFC/ml.
- Inoculación con la cepa B *srf+* en 10^5 UFC/ml.
- Inoculación con la B *srf-* en 10^5 UFC/ml.
- Inoculación con la cepa AM y B *srf+* en 10^5 UFC/ml cada una.
- Inoculación con la cepa AM y B *srf-* en 10^5 UFC/ml cada una.

Las cepas puras habían sido previamente incubadas en caldo R3 por 24 hs; en el caso de la cepa mutante, el medio de cultivo fue suplementado con 5 µg/ml de

cloranfenicol a modo de presión de selección. Antes de ser inoculadas, se realizaron dos lavados con solución fisiológica.

En paralelo, se realizaron controles por triplicado sin inocular para evaluar la pérdida abiótica del PAH. Los sistemas se incubaron por 7 días en agitación (150 rpm) a 28 °C.

III.2.4.1. Presencia/ausencia de desarrollo de colonias características en R3A

Se realizaron diluciones seriadas 1/10 de los cultivos y las mismas se esparcieron por duplicado en placas de medio R3A (formulación detallada en III.1.1) con una espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron a 24 ± 2 °C y se observaron las colonias, diferenciándolas por sus características macroscópicas.

III.2.4.2. Determinación de tensión superficial

Los cultivos fueron filtrados por membranas de 0,45 µm de poro mediante el sistema kitasato/embudo buchner y sobre el filtrado se midió la TS con un tensiómetro de anillo de Du Nouy.

III.2.4.3. Determinación de fenantreno remanente

Sobre el volumen total del cultivo (50 ml) se realizó la extracción exhaustiva de fenantreno con 10 ml de acetato de etilo (PA, Cicarelli). Los sistemas se agitaron vigorosamente durante 30 min y las fases acuosa y orgánica se separaron en ampolla de decantación. El procedimiento se realizó tres veces y se juntaron los tres extractos, registrando el volumen recuperado. Una alícuota se filtró por membrana de nylon de 0,45 µm de poro y se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa utilizando un cromatógrafo Waters® con una columna Symmetry Waters® C18 (15 cm, 4,6 mmi.d., tamaño de perla 5 mm, tamaño de poro 100 Å) con un gradiente lineal metanol:ácido fosfórico (20:80 hasta los 15 minutos de corrida, 5:95 durante 2 minutos y posteriormente 20:80 hasta llegar a los 19 minutos de corrida) y un

flujo de 1ml/min (Coppotelli y col., 2010). Los espectros de absorción al UV (250,9 nm) se obtuvieron utilizando un detector 2996 fotodiodos (Waters®) y se analizaron con el software Empower.

III.2.5. Armado de microcosmos de suelo IPK

III.2.5.1. Tratamiento con la CMC de Triton X-100

Se prepararon microcosmos consistentes en 60 g de suelo IPK tamizado (malla de 2 mm de poro) contenidos en frascos de vidrio de 250 ml de capacidad. Se llevó a cabo el tratamiento con el surfactante Triton X-100 a la CMC ya determinada en este suelo: 26 mg/g de suelo seco. Dicho surfactante fue agregado en solución acuosa en sistemas por triplicado, llegando a $22 \pm 2\%$ de humedad (60% WHC). En paralelo, se armaron tres controles sin tratamiento, los cuales se llevaron al mismo porcentaje de humedad mediante el agregado de un volumen de agua equivalente al suplementado con el surfactante.

Los microcosmos se incubaron a 24 ± 2 °C, corrigiendo la humedad al $22 \pm 2\%$ cuando fuera necesario, durante 30 días. Los sistemas fueron removidos semanalmente de forma de favorecer su aireación.

III.2.5.2. Tratamiento con la CMC y dosis sub-CMC de Triton X-100

Se armaron microcosmos consistentes en 500 g de suelo IPK tamizado (malla de 2 mm de poro) contenidos en frascos de vidrio de 1 kg de capacidad. Fueron preparados en triplicados en cuatro condiciones diferentes:

- C: sin surfactante, como control de la atenuación natural.
- T-A: con Triton X-100 suplementado en 11 mg/g de suelo seco.
- T-B: con Triton X-100 en 14 mg/g de suelo seco.
- T-CMC: con Triton X-100 a la CMC, 26 mg/g de suelo seco.

El surfactante fue agregado en solución acuosa y el mismo volumen de agua destilada fue adicionado a los microcosmos control para normalizar el contenido de

humedad. Fueron incubados a 24 ± 2 °C por 84 días corrigiendo la humedad al $22 \pm 2\%$ cuando fuera necesario. Los sistemas fueron removidos semanalmente de forma de favorecer su aireación.

III.2.6. Armado de microcosmos de suelo prístino (P)

Se prepararon microcosmos consistentes en 100 g de suelo prístino tamizado (malla de 2 mm de poro) contenidos en frascos de vidrio de 250 ml de capacidad. Fueron armados en simplificado, en tres condiciones:

- P: suelo control.
- PF: contaminado artificialmente con 800 mg/kg de fenantreno.
- PTF: contaminado artificialmente con 800 mg/kg de fenantreno y tratado con 26 mg/g de Triton X-100.

Estos sistemas fueron utilizados para estudiar el impacto del Triton X-100 sobre las matrices de excitación-emisión de fluorescencia (Sección III.2.8.5) y sobre los perfiles de bandas de DGGE (Sección III.2.8.12), como comparación con los efectos estudiados sobre suelos crónicamente contaminados. Fueron incubados a 24 ± 2 °C por 30 días corrigiendo la humedad al $22 \pm 2\%$ cuando fuera necesario.

III.2.7. Armado de microcosmos de suelo MTC

De la misma manera que para el suelo IPK, los microcosmos se armaron en frascos de vidrio de 1 kg de capacidad conteniendo 500 g de suelo.

III.2.7.1. Tratamiento con la CMC de Triton X-100

Al igual que en la Sección III.2.5.1, se preparó una solución acuosa del surfactante y se agregó sobre los microcosmos de forma tal de alcanzar la CMC en la fase acuosa de este suelo: 15 mg/g de suelo seco, logrando además una humedad de $4 \pm 1\%$. Este porcentaje de humedad corresponde al 60% de su WHC.

El tratamiento se llevó a cabo sobre 6 microcosmos, 3 de los cuales fueron inoculados con la cepa *Sphingobium* sp AM como se describe a continuación (Sección III.2.6.2). Los otros 3 sistemas se denominaron m-T.

III.2.7.2. Microcosmos inoculados

Para la preparación de los inóculos, las cepas *Sphingobium* sp AM, *Bacillus subtilis* NCIB3610 y NCIB3610 *srf*⁻ fueron incubadas durante 24 hs en caldo R3, a 28 °C y 150 rpm. Los cultivos fueron centrifugados y lavados con solución fisiológica para luego resuspenderse en agua destilada. La inoculación fue realizada con pipeta distribuyendo la suspensión gota a gota sobre la superficie de la fracción de suelo dispuesta en los frascos. Luego se mezcló con espátula.

Los microcosmos fueron inoculados, por triplicado, de la siguiente manera:

- m-AM: inoculado con 1×10^8 UFC/g de suelo seco de la cepa *Sphingobium* sp. AM.
- m-B *srf*⁺: inoculado con 1×10^8 UFC/g de suelo seco de la cepa *Bacillus subtilis* NCIB 3610.
- m-B *srf*⁻: inoculado con 1×10^8 UFC/g de suelo seco de la cepa *Bacillus subtilis* NCIB 3610 *srf*⁻.
- m-AM+B *srf*⁺: inoculado con $0,5 \times 10^8$ UFC/g de suelo seco de cada una de las cepas *Sphingobium* sp. AM y *Bacillus subtilis* NCIB 3610.
- m-AM+B *srf*⁻: inoculado con $0,5 \times 10^8$ UFC/g de suelo seco de cada una de las cepas *Sphingobium* sp. AM y *Bacillus subtilis* NCIB 3610 *srf*⁻.
- m-AM/T: previamente tratado con la CMC de Triton X-100 e inoculado con 1×10^8 UFC/g de suelo seco de la cepa *Sphingobium* sp. AM.

En paralelo, se dispuso de tres microcosmos sin inóculo ni surfactante como control (m-C), sobre los cuales se agregó un volumen de agua destilada equivalente al agregado en los otros tratamientos para normalizar el contenido de humedad en $4 \pm 1\%$.

Todos los sistemas fueron incubados a 24 ± 2 °C por 6 meses corrigiendo la humedad al $4 \pm 1\%$ cuando fuera necesario. Los sistemas fueron removidos semanalmente de forma de favorecer su aireación.

III.2.7.3. Tratamiento de los microcosmos con fertilizante

Al cabo de 6 meses de incubación, todos los microcosmos fueron tratados con NPK: se añadieron al suelo 12,8 g/kg de suelo seco del fertilizante, llevando la relación C/N/P de 100/6/0,1 a 100/10/2. Volvieron a incubarse por otros 30 días a 24 ± 2 °C corrigiendo la humedad al $4 \pm 1\%$ cuando fuera necesario y removiéndose semanalmente.

III.2.8. Monitoreo de los microcosmos durante el período de incubación

Tanto para los microcosmos con IPK como MTC, se tomaron muestras para los ensayos de seguimiento al 1^{er} día de incubación, cada 7 días durante los primeros 28 días y luego a los días 42, 63 y 84 días. En el caso de MTC, también se tomaron muestras a los 6 meses de incubación y un mes después del agregado de la Nitrofoska®.

III.2.8.1. Determinación del porcentaje de humedad

Aproximadamente 5 g de suelo húmedo se pesaron sobre la base de una placa de Petri y se llevaron a una estufa a 105 ± 5 °C hasta alcanzar peso constante. Luego de dejar enfriar en desecador, se registró el peso de la placa para calcular el porcentaje de humedad por diferencia con el peso del suelo húmedo. Esta medida se expresó como % p/p (%H).

III.2.8.2. Determinación de tensión superficial en suspensiones de suelo

El protocolo utilizado se basó en la determinación de la CMC descrita anteriormente en la Sección III.2.3. Se resuspendieron 2,8 g de suelo en 70 ml de agua destilada en erlenmeyer de 250 ml y se incubaron por 24 hs en agitación, a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 4.000 rpm por 10 minutos en falcon de 50 ml y se determinó la TS de los sobrenadantes obtenidos utilizando el tensiómetro de anillo de Du Nouy.

III.2.8.3. Determinación de la concentración de hidrocarburos

Inicialmente, 5 g de suelo se mezclaron con 5 g de Na₂SO₄ anhidro. Luego se procedió con la extracción de hidrocarburos totales (HC) por mezcla de solventes orgánicos agregando un volumen de 15 ml de diclorometano:acetona 1:1 (v/v) de calidad cromatográfica (Sintorgan) (Mora y col., 2014) y sonicando 1 h (ultrasonicador TestLab, 400W, 40KHz), de acuerdo al método EPA SW-846 3550C. Los sistemas fueron centrifugados a 3.000 rpm por 10 min (Presvac model DCS-16 RV). Este procedimiento se realizó tres veces, recolectando los tres sobrenadantes en un mismo frasco caramelo de aproximadamente 70 ml y se dejó evaporar. El extracto fue resuspendido en 1 ml de diclorometano (o hexano -LiChrosolv®- en las muestras de MTC), sonicado por 5-10 min y filtrado por membrana de nylon de 0,45 µm de poro.

En el caso de las muestras de IPK, se agregaron los estándares internos dibenzotiofeno y hexadecano, corrigiendo variaciones mínimas del volumen de inyección.

A continuación, 2 µl de cada muestra se inyectaron en un cromatógrafo gaseoso Clarus 500 (Perkin Elmer) equipado con una columna PE-5HT (30 m x 0,25 mm x 0,10 µm) y acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID). Se analizaron con el programa de temperatura utilizado por Morelli y col. (2005). Éste consistió en temperaturas del puerto de inyección a 280 °C y del detector a 300 °C que se mantuvieron constantes durante la corrida; temperatura inicial del horno a 50 °C, que se mantuvo por 4 min seguida de un aumento en una primera rampa hasta 150 °C a 4 °C por min, una segunda rampa hasta 280 °C a 10 °C por min y una tercera rampa hasta 300 °C a 15 °C por min; finalmente una extensión de 12 minutos manteniendo la última temperatura alcanzada.

La identificación de cada hidrocarburo se realizó a partir de patrones comerciales de concentración conocida tanto de PAH como de hidrocarburos alifáticos (HAF) (Restek, NJEPH Aromatic Frac. Check Mix y 610 PAH Calibration Mix A). En MTC, la cuantificación de los hidrocarburos se basó en curvas de calibración de los mismos patrones. En IPK, la cuantificación se calculó relativa a las áreas de los estándares internos añadidos sobre las muestras previamente a la inyección.

III.2.8.4. Determinación de la concentración de la fracción sorbida de hidrocarburos policíclicos aromáticos

Esta determinación se realizó mediante una variación del método utilizado por Northcott y col. (2001), basado en la adsorción de hidrocarburos solubles sobre la resina Amberlite XAD-2 (20-60 mesh, Sigma Aldrich). Se pesaron 2 g de XAD-2 y se colocaron en una malla metálica cerrada (260 μm) de forma cilíndrica. Sobre un tubo de vidrio de centrífuga (120 ml de capacidad) se colocaron 3 g de suelo y se agregaron 30 ml de una solución 0,01 M CaCl_2 /0,01 M NaN_3 (CaCl_2 se agregó para prevenir la dispersión de partículas de arcilla del suelo, mientras que NaN_3 actuó como inhibidor de la actividad bacteriana). La malla cilíndrica fue colocada dentro del tubo con la suspensión del suelo, el tubo fue sellado e incubado a temperatura ambiente en agitación (150 rpm) por 7 días (Figura III.2). Al cabo de este tiempo, el cilindro fue retirado y el sistema suelo-fase acuosa fue secado por vacío (Liofilizador L-3, provisto por RIFICOR). Finalmente, sobre el suelo liofilizado, se realizó la extracción exhaustiva de hidrocarburos descrita en el inciso anterior (III.2.7.3) para determinar la fracción sorbida al suelo de dichos contaminantes.

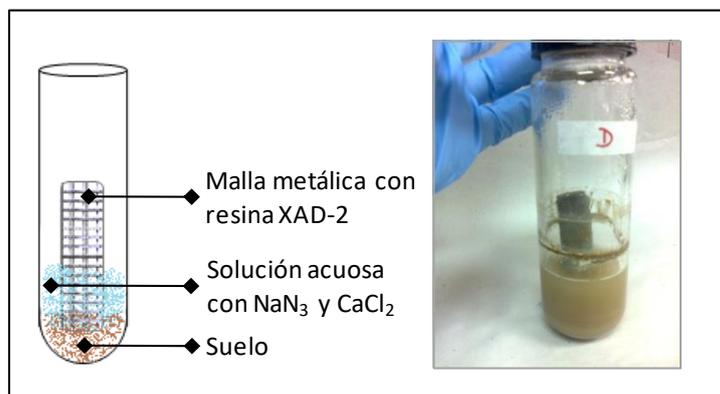


Figura III.2. Esquema y fotografía del sistema utilizado para la determinación de la fracción de PAH sorbida al suelo.

III.2.8.5. Matrices de excitación-emisión de fluorescencia de suelo

Las matrices de excitación-emisión de fluorescencia (MEEF) se determinaron sobre extractos alcalinos de suelo. Para obtener dichos extractos, se mezcló, por

microcosmos, 1 g de suelo de cada triplicado (obteniendo un pool de 3 g en total) con 15 ml de NaOH 0,1 M, agitando por vortex. Luego se ajustó el pH en $10 \pm 0,5$ y se agitó durante 1 h (150 rpm). Una vez transcurrido el tiempo de agitación se verificó que el pH no hubiera variado. En los casos donde se observó cambios en los valores de pH, nuevamente se ajustó en $10 \pm 0,5$ y se repitió el procedimiento. Finalmente se separó el sobrenadante centrifugando durante 10 min a 5.000 rpm, se filtró utilizando en primer lugar papel de filtro Whatman n°41 y luego utilizando membrana de nylon de 0,45 μm . Una vez obtenido el extracto alcalino, se ajustó el pH en 7 y se filtró a través de membrana de nylon de 0,45 μm para realizar los análisis posteriores (David Gara y col., 2011).

Se prosiguió con la determinación del espectro de absorbancia para cada extracto entre 200 y 800 nm, medido en un espectrofotómetro UV-Visible T60 (PG Instruments).

Para medir las MEEF, la absorbancia a 550 nm de los extractos alcalinos se ajustó en 0,05 (Birdwell y Engel, 2010) de forma de normalizar las muestras. Los espectros de fluorescencia se realizaron utilizando un espectrofluorómetro Near-IR Fluorolog-3 Research Spectrofluorometer, midiendo la emisión entre 260 a 650 nm. Las MEEF se generaron a partir de espectros de emisión obtenidos incrementando cada 5 nm la longitud de onda de excitación, desde 240 hasta 580 nm (Bosio y col., 2008). Adicionalmente a las medidas de MEEF sobre extractos de suelo, estas determinaciones se hicieron sobre las siguientes soluciones acuosas:

- Solución saturada (25 °C) de fenantreno, diluida 1/1.000.
- Solución con 0,02 mg/ml de Triton X-100.
- Solución saturada de los 16 PAH prioritarios.

Para obtener mayor información sobre las matrices se realizó un análisis PARAFAC (“Parallel Factor”) que nos permitió estimar el número de fluoróforos presentes y su concentración relativa, así como los espectros de emisión y excitación de éstos. El análisis informático fue realizado por el Dr. Pedro M. David Gara, quien colaboró en la interpretación de los resultados. Se utilizó el programa MATLAB 7.7 (Mathworks, Natick, MA) aplicando PLS_Toolboxversion 4.0 (EigenvectorResearch, Manson, WA). La determinación del número correcto de los componentes en el

conjunto de datos se evaluó mediante la puntuación del “diagnóstico de consistencia de núcleo” (Core Consistency Diagnostic) que debe estar cerca del 100 % si el modelo es adecuado. El número de componentes se validó por inspección visual de los parámetros estimados y el diagnóstico de modelos adicionales. Se usaron varios pasos de pre-procesamiento para minimizar la influencia de las líneas de dispersión, restando a cada muestra la matriz del agua. Además, se asignó valor cero a las emisiones por debajo de la longitud de onda de excitación, ya que esta situación es fisicoquímicamente imposible.

III.2.8.6. Recuento de bacterias heterótrofas cultivables en R2A

Inicialmente, se pesaron 10 g del suelo a ensayar y se resuspendieron en 90 ml de solución fisiológica estéril. Estos sistemas se incubaron en agitación (150 rpm) durante 30 min a temperatura ambiente. Luego de 10 min de reposo, se realizaron diluciones seriadas 1/10 del sobrenadante en solución fisiológica. Una alícuota de 100 μ l de dichas diluciones, por duplicado, se esparció en placas de R2A (formulación detallada en la Sección III.1.1) con ayuda de espátula de Drigalsky y se incubaron a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 días. Al cabo de este tiempo, se contaron las colonias y se calculó el número de unidades formadoras de colonias por g de suelo seco (UFC/g de suelo seco) a partir de la placa que hubiera desarrollado entre 30 y 300 colonias.

III.2.8.7. Recuento de bacterias cultivables degradadoras de PAH

Para el recuento de esta población de bacterias se utilizó la técnica del número más probable (NMP) en placas de 96 pocillos (Wrenn y Venosa, 1996). Como sustrato selectivo de crecimiento, se utilizó la mix de PAH detallada en la Sección III.1.2, conteniendo antraceno, dibenzotiofeno, fenantreno y fluoreno en pentano. Un volumen de 20 μ l de dicha mix se dispuso sobre cada pocillo y se dejó evaporar el solvente. Luego, en cada pocillo se agregaron 180 μ l de MML estéril. La placa fue inoculada agregando 20 μ l de cada dilución por columna de 8 pocillos. Se utilizaron las diluciones seriadas preparadas en el inciso anterior. Las placas se incubaron a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 21 días y al cabo de este tiempo se registraron como pocillos positivos aquellos que presentaron

coloración en tonos naranja, amarillos, ocreos o rosados debida a la presencia de productos de oxidación parcial de los PAH. Se calculó el NMP/g de suelo seco utilizando el programa GW-BASIC 3.22.

III.2.8.8. Recuento de bacterias cultivables degradadoras de hidrocarburos alifáticos

Este recuento también se realizó por la técnica del NMP, pero se llevó a cabo en tubos de ensayo conteniendo 5 ml de MML estéril suplementado con hexadecano (99%, Sigma) como sustrato, aproximadamente 20 μ l por tubo. Las diluciones seriadas se inocularon por quintuplicado, en volúmenes de 100 μ l por tubo. Se incubaron a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 21 días y al cabo de este tiempo se registraron como tubos positivos aquellos que presentaron turbidez. Se calculó el NMP/g de suelo seco utilizando el programa GW-BASIC 3.22.

III.2.8.9. Extracción de ADN total del suelo

El ADN total de las muestras de suelo fue extraído y purificado a partir de 1 g de suelo utilizando el Kit comercial E.Z.N.A TM Soil DNA (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA). El primer paso del kit, correspondiente a la ruptura de células, se repitió 3 veces.

III.2.8.10. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Se analizó el potencial degradador de las comunidades bacterianas de los microcosmos en estudio mediante la cuantificación del gen funcional que codifica para la subunidad alfa de enzimas dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático de bacterias Gram negativas (PAH-RHD α GN), que actúan en los primeros pasos de la degradación aeróbica de PAH.

Adicionalmente, dicha cuantificación se normalizó con el número de copias del gen constitutivo 16S rARN, que al estar presente en todas las bacterias proporciona información sobre la dinámica de la comunidad bacteriana total de los sistemas analizados.

La cuantificación se llevó a cabo en base a curvas de calibración realizadas a partir de diluciones de plásmidos que contenían como inserto el gen target; se graficaron los valores de Ct (ciclo umbral, del inglés *cycle threshold*) en función del logaritmo del número de copias por μl . Por cada reacción de amplificación realizada, se calculó la curva del gen correspondiente.

Los plásmidos fueron clonados y purificados (Lillis y col., 2010) por la Dra. Laura Madueño en el Laboratorio de Biorremediación de Suelos contaminados con Hidrocarburos del CINDEFI, UNLP-CONICET, La Plata, Argentina. Brevemente, productos PCR de los genes a cuantificar se clonaron utilizando el vector pGEM-T Easy vector (3015 pb) y el vector recombinante obtenido se purificó con Qiaprep miniprep kit (Qiagen). Se comprobó la presencia del producto PCR ligado al vector utilizando los mismos cebadores utilizados para generar el producto PCR en el paso inicial. La especificidad y número de bases del producto PCR se evidenció por secuenciación (Macrogen). El vector recombinante se cuantificó con Nanodrop TM (Thermo Scientific) y el número de copias de cada gen por μl se calculó usando el tamaño del plásmido recombinante y un promedio de masa molecular de 650 Da por par de nucleótidos con la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ copias}/\mu\text{l} = \frac{[\text{ng}/\mu\text{l}] \times 6,022 \times 10^{23}}{(\text{longitud del inserto en pb} + 3015) \times 10^9 \times 650}$$

Las reacciones se realizaron en el termociclador qTOWER 2.2™ Analytic Jena (CINDEFI, Argentina). La tabla III.3 muestra los primers seleccionados para cada determinación y su referencia correspondiente. Los primers 16S rARN amplifican fragmentos de 337 pb, y PAH-RHD α GN de 305 pb. Los ensayos de real time PCR se realizaron en un volumen de reacción de 10 μL conteniendo 2X SYBR Green PCR Master Mix™ (Promega), 0,4 μM de cada primer, 0,3 g/L de seroalbúmina bovina (BSA) y 2 μl de ADN molde o agua milliQ (control negativo). Los programas de PCR respectivos a cada gen target se muestran en la tabla III.4.

Tabla III.3. Primers utilizados para la determinación del número de copias de los genes target.

Genes target	Primers (Eurofinsmwg operon)
16S rARN	1055F: 5'-ATGGCTGTCGTCAGCT-3' 1392R: 5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3' Ref: Harms y col., 2003,
Subunidad α de dioxigenasas PAH-RHD de bacterias GN	PAH-RHD α GNF: 5'-GAGATGCATACCACGTKGGTTGGA-3' PAH-RHD α GNR: 5'-AGCTGTTGTTCCGGGAAGAYWGTGCMGTT-3' Ref: Cebron y col., 2008.

Tabla III.4. Programas de PCR utilizados en la cuantificación de los genes 16S rARN y codificantes para la subunidad α de las dioxigenasas PAH-RHD GN. El último ciclo corresponde a la curva de melting, que permite evaluar la pureza de los amplicones.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	5 min	1 ciclo
95 °C	30 seg	} 40 ciclos 16S rARN 50 ciclos PAH-RHD α GN
53 °C 16S rARN/57 °C PAH-RHD α GN	30 seg	
72 °C	30 seg	
72 °C	7 min	1 ciclo
95 °C	1 min	} 1 ciclo (curva de <i>melting</i>)
53 °C/57 °C	30 seg	
95 °C	30 seg	

La pureza de los amplicones se verificó en base a las curvas de melting correspondientes y por la presencia de una única banda del peso molecular esperado en corridas electroforéticas en gel de agarosa al 1,2 % (p/v) revelado con bromuro de etidio (10 mg/ml); los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador UV (National Labnet Company, Modelo TM-26). Se descartó la presencia de inhibidores analizando en paralelo las muestras diluidas y concentradas y obteniendo la misma cuantificación en ambas.

Los resultados se expresaron como n° de copias/g de suelo seco para el gen 16S rARN y como la relación PAH-RHD α GN/16S rARN.

III.2.8.11. Análisis de secuenciación masiva

III.2.8.11.1. Análisis de pirosecuenciación de muestras de IPK

El análisis de secuenciación masiva de las muestras de IPK se realizó por pirosecuenciación del ADN total de suelo correspondiente a los días 1, 14 y 63 de incubación de los cuatro microcosmos (C, T-A, T-B y T-CMC). El proceso se llevó a cabo en el laboratorio de investigación molecular MR DNA (Shallowater, TX), basado en protocolos establecidos y validados (<http://www.mrdnalab.com/>).

Se realizó una amplificación por PCR sobre la muestra de ADN total de suelo para obtener un fragmento de 568 pb del gen 16S rARN conteniendo las regiones V3 y V4. Se utilizaron primers universales para bacterias, modificados con un código de barras. Los primers utilizados fueron 341Fbac (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') (Muyzer y col., 1993) y 909R (5'-CCCCGYCAATTCMTTTRAGT-3') (Tamaki y col., 2011). La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando HotStar Taq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, CA) por duplicado en un volumen de master mix de 20 µl, bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos, seguido de 28 ciclos a 94°C por 30 segundos; 53°C por 40 segundos y 72°C por 1 minuto; una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Posteriormente a la realización de la reacción de PCR, los amplicones obtenidos de las diferentes muestras se mezclaron en concentraciones iguales y luego se purificaron utilizando Agencourt Ampure beads (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA). La muestra se secuenció utilizando los instrumentos y reactivos de Roche 454 FLX titanium siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los datos de secuenciación generados por el procesamiento de alto rendimiento se analizaron utilizando un pipeline desarrollado en el laboratorio de investigación molecular MrDNA. Se eliminaron en primer lugar los códigos de barras y los primers de las secuencias obtenidas. Posteriormente se eliminaron aquellas secuencias cortas <200 pb con bases ambiguas y las secuencias con homopolímeros mayores a 6 pb. Se eliminó el ruido de las secuencias y las quimeras utilizando un software personalizado (Dowd y col., 2008a, 2008b) y el software B2C2 Black Box ChimeraCheck (disponible en

<http://www.researchandtesting.com/B2C2.html>). Se chequeó la alta calidad de las secuencias basándose en el criterio utilizado por RDP versión 9 (Cole y col., 2009).

Los datos de secuenciación se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU) con un 3% de divergencia utilizando uClust versión v1.2.22. Los OTU se clasificaron taxonómicamente utilizando el algoritmo BLASTn.NET (Dowd y col., 2005) contra una base de datos de alta calidad de secuencias del gen 16S rARN derivada de Green Genes (versión 10-2011) (Edgar, 2010). Los resultados se compilaron y se validaron utilizando métodos taxonómicos basados en distancias (Dowd y col., 2008b).

La taxonomía se definió en base a los siguientes porcentajes: >97%, especie; entre 97% y 95%, género sin clasificar; entre 95% y 90%, familia sin clasificar ; entre 90% y 85%, orden sin clasificar; entre 85% y 80%, clase sin clasificar; entre 80% y 77%, filo sin clasificar; <77%, sin clasificar.

Para el análisis estadístico de los datos se calcularon los números de Hill, familia de números descriptos por Mark Hill (Hill, 1973) como un concepto unificado de diversidad que considera tanto el número de especies como los pesos diferentes de las especies en base a su abundancia relativa (Kang y col., 2016). La expresión generalizada de esta serie de números se muestra en la Ecuación III.1 (Chao y col., 2010).

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

Ecuación III.1. Ecuación que representa la familia de los números de Hill, donde S corresponde a las especies presentes, p_i a la abundancia relativa de la especie i y q es llamado el 'orden' de la medida de diversidad.

Los números de Hill se definen por el orden $q \neq 1$ (qD), donde el parámetro " q " determina la sensibilidad de la medida a las abundancias relativas. De esta forma, la determinación del número cuando $q > 1$ es completamente sensible a la abundancia de especies, cuando $0 \leq q < 1$ es muy sensible a las especies raras y cuando q tiende a 1 pondera todas las especies según su frecuencia sin favorecer a las más comunes ni tampoco a las raras (Chiu y col., 2014).

Los estimadores más utilizados corresponden a 0D , 1D y 2D . Cuando $q=0$, las abundancias individuales de las especies no contribuyen y se obtiene la riqueza de especies, que fue estimada a partir del índice de Chao1 corregido (Chao1-bc) como muestra la Ecuación III.2 (Hughes y col., 2001).

$$S_{Chao1} = S_{obs} + \left(\frac{n-1}{n}\right) \times \frac{f_1 \times (f_1 - 1)}{2 \times (f_2 + 1)}$$

Ecuación III.2. Ecuación que define el índice de riqueza de Chao1-bc donde S_{obs} es el número de especies observadas, f_1 es el número de *singletons* (OTU representados por una sola secuencia) y f_2 es el número de *doubletons* (OTU representados por dos secuencias) y n es el número de individuos.

Cuando $q=1$, la ecuación III.1 es indefinida, pero el límite cuando q tiende a 1 equivale a la exponencial de la entropía de Shannon, que pondera las especies proporcionalmente a sus abundancias relativas y tiene en cuenta entonces principalmente a las especies más comunes (Chiu y col., 2014):

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

Ecuación III.3. Ecuación que define la entropía de Shannon, donde S es el número de OTU observadas y p_i es la abundancia relativa de la especie i (Chao y col., 2010).

Cuando $q=2$, la ecuación III.1 deriva en la inversa de Simpson, que indica la probabilidad de que dos individuos tomados al azar pertenezcan a la misma especie, dándole más lugar a las especies más abundantes sin tener en cuenta las especies raras:

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

Ecuación III.4. Ecuación que define la inversa de Simpson, donde S es el número de OTU observadas y p_i es la abundancia relativa de la especie i (Chao y col., 2010).

Las curvas de rarefacción y las medidas de riqueza y diversidad se calcularon utilizando el programa EstimateS (versión 9) (Colwell, 2014). Se calculó además, el índice de Good, que estima el porcentaje total de OTU bacterianos representados en la

muestra, dando información sobre la cobertura del análisis. Cuando su valor se acerca a 1 indica que las secuencias obtenidas representan la mayoría de las secuencias bacterianas presentes en la muestra (Rungrassamee y col., 2013). Como estas determinaciones son influenciadas por la profundidad en la secuenciación, se realizó una normalización a través del re-muestreo y los parámetros descriptos se estimaron para 1.059 secuencias (correspondiente al número de lecturas en la comunidad más superficialmente muestreada) seleccionadas al azar en cada muestra.

Para la comparación de la composición bacteriana de los microcosmos, se llevó a cabo un análisis de correspondencia (AC) (NTSYSpc, versión 2.11W) a partir de los datos de frecuencia de cada orden. Adicionalmente, para el análisis de las comunidades a nivel de género se construyó un doble dendrograma jerárquico con un mapa de intensidad de color utilizando el software estadístico R, versión 3.1.2. (R Core Team 2014) a partir del paquete “Vegan” (Oksanen y col., 2015). El armado de los cluster se basó en la distancia de Bray-Curtis.

III.2.8.11.2. Análisis por Illumina de muestras de MTC

En el caso de los microcosmos MTC se llevó a cabo la secuenciación mediante MiSeq Illumina de los sistemas m-C, m-AM, m-AM+B *srj+* y m-AM/T para los días 1, 28, 85 y 180, y de los sistemas m-C, m-AM y m-AM/T, 28 días después del tratamiento con NPK. El proceso también se llevó a cabo en el laboratorio de investigación molecular MR DNA.

En primer lugar, se procedió a la amplificación por PCR de las regiones V3 y V4 del gen 16S rARN de igual manera que para la pirosecuenciación. Los amplicones obtenidos se mezclaron y purificaron como se describió también en el inciso anterior, para luego utilizarse en la preparación de la biblioteca de ADN según el protocolo de Illumina MiSeq en MR DNA. El procesamiento de datos fue el mismo que se siguió para los datos de pirosecuenciación ya descripto.

En una primera instancia, los datos fueron analizados por MR DNA a través de Qiime, determinándose las curvas de rarefacción y estimadores de riqueza Chao 1 modificado, de diversidad de Shannon y de dominancia de Simpson. A partir de las

ecuaciones descritas en la sección anterior, se calcularon los números de Hill correspondientes. A través del re-muestreo, se normalizaron dichos índices para 22.123 secuencias seleccionadas al azar en cada muestra.

Para el análisis de la composición y estructura de las comunidades de estos microcosmos, al igual que en los de IPK, se realizó el AC a nivel de orden y el doble dendrograma jerárquico a nivel de género utilizando los mismos programas.

III.2.8.12. PCR/DGGE

Este ensayo se realizó para los microcosmos IPK de 60 g de suelo (Sección III.2.5.1) al día inicial del control y a los 30 días de incubación tanto en el control como en el microcosmos con Triton X-100. Adicionalmente, se contrastó la dinámica observada en dicho suelo contaminado con los cambios producidos por el surfactante sobre un suelo prístino.

Se utilizó un set de primers para eubacteria dirigidos a una región conservada del gen 16S rARN, GC-341F (5'CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCGCCCGCCCGCCCTCTACGGGAG GCAGCAG-3') y 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTG AGTTT-3') (Muyzer y col., 1998). La reacción de PCR contenía 1 µl de muestra, 1 U de GoTaq DNA Polimerasa (Promega, Madison, WI), Buffer de reacción 1X recomendado por el fabricante de la enzima, 200 mM de BSA, 0,2 mM de cada dNTP y 5 µM de cada primer en un volumen final de reacción de 30 µl. La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) y el programa consistió en 1 ciclo de 4 minutos a 94°C, 10 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 62°C y 1 minuto a 72°C; 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 57°C y 1 minuto a 72°C; finalmente, una extensión de 10 minutos a 72°C. Los productos de amplificación se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa 1,2 % con TAE como buffer de corrida, a 100 V durante 30 minutos. Posteriormente el gel se tiñó con Bromuro de Etidio (10 mg/ml) y los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador UV (National Labnet Company, Modelo TM-26).

La DGGE se realizó en una cuba DGGE-2000 System (C.B.S Scientific Company) a una temperatura de 60 °C, con buffer TAE 1X como buffer de corrida. Los productos de

PCR purificados fueron directamente sembrados sobre un gel de poliacrilamida 6% p/v con un gradiente lineal de 45%-80% de desnaturalizante (Tabla III.5). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V durante 16 horas. Luego de la electroforesis, el gel se tiñó durante 30 minutos con SybrGold® (1X) (Invitrogen) a fin de evidenciar los resultados obtenidos. El gel fue documentado por GelDoc EQ (Bio-Rad, Hercules, CA) y se digitalizó en una cámara-CCD. Los perfiles de bandas registrados en las imágenes fueron analizados mediante el software GelCompar II (AppliedMaths, Kortrijk, Belgium). A partir del coeficiente de Jaccard se obtuvieron matrices de similitud y se construyó un dendrograma jerárquico (UPGMA) (Sokal y Michener, 1958) para cada gel.

Tabla III.5. Composición de soluciones para preparar el gel desnaturalizante, gradiente 45%-80%.

Componentes	Solución 45%	Solución 80%
Solución 0%	4,8 ml	-
Solución 80 %	6,2 ml	11 ml
Temed, agente polimerizante (J.T. Baker)	17 µl	17 µl
PAS, agente polimerizante (Sigma)	72 µl	72 µl

III.2.9. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las medidas de tensión superficial, concentración de hidrocarburos, recuentos bacterianos en placa y recuentos por el NMP se expresaron como promedios de triplicados con la respectiva desviación estándar. La diferencia significativa entre dichos promedios se evaluó por comparación a través del test de varianza one-way ANOVA y post-hoc test Tukey (HSD) utilizando el paquete de datos estadísticos XLStat-Pro v7.5.2.



Capítulo IV

Efecto del surfactante Triton X-100 sobre la degradación de hidrocarburos y la comunidad bacteriana de un suelo crónicamente contaminado

IV. Efecto del surfactante Triton X-100 sobre la degradación de hidrocarburos y la comunidad bacteriana de un suelo crónicamente contaminado

En suelos contaminados con hidrocarburos, la efectividad de la biodegradación puede verse afectada por diversos factores como lo son las condiciones ambientales que pueden estimular o no el proceso de degradación (pH, temperatura, disponibilidad de oxígeno o nutrientes), la biodisponibilidad y el tipo de hidrocarburo que se encuentre en el suelo y la actividad y estructura de la comunidad microbiana nativa, la cual a su vez puede ser afectada por el mismo proceso de biorremediación (Mnif y col., 2017; Wu y col., 2017). En los suelos crónicamente contaminados, a medida que transcurre el tiempo, los hidrocarburos van sufriendo un proceso de partición entre la materia orgánica del sistema y la fase acuosa o bien pueden quedar atrapados en pequeños poros de las partículas de suelo, disminuyendo así la biodisponibilidad ante los microorganismos nativos que posean la capacidad de degradarlos.

Una estrategia que permite abordar la posible limitación en la biodegradación de hidrocarburos en suelo por la baja biodisponibilidad de estos contaminantes es la bioestimulación mediante la aplicación de surfactantes. El grupo más frecuentemente estudiado es el de los surfactantes no-iónicos, por su menor toxicidad y mayor capacidad de solubilización de hidrocarburos con respecto a los catiónicos y aniónicos (Lamichhane y col., 2017). La aplicación de surfactantes no-iónicos en biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos ha sido ampliamente estudiada (de la Cueva y col., 2016; Lamichhane y col., 2017) y diferentes estrategias han reportado resultados contradictorios dependiendo de las características del suelo, de los contaminantes y del tipo y concentración de surfactante. Algunos estudios arrojaron resultados positivos en cuanto a la estimulación de la biodegradación por efecto de surfactantes (Zhu y Aitken, 2010; Bueno-Montes y col., 2011; Yu y col., 2011; Sun y col., 2012; Adrion y col., 2016; Singleton y col., 2016; Wang y col., 2016), mientras que otros registraron resultados no significativos y/o negativos (Colores y col., 2000; Lladó y col., 2013; Ghosh y Mukherji, 2016; Liu y col., 2016).

El objetivo del presente capítulo fue estudiar el efecto del agregado del surfactante no-iónico Triton X-100 sobre la cinética de degradación y desorción de los PAH y relacionar la efectividad de los tratamientos con los cambios producidos sobre la diversidad genética de la comunidad bacteriana nativa. En el caso del Triton X-100 particularmente, en varios trabajos se han registrado resultados positivos en cuanto a su capacidad de aumentar la solubilidad aparente de los PAH (Volkering y col., 1995) y la consecuente estimulación en su biodegradación por microorganismos especializados en cultivos en medio líquido (Makkar y Rockne, 2003; Bautista y col., 2009; Chang y col., 2010). En este capítulo nos enfrentamos al desafío de su aplicación en microcosmos abordando los efectos tanto en aspectos fisicoquímicos como biológicos del suelo en estudio.

IV.1. Ensayo preliminar en microcosmos de suelo crónicamente contaminado tratado con Triton X-100 en la concentración micelar crítica

Para los ensayos de esta primera sección se utilizó un suelo (IPK) proveniente de un predio de una industria petroquímica de la ciudad de Ensenada, provincia de Buenos Aires. Este suelo había sido utilizado para tratar un barro petroquímico por Landfarming, proceso que se realizó mediante varias aplicaciones por dos años. Después de más de 10 años de terminado el procedimiento anterior, se tomaron muestras. Dichas muestras se colectaron en bolsas de plástico selladas y fueron transportadas al laboratorio. El suelo fue tamizado (malla de 2 mm) y se procedió al armado de los microcosmos dentro de las primeras 48 hs.

IV.1.1. Determinación de la concentración micelar crítica de Triton X-100 en el suelo

Teniendo en cuenta la sorción de las moléculas de surfactante a la matriz del suelo, la concentración necesaria para alcanzar la concentración micelar crítica (CMC) en suspensiones del suelo será mayor con respecto a la hallada en soluciones acuosas. Por esto, se determinó la CMC para Triton X-100 en IPK mediante medidas de tensión superficial (TS) de suspensiones del suelo a distintas concentraciones de Triton X-100. En la figura IV.1 se graficaron los resultados obtenidos. El menor valor de TS alcanzado fue de 32 mN/m, el cual corresponde a la CMC de 1.056 mg/L, equivalente a 26 mg de Triton X-100 por gramo de suelo seco.

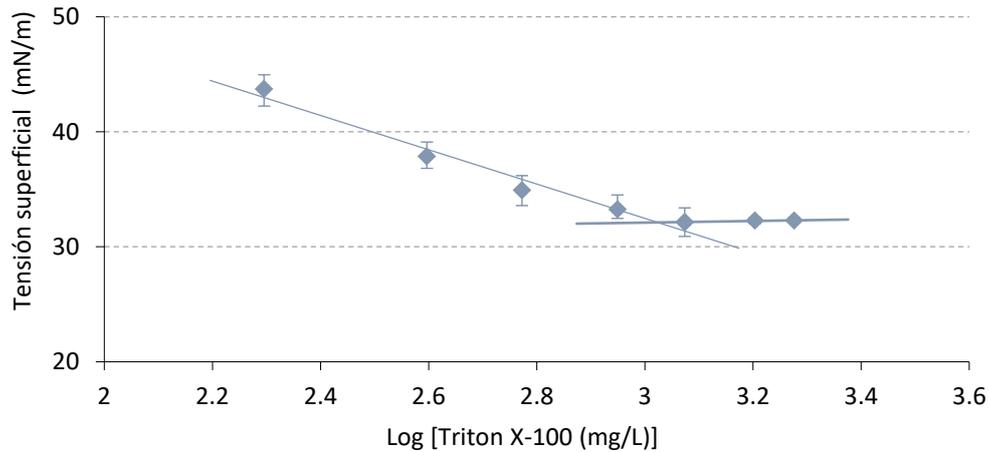


Figura IV.1. Tensión superficial en función del logaritmo de la concentración de surfactante.

IV.1.2. Preparación de microcosmos

Se planteó aplicar el Triton X-100 a la CMC en microcosmos y monitorearlos al inicio y luego de 30 días de incubación para evaluar la eficiencia en la biodegradación de hidrocarburos y el efecto en la comunidad bacteriana de un suelo crónicamente contaminado.

Los microcosmos, de 60 g de suelo, fueron denominados de la siguiente manera:

- Suelo control luego de 30 días de incubación: microcosmos C.
- Tratamiento con 26,6 mg/g de suelo seco de Triton X-100 luego de 30 días de incubación: microcosmos T-CMC.

IV.1.2.1. Efecto del Triton X-100 en la tensión superficial

En la tabla IV.1 se muestran las medidas de TS realizadas en el suelo en estudio al tiempo inicial y luego de los 30 días de incubación en el microcosmos C y T-CMC. Pudo observarse que al término del seguimiento hubo una disminución marcada de la TS

tanto en C como en T-CMC con respecto al valor inicial, siendo significativa la diferencia ($P < 0,05$) entre las medidas de TS de ambos sistemas.

Tabla IV.1. Tensión superficial en el suelo inicial y a los 30 días de incubación en el control y el microcosmos tratado con Triton X-100.

Microcosmos	Tensión superficial (mN/m)
Tiempo inicial	59 ± 7^a
C	34 ± 3^b
T-CMC	27 ± 1^c

Las letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los sistemas.

IV.1.2.2. Degradación de hidrocarburos

En la figura IV.2(a) se muestra la concentración total de la suma de hidrocarburos (HC) identificados en el suelo en estudio por cromatografía gaseosa (CG). Mientras que transcurridos 30 días de incubación el microcosmos C no presentó cambios significativos con respecto a los valores iniciales ($P > 0,05$), el tratamiento con Triton X-100 mostró una disminución en la concentración remanente de los HC, presentando diferencia significativa ($P < 0,05$).

Adicionalmente se graficó el porcentaje de degradación de las fracciones de hidrocarburos diferenciados en policíclicos aromáticos (PAH) y alifáticos (HAf) (Figura IV.2(b)). A simple vista puede observarse que en los microcosmos tratados con el surfactante en su CMC ocurrió una mayor degradación de HAf. Si bien para los PAH el promedio de degradación fue mayor en el tratamiento con Triton X-100, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

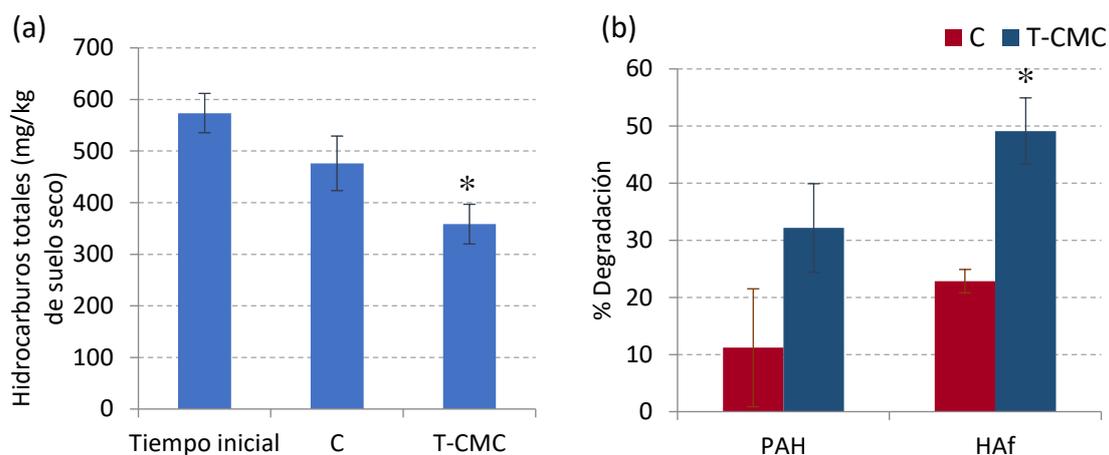


Figura IV.2. (a) Hidrocarburos totales (mg/kg de suelo seco) en el suelo inicial y a los 30 días de incubación en el control y el microcosmos tratado con el surfactante. El asterisco indica diferencia significativa de HC con el tiempo inicial. (b) Porcentaje de degradación de las fracciones de PAH e HAF a los 30 días de incubación en el microcosmos C y T-CMC. El asterisco indica diferencia significativa entre los sistemas para una misma fracción de hidrocarburos. En ambas figuras, se muestran promedios de triplicados con sus respectivas desviaciones estándar (barras).

En la figura IV.3 se graficaron las concentraciones remanentes de los diferentes PAH identificados, expresadas en mg/kg de suelo seco. Se pudo ver que en la mayoría de dichos compuestos hubo diferencias significativas ($P < 0,05$) en los microcosmos con surfactante con respecto a los valores iniciales, presentándose en T-CMC menores concentraciones. Esta tendencia se notó con más frecuencia en los PAH de mayor peso molecular. Estos últimos poseen 4 o más anillos aromáticos y son en consecuencia los más difíciles de biodegradar.

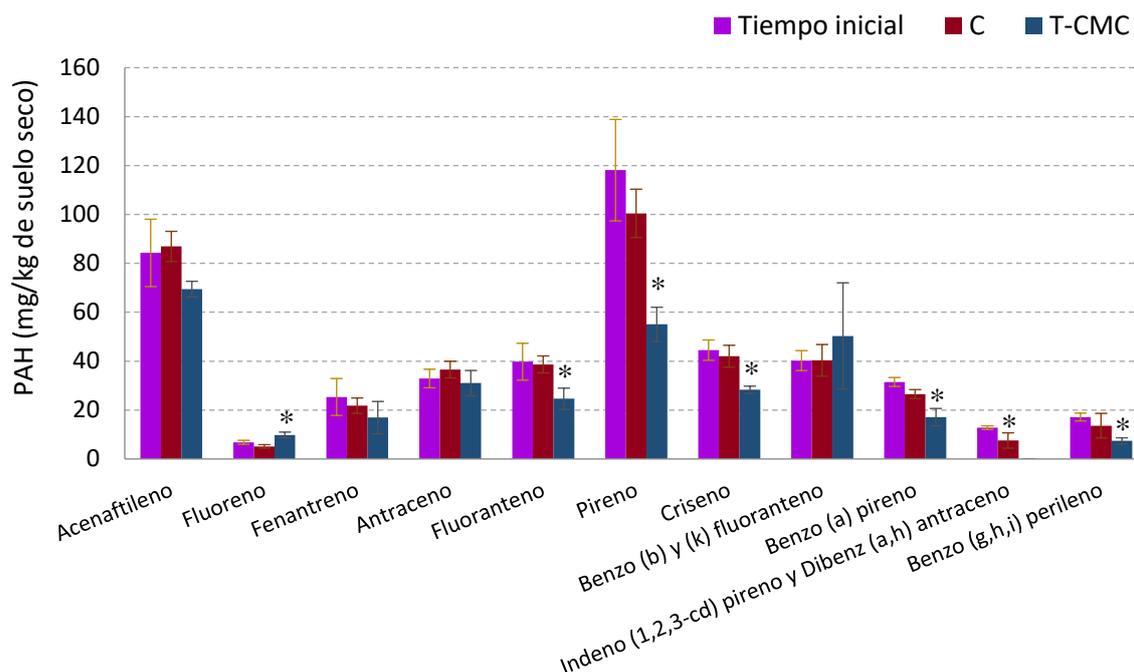


Figura IV.3. Concentración de los diferentes PAH identificados por CG (mg/kg de suelo seco) al tiempo inicial y en los microcosmos C y T-CMC. Se graficaron promedios de triplicados con sus respectivas desviaciones estándar. Los asteriscos muestran diferencias significativas con respecto al valor inicial.

IV.1.2.3. Análisis del efecto del Triton X-100 sobre la comunidad bacteriana del suelo

IV.1.2.3.1. Recuento de bacterias cultivables

En paralelo al seguimiento de los hidrocarburos y la tensión superficial, para evaluar el efecto en la comunidad bacteriana del suelo, se llevaron a cabo recuentos de bacterias heterótrofas cultivables en placa con medio R2A y bacterias degradadoras de PAH e HAF por la técnica del NMP. Los resultados se exponen en la figura IV.4, donde se muestran los datos correspondientes al tiempo inicial y a los 30 días de incubación, tanto para el control como para los microcosmos con Triton X-100.

Se detectó un aumento significativo en el número de bacterias heterótrofas cultivables en R2A en C y T-CMC con respecto al día inicial. El NMP de degradadoras de

Haf en los microcosmos con Triton X-100 fue significativamente mayor ($P < 0,05$) a los resultados obtenidos en el suelo inicial y en el control después de 30 días de incubación (Figura IV.4). El NMP de degradadoras de PAH no mostró cambios con respecto al tiempo inicial en ninguna de las condiciones.

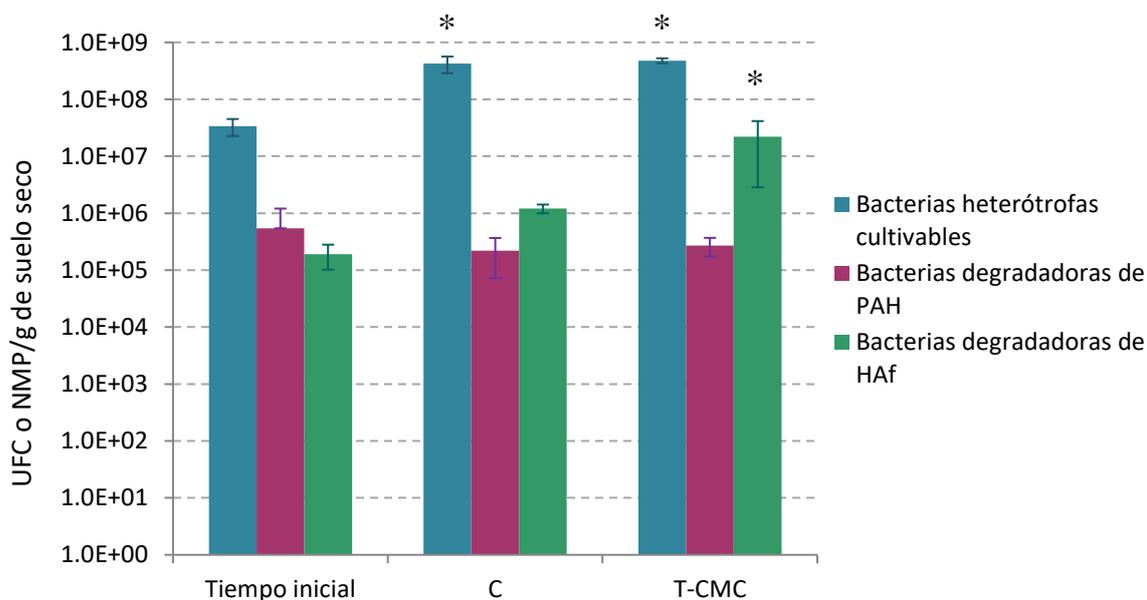


Figura IV.4. Recuento de bacterias heterótrofas cultivables en R2A, de degradadoras de PAH y de HAF al tiempo inicial y a los 30 días de tratamiento en los microcosmos C y T-CMC. Se graficaron los promedios de triplicados con sus respectivas desviaciones estándar (barras). El asterisco indica diferencia significativa con el valor inicial.

IV.1.2.3.2. Dinámica de la comunidad bacteriana de los microcosmos mediante PCR/DGGE del gen 16S rARN

El análisis de la dinámica de la comunidad bacteriana del suelo en estudio al tiempo inicial y en los microcosmos C y T-CMC luego de 30 días de incubación se muestra en la figura IV.5. Al comparar los perfiles de bandas obtenidos, pudo verse que la incubación de 30 días generó cambios en la comunidad, así como también lo hizo el Triton X-100 con respecto al estado inicial. Este último, a los 30 días generó además una dinámica que se diferenció del efecto de la incubación.

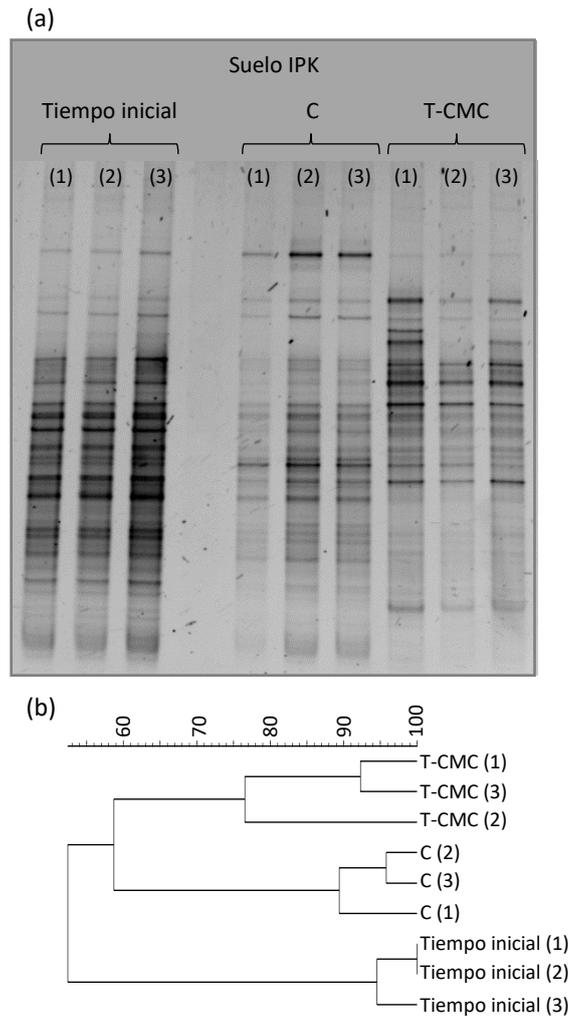


Figura IV.5. (a) Perfiles de PCR-DGGE de las comunidades bacterianas de los microcosmos IPK control al tiempo inicial y a los 30 días de incubación en el microcosmos C y T-CMC. Las calles numeradas (1), (2) y (3) corresponden a triplicados de una misma condición. (b) Dendrograma obtenido a partir de los perfiles de bandas de la DGGE, en base a la matriz de similitud calculada mediante el coeficiente de Jaccard.

En base a la anterior observación en la dinámica de la comunidad bacteriana, teniendo en cuenta la acción de los surfactantes sobre la solubilización de sustratos hidrofóbicos sorbidos a la matriz del suelo, se contrastó el efecto del surfactante en el suelo crónicamente contaminado con el efecto en un suelo prístino. La figura IV.6 muestra los perfiles de DGGE luego de 15 días de incubación de un suelo prístino control y del mismo suelo tratado con Triton X-100. Pudo verse nuevamente cómo el Triton X-100 generó cambios en el perfil de la comunidad bacteriana que se diferenciaron de los

provocados tras la incubación, sugiriendo que esto ocurriría de forma independiente a la matriz del suelo que se trate y los sustratos asociados a la misma.

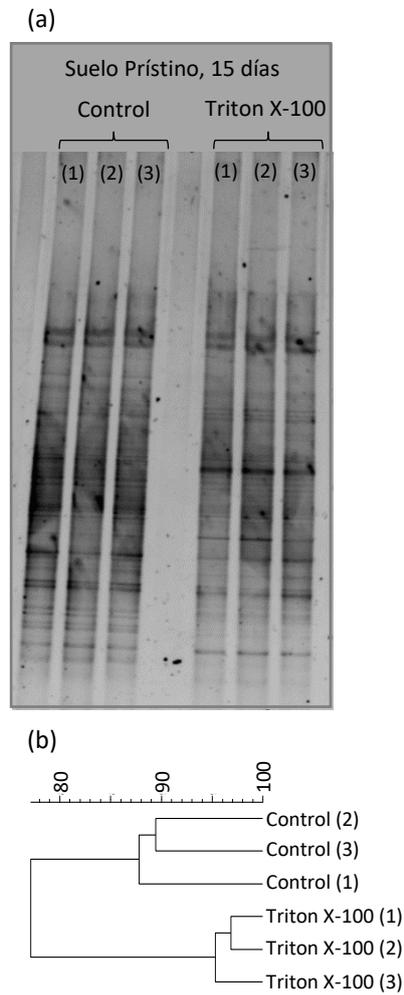


Figura IV.6. (a) Perfiles de PCR-DGGE de las comunidades bacterianas de microcosmos de un suelo prístino control y tratado con Triton X-100 luego de 15 días de incubación. Las calles numeradas (1), (2) y (3) corresponden a triplicados de una misma condición. (b) Dendrograma obtenido a partir de los perfiles de bandas de la DGGE, en base a la matriz de similitud calculada mediante el coeficiente de Jaccard.

IV.2. Estudio del efecto de la concentración de Triton X-100 en la biodegradación de PAH y en la estructura y dinámica de la comunidad bacteriana mediante ensayos de microcosmos

A raíz de lo observado en los sistemas anteriores, donde se detectó la eliminación de HC por estimulación a través del tratamiento con Triton X-100, sin dejar de lado un importante cambio en la estructura de la comunidad bacteriana, se planteó estudiar el efecto de la concentración del surfactante en estudio. Se decidió comparar su efecto con dos concentraciones menores dado que la CMC del Triton X-100 en el suelo IPK es elevada para su potencial aplicación en campo, requiriéndose aproximadamente 7 kg de surfactante por m² considerando la biorremediación de los 20 cm superficiales. Las concentraciones a ensayar fueron seleccionadas de la región de la curva Tensión superficial vs log [Triton X-100] (Figura IV.1) por debajo de la CMC donde la relación entre dichas variables se mantiene lineal.

Los microcosmos consistieron en 500 g de suelo IPK y fueron denominados de la siguiente manera según los distintos tratamientos:

- Suelo control: microcosmos C.
- Tratamiento con 11 mg/g de suelo seco: microcosmos T-A.
- Tratamiento con 14 mg/g de suelo seco: microcosmos T-B.
- Tratamiento con 26 mg/g de suelo seco: microcosmos T-CMC.

IV.2.1. Efecto en la tensión superficial

Durante el período de incubación, se determinó la TS de suspensiones del suelo a los distintos tiempos de muestreo y los resultados para cada microcosmos pueden observarse en la figura IV.7. Si bien en el comportamiento del sistema C se observó una amplia desviación, pudo notarse una tendencia a disminuir en las determinaciones de TS en el transcurso del primer mes de incubación. Se destaca claramente cómo la adición de Triton X-100 generó una disminución significativa de la tensión superficial en los sistemas T-A, T-B y T-CMC con respecto al control C desde el inicio hasta el final del

tratamiento. A lo largo del tiempo de incubación, dicha disminución fue proporcional a las distintas concentraciones del surfactante. Mientras que en los microcosmos con sub-CMC (T-A y T-B) los valores de tensión superficial permanecieron constantes, en T-CMC se registró un aumento que presentó diferencia significativa ($P < 0,05$) a los 63 días con respecto a los otros tiempos de muestreo.

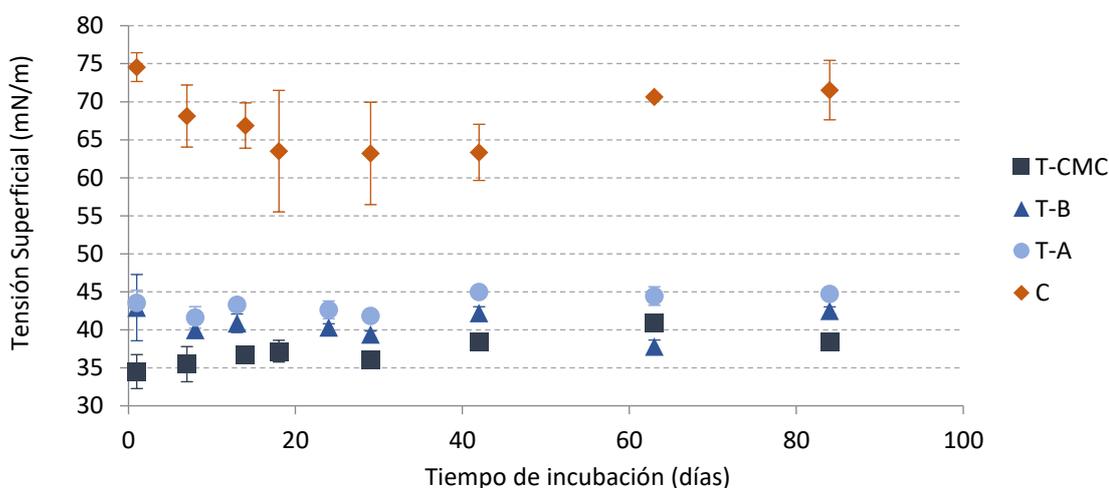


Figura IV.7. Seguimiento de la tensión superficial durante el tiempo (días) de incubación. Se graficaron promedios de triplicados, con sus respectivas desviaciones estándar (barras).

IV.2.2. Desorción y biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos

Durante el período de incubación, se tomaron muestras de cada microcosmos por triplicado para la determinación de PAH a los días 1, 7, 14, 29, 42 y 84. Adicionalmente, se midió la fracción biodisponible (BDP) de PAH mediante extracción con la resina Amberlite XAD-2 para los mismos tiempos de incubación.

En la figura IV.8 se muestra la concentración total (columnas completas) y la fracción sorbida al suelo (columnas inferiores lisas) de PAH a lo largo del tratamiento para los cuatro microcosmos. En una primera instancia se observó, para todas las condiciones en estudio, un importante descenso en la concentración de PAH al día 7 del tratamiento con respecto al valor inicial, principalmente a expensas de la fracción BDP.

Cabe destacar que en ese mismo momento los sistemas con dosis sub-CMC de surfactante (T-A y T-B) mostraron concentraciones de PAH sorbidos significativamente menores ($P < 0,05$) que el control (C).

Al observar particularmente al microcosmos C, se vio que la eliminación de la fracción BDP inicial de PAH fue seguida por una disminución de la proporción que se encontraba sorbida a la matriz del suelo acompañada de la recurrencia de una fracción biodisponible (día 14). Esto indicaría que la tasa de liberación abiótica habría sido mayor que la tasa de biodegradación de dichos compuestos. Cuando un material sorbente contiene PAH y las bacterias actúan simulando un sumidero, la degradación bacteriana puede llevar hacia la disolución de la fracción de PAH de desorción lenta desde el pool que se encuentra sorbido (Johnsen y col., 2005).

Luego de 42 días de incubación, en los sistemas con dosis sub-CMC de surfactante se evidenció un efecto estimulador en la degradación de PAH, diferenciándose significativamente ($P < 0,05$) de C y T-CMC. La disminución observada correspondió a una eliminación de un porcentaje de la fracción BDP. Complementariamente, la figura IV.9 exhibe las fracciones sorbidas y BDP de cada PAH identificado en los cuatro microcosmos al día 42. Las tres concentraciones de surfactante mostraron resultados de mayor degradación en varios de los PAH en comparación a lo registrado para el microcosmos C. Mientras que en el sistema T-CMC sólo ocurrió degradación de los PAH de alto peso molecular, en las dosis sub-CMC disminuyeron las concentraciones tanto de los PAH de alto como de bajo peso molecular.

Finalmente, luego de 84 días de tratamiento la cantidad remanente de PAH totales en T-A y T-B correspondió completamente a la fracción sorbida de dichos contaminantes (Figura IV.8), sugiriendo que en estos microcosmos la tasa de degradación de los mismos habría estado limitada por la transferencia de masa.

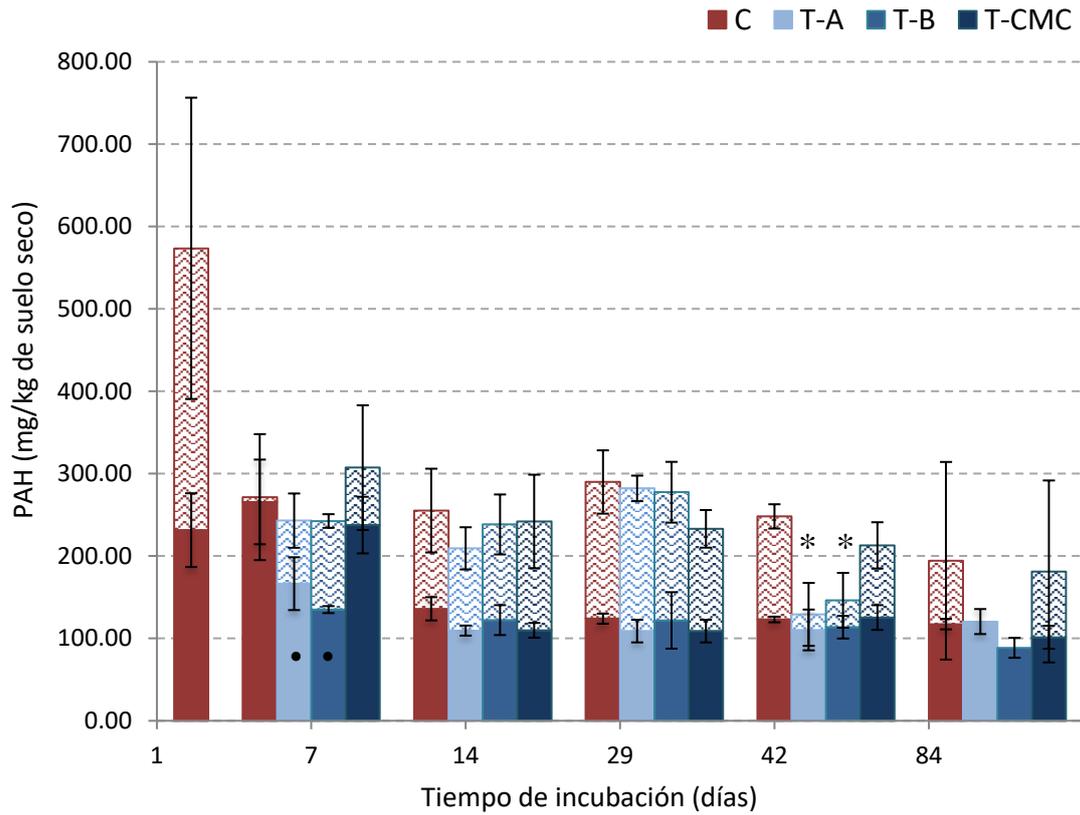


Figura IV.8. Concentración de PAH totales (mg/kg de suelo seco) en el tiempo de incubación, discriminando la fracción biodisponible (columnas con textura) y no biodisponible (columnas lisas). Se muestran promedios de triplicados con sus respectivas desviaciones estándar (barras). Los puntos y asteriscos señalan diferencias significativas con respecto al control en la fracción sorbida al suelo y en el total de PAH respectivamente.

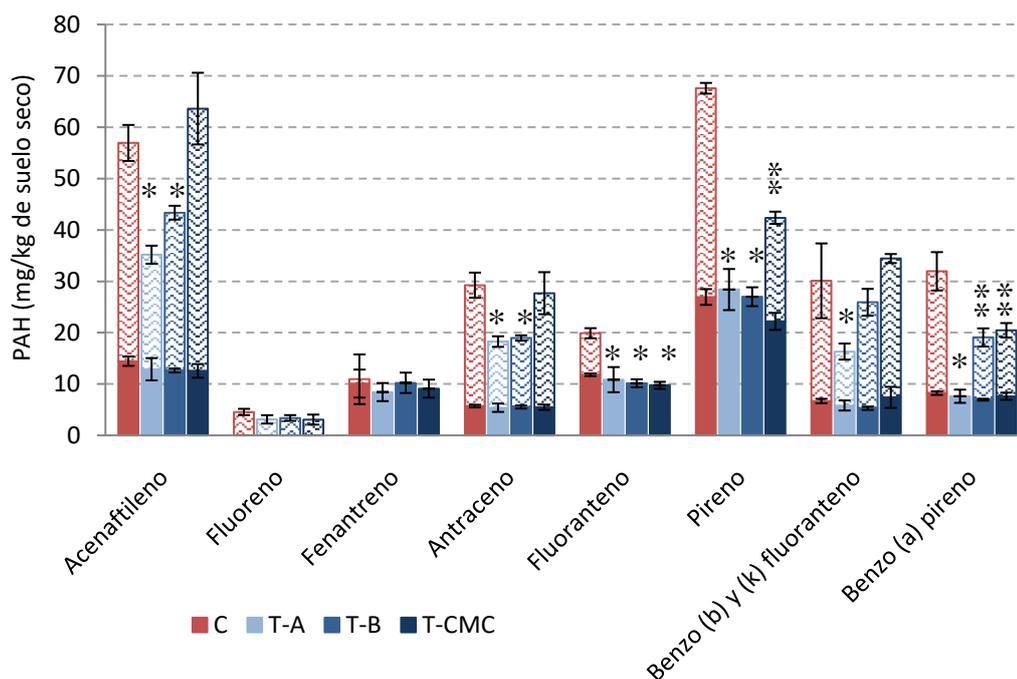


Figura IV.9. Fracciones BDP (columna con textura) y sorbida (columna lisa) de cada PAH identificado al día 42 de incubación en los cuatro microcosmos. Se muestran promedios de triplicados, con sus respectivas desviaciones estándar (barras). Los asteriscos indican diferencia significativa ($P < 0,05$) con el microcosmos C en la concentración de cada PAH; diferente número de asterisco indica diferencias entre sí.

IV.2.3. Degradación de hidrocarburos alifáticos

En esta sección se analizó la degradación de la fracción de HAF en los cuatro microcosmos en los días 7, 14, 29 y 63 de incubación. En la figura IV.10 se graficaron los porcentajes de degradación para la suma de HAF identificados por CG. Aproximadamente el 90% de los HAF fueron de longitud intermedia ($C_{10}-C_{25}$). Inicialmente (día 7) se observó una marcada disminución de la fracción de HAF en todos los tratamientos en estudio superando el 40% de degradación. Particularmente en el microcosmos T-CMC al día 7, se detectó un efecto negativo en la eliminación de estos hidrocarburos con respecto al control.

En el transcurso del tiempo de incubación, el microcosmos C alcanzó un máximo porcentaje de degradación de HAF del 70%. Por otra parte, se registró un efecto

estimuladorio sobre dicha degradación en los tratamientos con Triton X-100. La aplicación del surfactante en la dosis CMC, llegó a superar el grado de eliminación del control al día 29, momento en que se registró 80% de degradación en T-CMC; mientras tanto, T-A y T-B no se diferenciaron significativamente ($P>0,05$) de C. Hacia el día 63, los tratamientos con surfactante en las dosis sub-CMC alcanzaron grados de degradación mayores a los observados en C, diferenciándose significativamente ($P<0,05$) de este último, aunque sin lograr igualar el 80% de eliminación detectado en T-CMC.

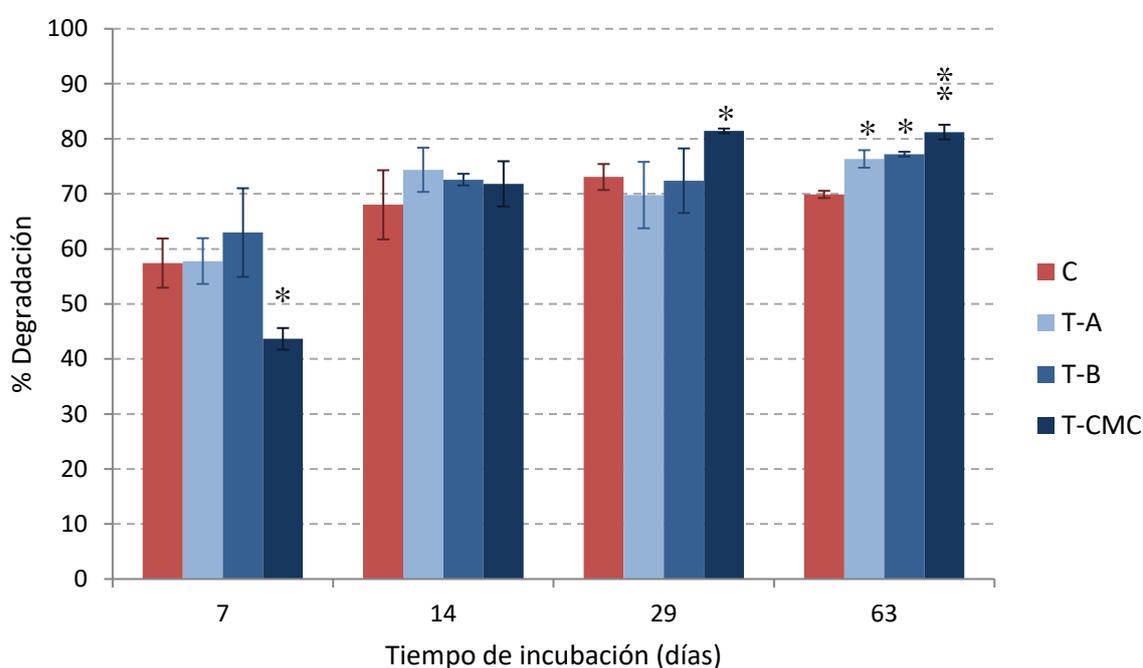


Figura IV.10. Porcentaje de degradación de HAF totales en el tiempo de incubación. Las barras representan desviación estándar del promedio de triplicados. Los asteriscos muestran diferencias significativas con el control para cada día de incubación ensayado (distinto número de asteriscos, diferencia significativa entre sí).

IV.2.4. Monitoreo de Triton X-100

El Triton® X-100 comercial consiste en una mezcla de compuestos que tienen en común un anillo aromático con un sustituyente octilo y una cadena de polietilenglicoles que varía en el número de subunidades de etilenglicoles. Esta naturaleza polidispersa,

genera en los cromatogramas de los extractos de suelo (CG), una serie de picos con variado tiempo de retención. Para poder diferenciar los correspondientes al surfactante en estudio de los demás picos, se compararon los cromatogramas del suelo control con los del mismo suelo tratado con Triton X-100 (Figura S1, en Material Suplementario). Se cuantificó la concentración relativa de cada pico comparando su señal con la del estándar interno utilizado.

Lograron identificarse 10 picos pertenecientes al Triton X-100, correspondientes a especies de polietilenglicol con diferente número de unidades de óxido de etileno (Franska y col., 2003). Para evaluar su degradación, se compararon las áreas de dichos picos para los microcosmos T-B y T-CMC después de 1 y 84 días de incubación.

Los resultados obtenidos (Tabla IV.2) mostraron que los picos con mayor tiempo de retención, correspondientes a las especies de mayor peso molecular, alcanzaron un mayor porcentaje de degradación, superando el 90% en el microcosmos T-CMC. Con respecto a las especies de menor tiempo de retención, parece haberse registrado una menor degradación. Esto podría deberse a la transformación gradual del Triton X-100 a lo largo del clivaje secuencial de las unidades de óxido de etileno (Chen y col., 2005), lo cual iría generando un enriquecimiento de la muestra en los picos de menor peso molecular.

Por otro lado, en el microcosmos T-B se registró un menor porcentaje de degradación de los picos con mayor tiempo de retención y la desaparición de los de menor peso molecular, lo cual evidenciaría una menor degradación del surfactante.

Tabla IV.2. Concentración relativa de los diez picos identificados como componentes de Triton X-100, en los microcosmos T-B y T-CMC a los días 1 y 84 de incubación.

Tiempo de retención (min)	T-B			T-CMC		
	Concentración relativa (mg/kg)		Eliminación (%)*	Concentración relativa (mg/kg)		Eliminación (%)*
	Día 1	Día 84		Día 1	Día 84	
22,7	40,2 ± 0,7		100	28 ± 11	19 ± 3	32
27,0	5,5 ± 0,5		100	15 ± 3	3 ± 4	83
32,8	26 ± 2		100	28 ± 6	10 ± 2	64
35,3	16 ± 5		100	79 ± 18	7 ± 8	91
40,1	151 ± 41		100	786 ± 153	62 ± 11	92
42,2	252 ± 78		100	1.279 ± 275	96 ± 5	93
44,6	320 ± 81	80 ± 36	75	1.660 ± 357	136 ± 7	92
48,7	394 ± 117	123 ± 51	69	2.022 ± 364	129 ± 15	94
56,0	368 ± 113	99 ± 27	73	1.804 ± 269	64 ± 75	96
62,6	266 ± 93	109 ± 16	59	1.348 ± 134	69 ± 4	95

*Calculado al día 84 con respecto al día 1.

IV.2.5. Matrices de excitación-emisión de fluorescencia

La fluorescencia es la propiedad de ciertas moléculas orgánicas e inorgánicas de liberar energía en forma de luz cuando son excitadas por una fuente de energía adecuada, la cual eleva los niveles de energía de los electrones dentro de la molécula. Los espectros de absorbancia y emisión de suelo proveen información sobre la composición y complejidad de la muestra, y los cambios que puedan ocurrir en la materia orgánica fluorescente. En un suelo contaminado, tanto las sustancias húmicas como los PAH poseen en su estructura química dobles enlaces conjugados, lo que confiere fluorescencia a las moléculas. Ambos poseen regiones de excitación y emisión de fluorescencia características, según la naturaleza química del compuesto. Esto permite el uso de herramientas de fotofísica como son las Matrices de Excitación-

Emisión de Fluorescencia (MEEF) para su monitoreo y control. En la figura IV.11 se graficaron las regiones de excitación y emisión características de distintas familias de fluoróforos presentes en aguas y suelos no contaminados. Las regiones I y II se asocian al aminoácido tirosina y a proteínas simples con alto contenido de este tipo de aminoácido aromático. Los extractos de suelo emiten en las regiones III y V, la región III es característica de los ácidos fúlvicos, mientras que la V de ácidos húmicos (David Gara y col., 2011). La región IV corresponde principalmente a productos solubles de degradación microbiana.

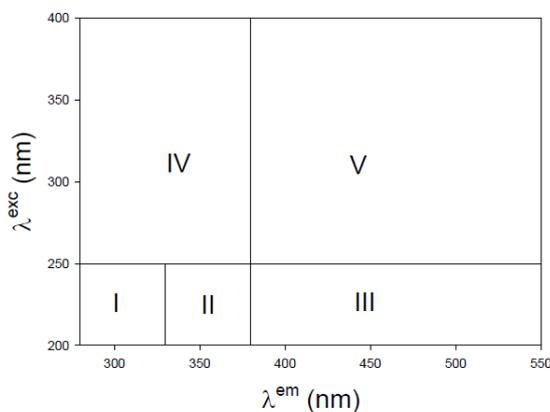


Figura IV.11. Regiones de excitación-emisión de fluorescencia de sustancias naturales. Figura tomada de David Gara y col. (2011).

Con el objetivo de estudiar los posibles cambios producidos por la aplicación del surfactante no-iónico Triton X-100 sobre la matriz del suelo, en una primera instancia se analizaron las características espectroscópicas de extractos alcalinos de microcosmos realizados con un suelo prístino (P), el mismo suelo tratado con fenantreno en 800 mg/kg de suelo seco (PF) y una segunda condición con fenantreno en igual concentración y Triton X-100 en 26 mg/g de suelo seco (PTF).

En la figura IV.12 se muestra la MEEF obtenida para una solución acuosa de Triton X-100 y otra solución acuosa de fenantreno. A simple vista pudo observarse que el surfactante posee principalmente dos zonas de emisión señaladas en la figura como

región 1 y región 2. El fenantreno emite en una única zona, remarcada como región 3, que se superpone con la región 1 del Triton X-100.

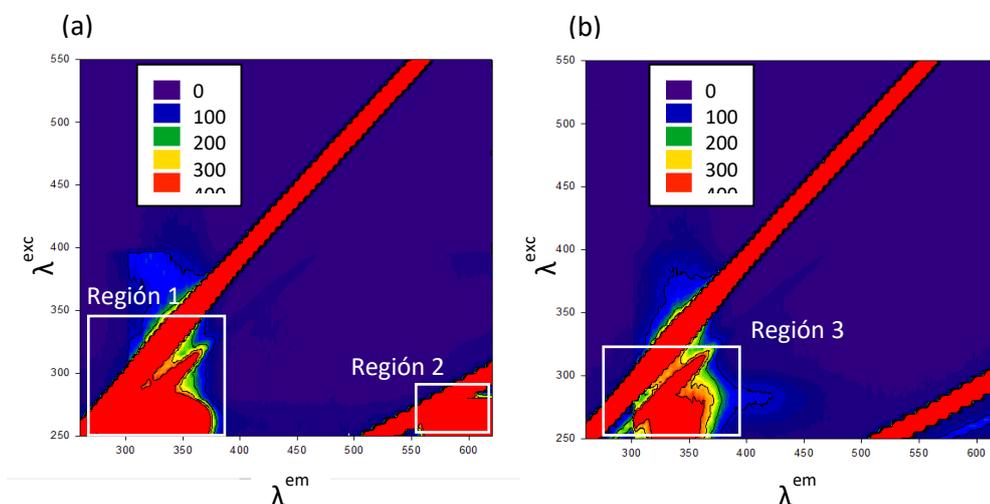


Figura IV.12. Matriz de excitación-emisión de fluorescencia (a) de una solución de Triton X-100 y (b) de una solución de FEN. La escala representa la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias.

Con la intención de interpretar los cambios observados en las MEEF de los extractos alcalinos de los distintos tratamientos en el suelo prístino se realizó un estudio integrado mediante el análisis “Parallel Factor” (PARAFAC). En las muestras ambientales, la emisión se debe a la contribución resultante de todas las sustancias presentes en los extractos con capacidad de emitir fluorescencia, denominadas fluoróforos. El análisis PARAFAC permite distinguir distintas familias de fluoróforos y su contribución relativa a la emisión de fluorescencia total del sistema en estudio.

Para obtener la mejor resolución posible de los espectros, logrando observar un máximo de emisión por especie (familia de compuestos con un mismo comportamiento), se requirieron un mínimo de 17 especies de fluoróforos distintas en el análisis. La figura IV.13 presenta las contribuciones relativas de cada especie sobre los microcosmos del suelo prístino y los espectros de emisión correspondientes a cada familia encontrada. De forma complementaria y con el objetivo de comparar los tratamientos en función de las contribuciones de las distintas especies, en la figura IV.13(c) se expuso un análisis de correspondencia (AC). Estos gráficos muestran

claramente los cambios en los microcosmos tratados con Triton X-100 (PTF) a lo largo de todo el período de incubación con respecto a los que no habían sido tratados (P y PF), tanto en el perfil de las barras apiladas como en la distribución en distintas zonas del espacio en el AC. Considerando que se analizaron extractos acuosos alcalinos de las muestras de suelo, la diferencia observada en PTF podría indicar modificaciones en la matriz del suelo provocadas por el surfactante sintético que habrían llevado a cambios en la solubilización de distintos fluoróforos.

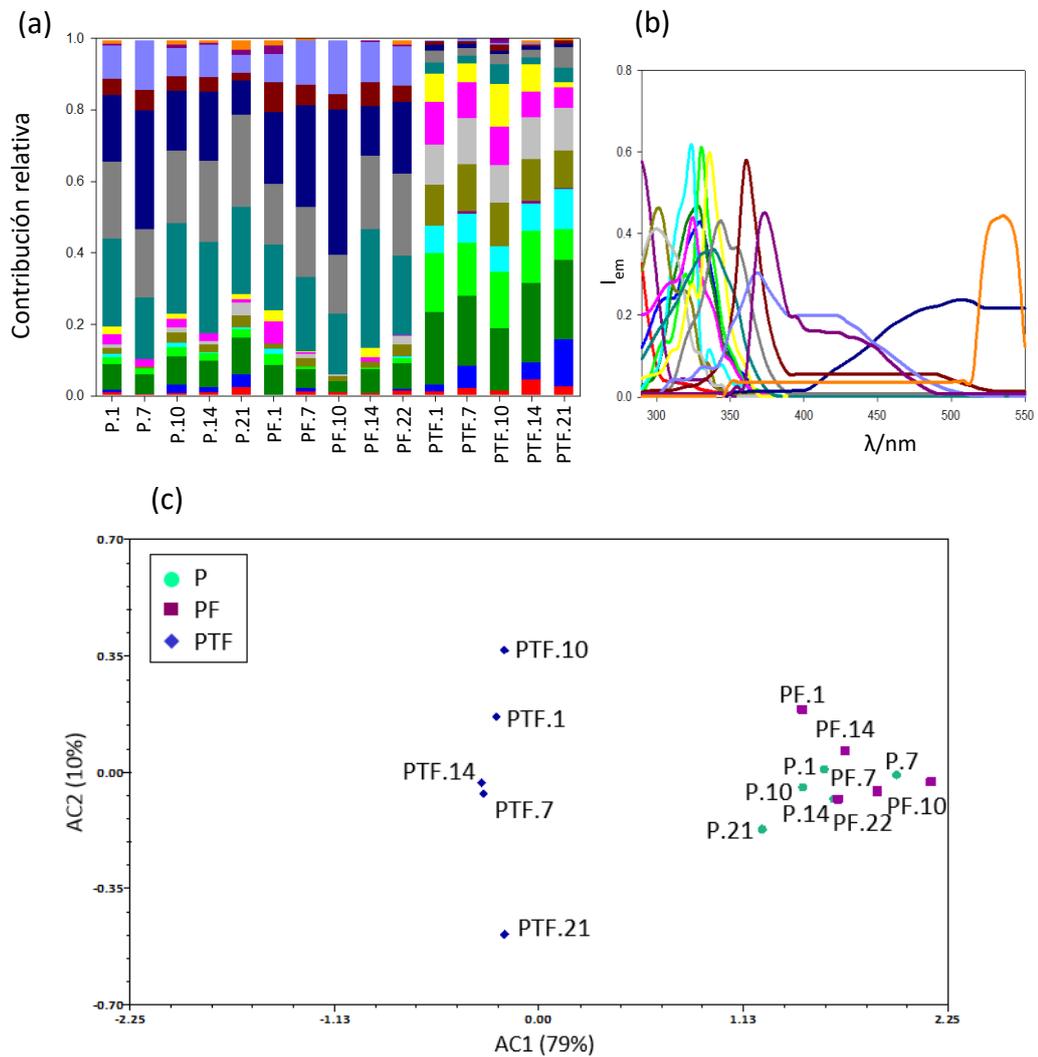


Figura IV.13. (a) Contribución relativa de las 17 especies fluoróforas encontradas en los microcosmos P, PF y PTF a los días de incubación: 1, 7, 10, 14 y 21. (b) Espectros de emisión de cada especie. (c) AC de los microcosmos en función de las contribuciones de las 17 especies. El número indicado en cada rótulo de los microcosmos señala el día de incubación.

El mismo procedimiento se aplicó a los microcosmos C, T-A, T-B y T-CMC a los días 1 y 63 de incubación, obteniendo los gráficos que se exponen en la figura IV.14. En este caso, si bien tanto el tratamiento con el surfactante como la incubación de los sistemas provocaron cambios en el perfil de las contribuciones relativas de las distintas especies encontradas, las diferencias observadas no fueron tan marcadas como en el suelo prístino (Figura IV.13). Este comportamiento se complementa con la distribución espacial en distintas zonas en el AC. Se pudo observar que la mayoría de los sistemas tratados con Triton X-100 se ubicaron en una zona, con excepción de T-B al día 1 de incubación.

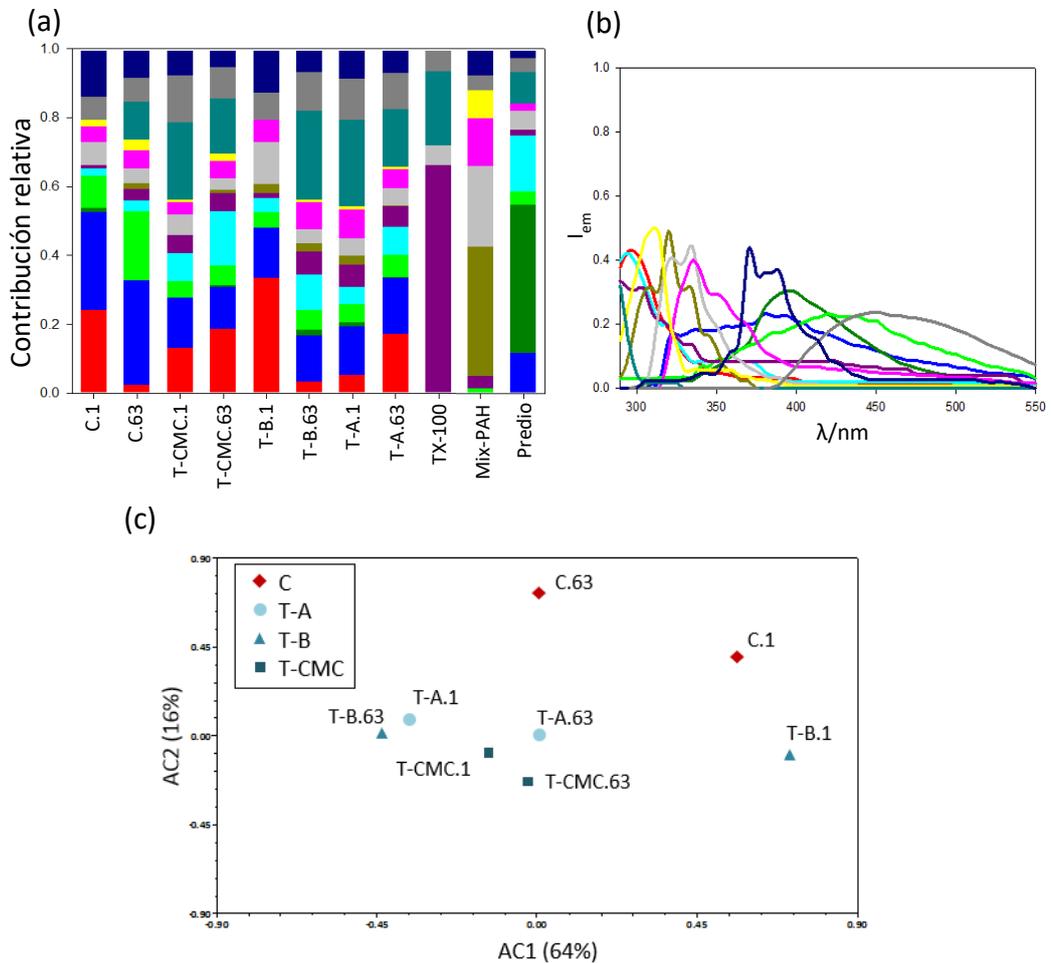


Figura IV.14. (a) Contribución relativa de las 13 especies fluoróforas encontradas en los microcosmos C, T-A, T-B y T-CMC a los días de incubación 1 y 63; en el suelo del predio; la solución mix-PAH y la solución de Triton X-100 (TX-100). (b) Espectros de emisión de cada especie. (c) AC de los microcosmos C, T-A, T-B y T-CMC en función de las contribuciones de las 13 especies. El número indicado en cada rótulo de los microcosmos señala el día de incubación.

Para determinar el origen de las diferentes familias de fluoróforos en las MEEF de los microcosmos, éstas se contrastaron con las MEEF correspondientes a una solución saturada de los 16 PAH prioritarios, una solución de Triton X-100 y con la MEEF de un extracto de suelo de una zona alejada al lugar de muestreo alejada de la contaminación (Predio). En base a las contribuciones relativas de las especies encontradas en los distintos extractos analizados y a la evaluación de los espectros de emisión, pudieron diferenciarse tres grupos de fluoróforos que se relacionaron principalmente con la contribución de: Triton X-100, PAH y suelo.

En los extractos obtenidos a partir de los microcosmos con las tres concentraciones de Triton X-100 se vieron contribuciones comparables de las especies propias de esta solución, lo que indicaría una saturación de la técnica de extracción.

Por otra parte, se evaluó la proporción de contribuciones propias de la mix-PAH para cada microcosmos, con respecto a la fluorescencia total. Los resultados se muestran en la figura IV.15 y sugieren que una mayor fracción de PAH habría sido recuperada en los sistemas con dosis sub-CMC (T-A y T-B) al obtenerse mayor contribución relativa de las especies propias de los PAH.

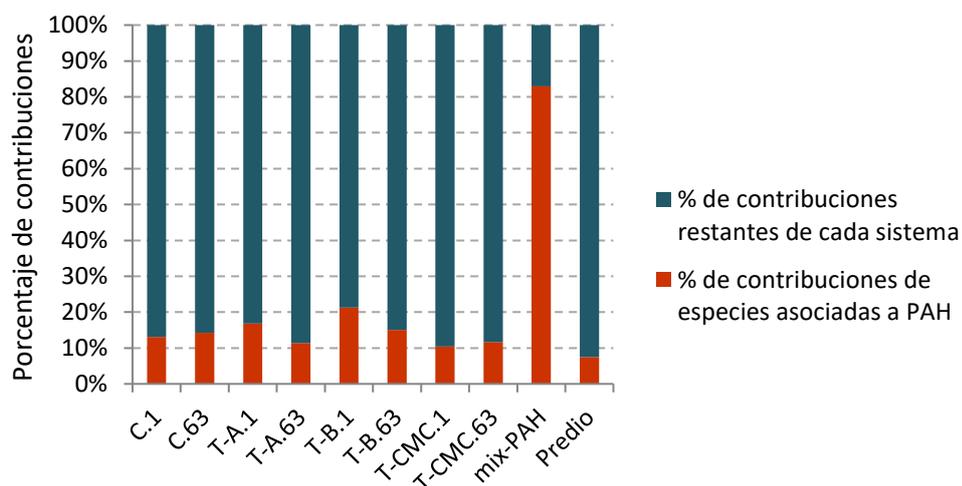


Figura IV.15. Porcentaje de contribución de especies fluoróforas asociadas principalmente a los PAH en cada microcosmos.

IV.2.6. Análisis del efecto del Triton X-100 a las distintas concentraciones sobre la comunidad bacteriana del suelo

IV.2.6.1. Recuento de bacterias heterótrofas cultivables en el medio R2A

En la figura IV.16 se expone la dinámica del recuento de bacterias heterótrofas cultivables en R2A durante el período de incubación. Desde el comienzo del tratamiento y durante los primeros 21 días de incubación, no se observaron diferencias significativas entre los recuentos de aproximadamente 1×10^9 UFC/g de suelo seco en los cuatro microcosmos en estudio (con excepción de T-A, que mostró un número significativamente menor al día inicial). Los recuentos de bacterias heterótrofas cultivables registrados en C, disminuyeron hacia el día 42 y permanecieron alrededor de 1×10^8 UFC/g de suelo seco hasta el final del tratamiento.

Desde el día 21 y hasta el día 63, el sistema T-CMC evidenció un recuento de bacterias cultivables mayor con respecto al microcosmos C, presentando diferencias significativas ($P < 0,05$). En paralelo, los recuentos de los microcosmos con dosis sub-CMC de surfactante, difirieron significativamente ($P < 0,05$) de C luego de 42 días de tratamiento, superándolo en número y manteniéndose esta relación hasta el último día de monitoreo.

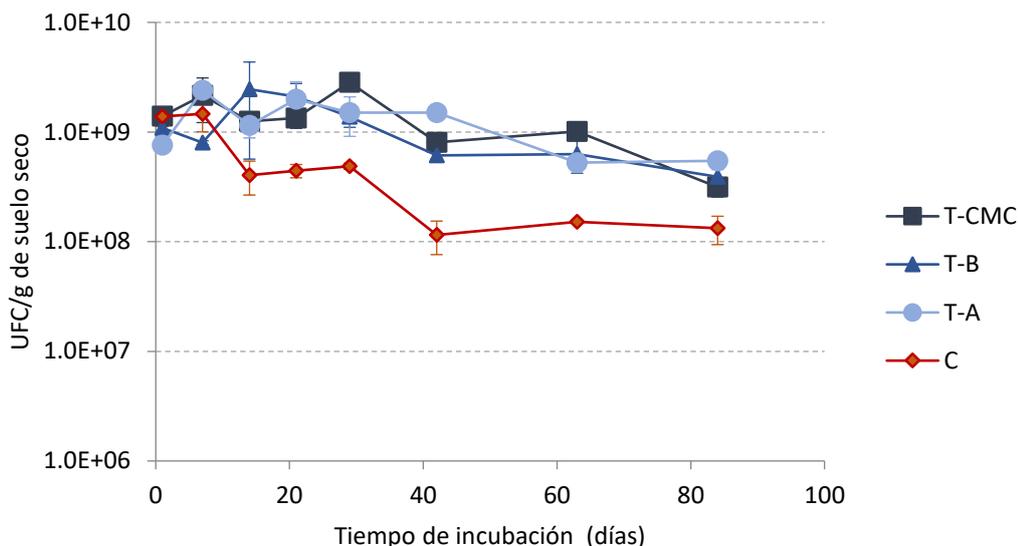


Figura IV.16. Dinámica de la población de bacterias heterótrofas cultivables en R2A en cada microcosmos durante el período de incubación. El resultado de cada tratamiento corresponde al promedio de microcosmos independientes por triplicado. Las barras representan las desviaciones estándar.

IV.2.6.2. Recuento de bacterias cultivables degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos

En la figura IV.17 se muestra el seguimiento del NMP de bacterias degradadoras de PAH por gramo de suelo seco durante el período de incubación. Durante las primeras dos semanas del tratamiento no se observaron diferencias significativas al comparar los recuentos de los cuatro microcosmos. Observando el comportamiento en el microcosmos T-CMC, pudo verse un máximo número de bacterias degradadoras al día 21 de incubación, mientras que para las condiciones con dosis sub-CMC el valor más alto de recuento ocurrió al día 29, habiendo alcanzado de esta forma el máximo NMP por sobre los cuatro tratamientos en estudio y a lo largo de todo el período de incubación. En paralelo, no se observaron cambios en el NMP de bacterias degradadoras en el microcosmos C. A partir del día 42, recuentos comparables entre todos los microcosmos se mantuvieron en el tiempo hasta el final del período estudiado.

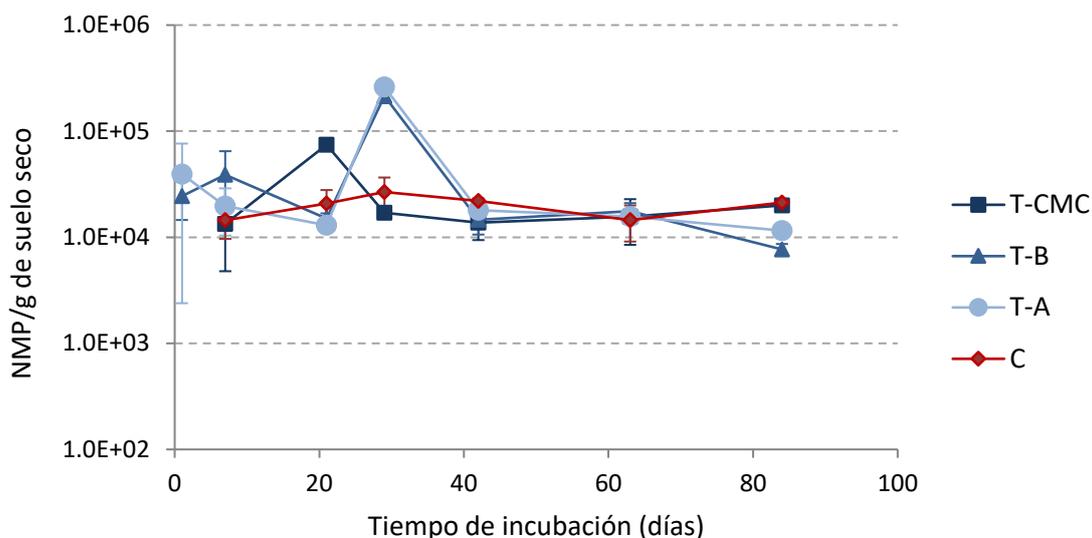


Figura IV.17. Recuento de bacterias cultivables degradadoras de PAH (NMP/g de suelo seco) durante el período de incubación. El resultado de cada tratamiento corresponde al promedio de microcosmos independientes por triplicado. Las barras representan las desviaciones estándar.

IV.2.6.3. Recuento de bacterias cultivables degradadoras de hidrocarburos alifáticos

En esta sección se describe la dinámica de la población de bacterias degradadoras de HAf. La figura IV.18 muestra el NMP de degradadoras por gramo de suelo seco en función del tiempo de incubación. Inicialmente, sólo el microcosmos con la mayor concentración de Triton X-100 presentó un recuento mayor a 2×10^4 NMP/g de suelo seco. En el control se pudo determinar el NMP al día 14 y a partir del día 42, observándose valores por debajo de los microcosmos tratados con Triton X-100 hasta el día 84, cuando T-B y T-CMC llegaron a valores comparables.

En el sistema con la menor concentración del surfactante, T-A, si bien se registraron oscilaciones, no evidenció diferencias estadísticamente significativas en el tiempo, manteniéndose alrededor de 1×10^6 NMP/g de suelo seco.

A partir de la semana de incubación, T-B tuvo una dinámica comparable con T-A hasta el día 42, a partir de allí se diferenció al disminuir el NMP hasta el final del tratamiento. El microcosmos T-CMC se comportó de forma similar a T-B.

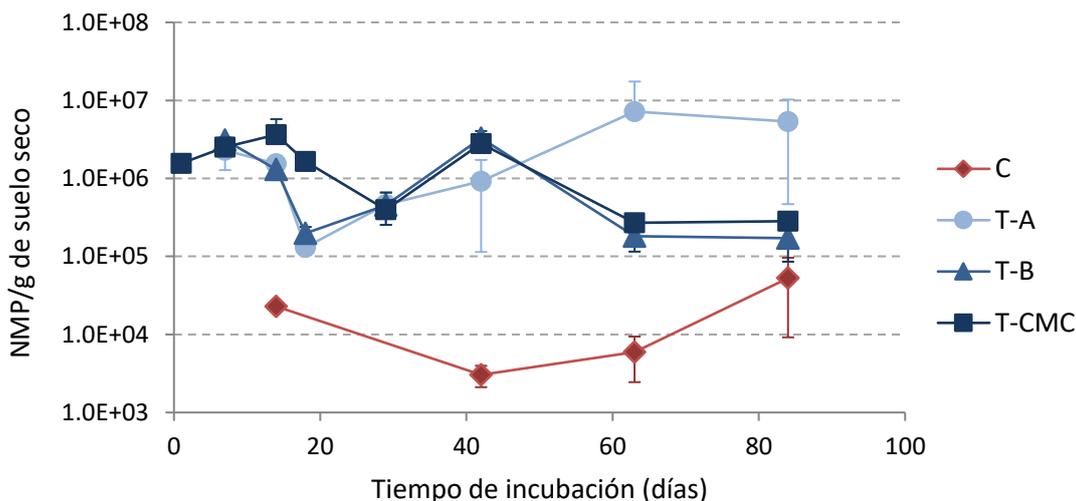


Figura IV.18. Recuento de bacterias degradadoras de HAF (NMP/g suelo seco) durante el período de incubación. El resultado de cada tratamiento corresponde al promedio de microcosmos independientes por triplicado. Las barras representan las desviaciones estándar.

IV.2.6.4. Análisis del potencial degradador de las comunidades bacterianas mediante PCR cuantitativa

Las bacterias degradadoras de hidrocarburos poseen genes funcionales que las convierten en microorganismos capaces de degradar un rango de varios de estos contaminantes. La selección y medición de genes funcionales implicados en la degradación de los hidrocarburos permite reflejar el potencial de una comunidad microbiana para degradar un contaminante como los PAH en un suelo contaminado (Shahsavari y col., 2016).

En esta sección, se analizó el potencial degradador de las comunidades bacterianas de los microcosmos en estudio mediante la cuantificación del gen funcional que codifica para la subunidad alfa de enzimas dioxigenasas hidroxilantes de anillo aromático de bacterias Gram negativas (PAH-RHD α GN), que actúan en los primeros pasos de degradación aeróbica de PAH.

Adicionalmente, dicha cuantificación se relacionó con el número de copias de genes 16S rARN, que al estar presente en todas las bacterias proporciona información sobre la dinámica de la comunidad bacteriana total de los sistemas analizados.

Diluciones seriadas de los plásmidos extraídos de los clones correspondientes obtenidos como se describió en la Sección III.2.7.11 (Materiales y Métodos), se utilizaron para la construcción de las curvas de calibración respectivas a PAH-RHD RHD α GN y al gen 16S rARN.

En el análisis del gen 16S rARN se obtuvieron datos del orden de 10^{10} - 10^{11} n° de copias/g de suelo seco y para el gen PAH-RHD α GN, en general se presentaron 10^6 - 10^7 n° de copias/g de suelo seco.

En la figura IV.19 se expuso el registro del número de copias del gen 16S rARN por gramo de suelo seco durante el tiempo de incubación de los microcosmos. Pudo observarse que inicialmente no hubo diferencias significativas entre las medidas de los cuatro microcosmos, comportamiento comparable a lo detectado en el recuento de bacterias heterótrofas cultivables (Figura IV.16). Hacia el día 63, el número de copias del gen 16S rARN de los microcosmos tratados con Triton X-100 fue significativamente mayor ($P < 0,05$) al del sistema control.

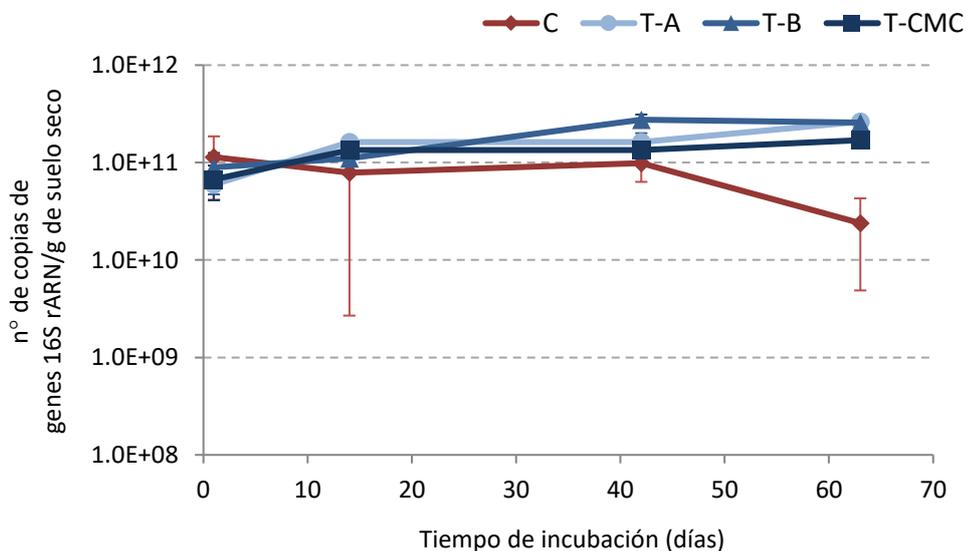


Figura IV.19. Dinámica del número de copias de genes 16S rARN por gramo de suelo seco en los cuatro microcosmos. Se graficaron promedios de triplicados, con sus respectivas desviaciones estándar (barras).

Con respecto a la potencial capacidad degradadora de PAH determinada a través de la cuantificación del gen PAH-RHD α GN, no se encontraron diferencias entre los cuatro microcosmos en el período inicial (Figura IV.20). Únicamente luego de 42 días de incubación, tanto en T-A, T-B como en T-CMC se detectó una relación PAH-RHD α GN/16S rARN significativamente mayor ($P < 0,05$) a la observada en el microcosmos C.

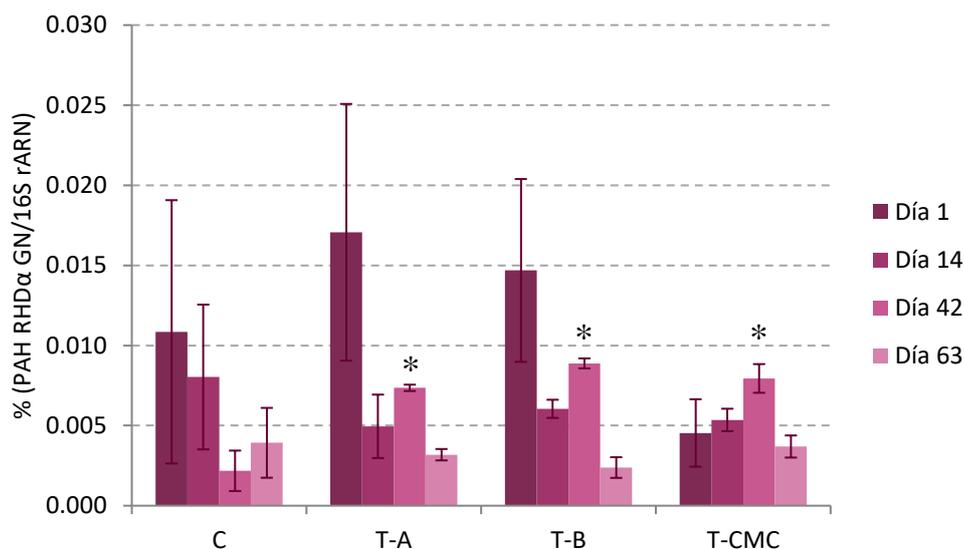


Figura IV.20. Relación entre el número de copias del gen PAH-RHD α GN y el número de copias del gen 16S rARN para los cuatro microcosmos. Se graficaron promedios de triplicados con sus respectivas desviaciones estándar (barras). Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) con el control.

IV.2.6.5. Diversidad, estructura y composición de la comunidad bacteriana del suelo

El estudio de la composición taxonómica y la diversidad de los microbiomas bacterianos del suelo presentes en los microcosmos en los días 1, 14 y 63 de tratamiento se llevó a cabo a través de pirosecuenciación de fragmentos amplificados del gen bacteriano 16S rARN.

Se obtuvo un rango de número de secuencias bacterianas que varió entre 1.059 y 8.995, como se muestra en la tabla IV.3. Éstas fueron agrupadas en 1.440 Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU) en base a un 97% de similitud. Para estimar el

porcentaje total de OTU bacterianas representadas en la muestra, complementariamente a las curvas de rarefacción, se utilizó el índice de Good. Cuando su valor se acerca a 1 indica que las secuencias obtenidas representan la mayoría de las secuencias bacterianas presentes en la muestra (Rungrassamee y col., 2013). En el análisis de los microcosmos C y tratados con Triton X-100, dichos índices de cobertura y los análisis de rarefacción (Figura IV.21), indicaron que la cobertura alcanzada fue suficiente para cubrir la mayor parte de la diversidad.

Tabla IV.3. Número de secuencias obtenidas a partir del análisis de pirosecuenciación, número de OTU agrupadas con el 97% de similitud, índice de Good y números de Hill obtenidos utilizando el programa EstimateS.

Microcosmos	Número de secuencias	Número de OTU ^a	Índice de Good	Números de Hill ^a		
				⁰ D	¹ D	² D
C.1	2.851	201	0,96	234,3	9,1	3,3
T-A.1	1.059	307	0,84	487,6	169,7	91,0
T-B.1	1.443	377	0,89	495,4	195,2	113,2
T-CMC.1	1.168	349	0,88	537,2	190,3	106,9
C.14	4.087	510	0,95	485,1	95,9	40,5
T-A.14	8.995	752	0,97	539,3	126,7	59,7
T-B.14	3.698	480	0,95	488,9	112,2	53,4
T-CMC.14	6.701	620	0,97	489,3	116,3	56,5
C.63	2.482	55	0,99	65,7	5,1	2,9
T-A.63	3.541	475	0,95	464,3	119,6	51,3
T-B.63	2.114	378	0,93	472,3	97,9	35,6
T-CMC.63	1.951	240	0,94	335,2	26,6	7,3

^aLos valores fueron calculados en base a 1.059 secuencias random por muestra. El número indicado en los rótulos de los microcosmos señala el día de incubación.

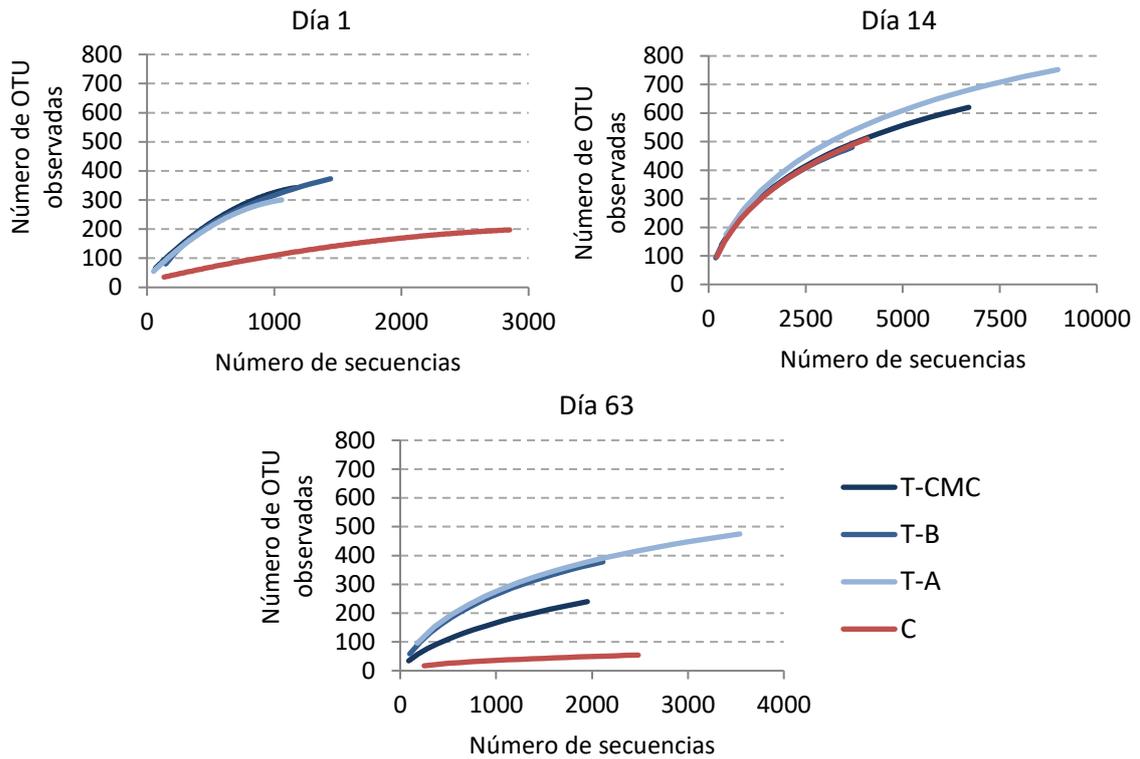


Figura IV.21. Curvas de rarefacción obtenidas por el programa EstimateS para los microcosmos C, T-A, T-B y T-CMC en los días 1, 14 y 63.

Para evaluar la complejidad de las comunidades bacterianas de los microcosmos, se calcularon tres estimadores pertenecientes a la familia de los números de Hill, descritos por Mark Hill (Hill, 1973) como un concepto unificado de diversidad que considera tanto el número de especies como los pesos diferentes de las especies en base a su abundancia relativa (Kang y col., 2016). Como se describió en la Sección III.2.7.9 (Materiales y Métodos), 0D permite estimar la riqueza de especies, 1D es una medida de diversidad calculada como la exponencial de Shannon y 2D estima la equitatividad como la inversa del índice de Simpson. En la figura IV.22 pudo observarse que independientemente de la dosis de surfactante, su adición provocó un aumento inmediato en la riqueza de especie (0D) y en la diversidad (1D y 2D) de la comunidad bacteriana del suelo. Este efecto podría haber sido causado parcialmente por una mejora en la recuperación de ADN generado por la influencia del surfactante en la adhesión bacteriana a superficies hidrofóbicas del suelo (Fortin y col., 2004).

Después de 14 días de tratamiento, los microcosmos con surfactante mantuvieron los valores de 0D con una disminución en los índices de diversidad, indicando que algunas especies habrían pasado a ser dominantes. En paralelo, el microcosmo C mostró un importante aumento de los estimadores de riqueza y diversidad. A continuación, después de 63 días de incubación C y T-CMC evidenciaron una disminución en riqueza y diversidad, siendo esto más notable en el microcosmos control.

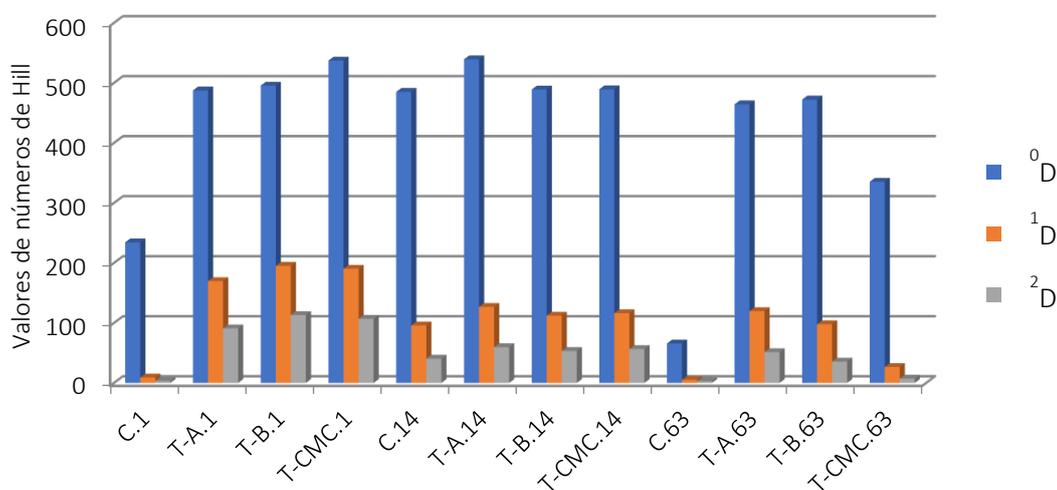


Figura IV.22. Valores de números de Hill obtenidos a través del programa EstimateS para los microcosmos C, T-A, T-B y T-CMC en los días 1, 14 y 63. El número indicado en los rótulos de cada microcosmos señala el día de incubación.

Descripción de la composición de las comunidades bacterianas a nivel de Filo

Los resultados de la pirosecuenciación revelaron en las cuatro condiciones estudiadas que todas las OTU fueron clasificadas bajo el dominio Bacteria en 15 filos (Tabla S1, en Material Suplementario). A partir de la información obtenida, pudo destacarse que los filos mayoritarios fueron Proteobacteria (40,9%-88,5%), Actinobacteria (1,0%-31,2%), Firmicutes (0,6%-10,5%), Bacteroidetes (0,7%-6,4%), Chloroflexi (0,4%-12,0%), Acidobacteria (0%-5,9%) y Gemmatimonadetes (0%-5,0%).

Inicialmente, el suelo se caracterizó principalmente por un alto porcentaje del filo Proteobacteria que superó el 80% (Figura IV.23). En menor medida se presentaron Firmicutes y Actinobacteria, entre otros que estuvieron en menos del 5%. Ya desde este momento, en los microcosmos con Triton X-100 en dosis sub-CMC se detectaron cambios en la comunidad, habiéndose obtenido una menor fracción de Proteobacteria y una mayor de Actinobacteria, cambios que se acentuaron más en el sistema donde se había aplicado el surfactante a mayor concentración (T-CMC). En este último, contrariamente a T-A y T-B, Firmicutes no pareció afectarse con respecto a lo observado en C.

Hacia el día 14 de incubación, C alcanzó una composición similar a la que también llegaron los microcosmos con el surfactante, donde se registró un leve aumento de la fracción de filos que habían estado en menor proporción inicialmente como Verrucomicrobia y Chloroflexi.

Luego de 63 días de tratamiento, el control volvió a tener una proporción de filos similar a la inicial, aunque con aún menor porcentaje de Actinobacteria. Los microcosmos con Triton X-100 a la CMC y sub-CMC se diferenciaron en su composición. En los tres casos Proteobacteria aumentó su proporción y disminuyó la fracción de Actinobacteria, cambios que se acentuaron más en T-CMC. En T-A y T-B particularmente hubo un leve incremento del filo Acidobacteria y Gemmatimonadetes que no se vio en la mayor concentración del surfactante.

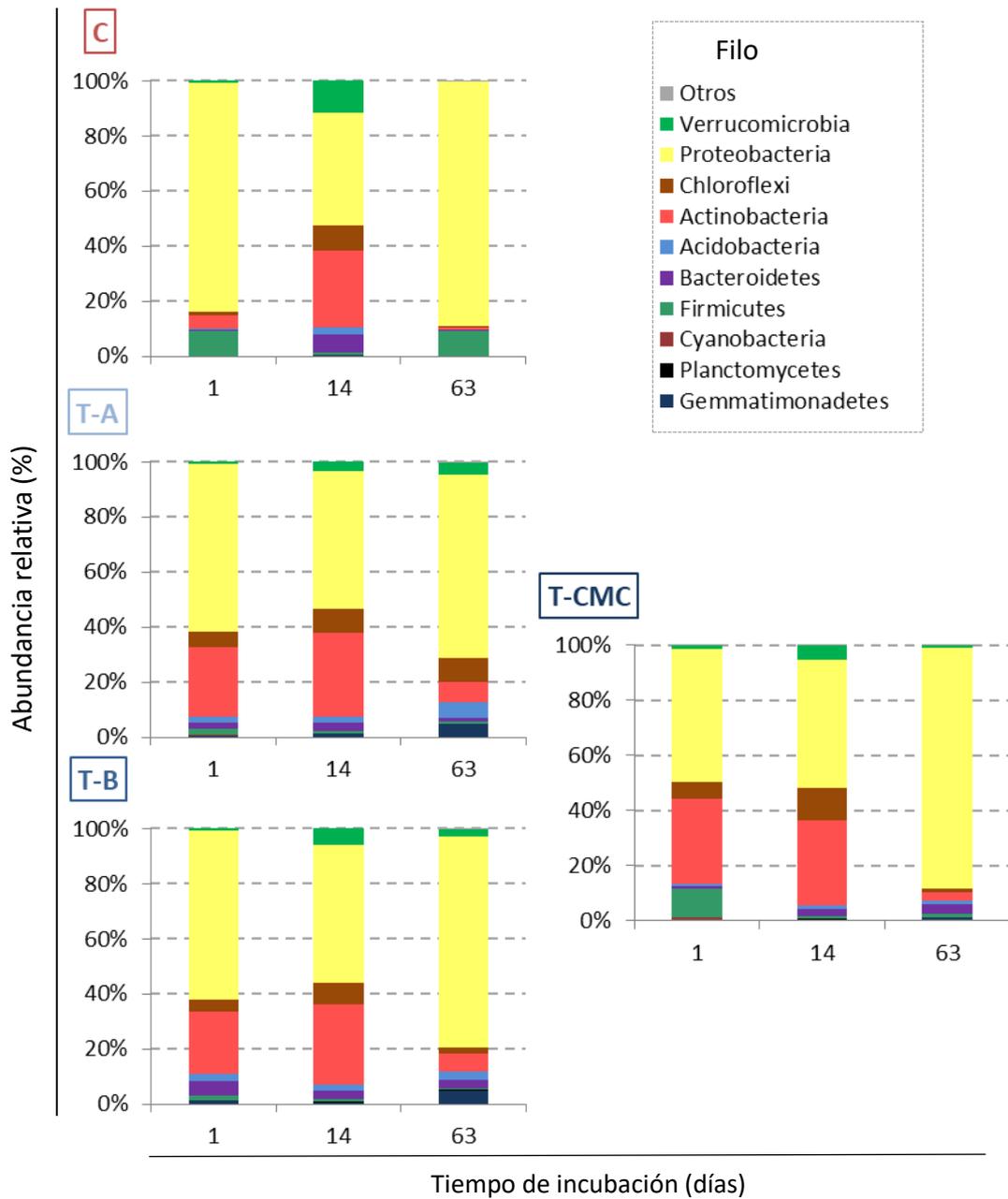


Figura IV.23. Abundancias relativas de los filos más representativos para los microcosmos analizados a los días 1, 14 y 63. Se graficaron los filos con abundancias mayores al 0,3% en al menos uno de los sistemas. Se graficaron los microcosmos C, T-A, T-B y T-CMC.

Análisis de correspondencia de las comunidades bacterianas a nivel de Orden

Con el fin de exponer las diferencias o similitudes en la estructura de la comunidad bacteriana comparando los microcosmos en estudio a nivel de Orden, se realizó un análisis de correspondencia (AC) (Figura IV.24.). El eje AC1 (eje X) logró explicar el 68% de la varianza observada y el eje AC2 (eje Y) el 17%.

El gráfico obtenido reveló que los perfiles de la comunidad del suelo del microcosmos C a los días 1 y 63 presentaron importantes diferencias con respecto a lo observado para el mismo sistema al día 14, indicando que el armado del microcosmos (homogenización, tamizado e incubación) provocó un efecto marcado pero temporal en los perfiles de la comunidad. Los perfiles de C al día 1 y 63 se encuentran a la derecha del cero en el eje AC1 y están caracterizados por la predominancia de los órdenes Bacillales y Pseudomonadales.

En el gráfico de AC, el microcosmos C después de 14 días de incubación y los sistemas tratados con surfactante al día 1 y 14 se encuentran cercanos entre sí, a la izquierda del cero en AC1 y en el cuadrante positivo de AC2 (Fig. IV.24). Estos sistemas mostraron una gran contribución de Acidimicrobiales, Actinomycetales, Cytophagales, Sphaerobacterales, Rhizobiales, Caulobacterales, Rhodospirillales y Verrucomicrobiales. A los 63 días, los microcosmos con agregado de surfactante presentaron un perfil de comunidad bacteriana considerablemente diferente del que reflejó el microcosmos C; en simultáneo, pudo verse que los perfiles de los sistemas con dosis sub-CMC se encontraron espacialmente separados de T-CMC en el eje AC2. Mientras que T-A y T-B al día 63 mostraron una alta frecuencia de secuencias pertenecientes a los órdenes Acidobacteriales, Sphingomonadales y Gemmatimonadales, el sistema T-CMC en el mismo día evidenció predominio de Xanthomonadales.

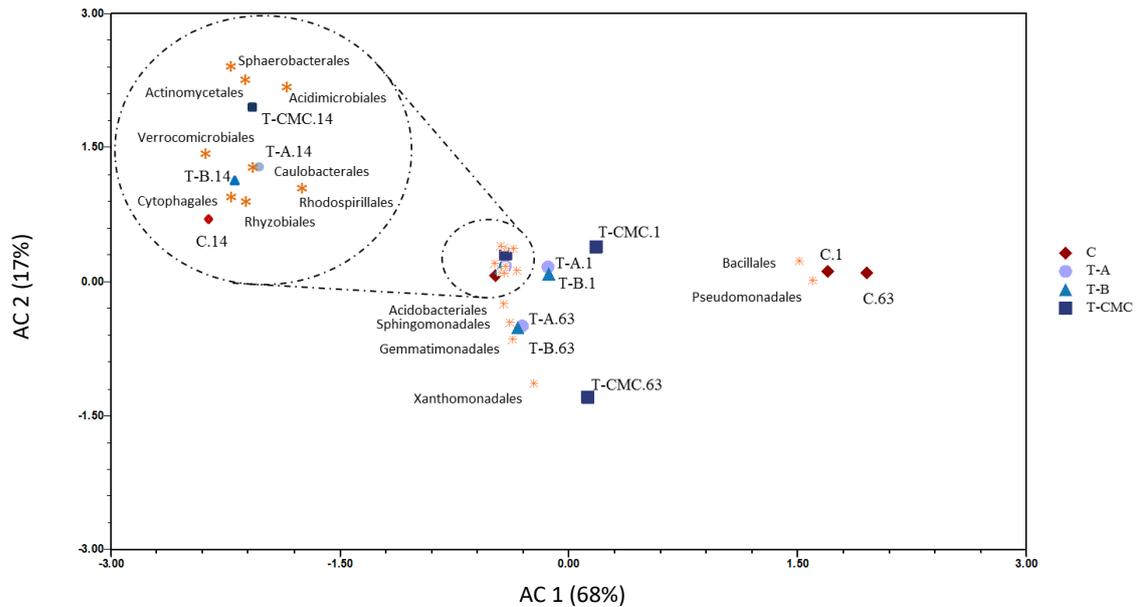


Figura IV.24. Análisis de correspondencia basado en la frecuencia relativa de los órdenes de las comunidades bacterianas en los cuatro microcosmos a los días 1, 14 y 63 de incubación. Se graficaron los órdenes con frecuencia mayor al 5% en al menos uno de los microcosmos. El número indicado en cada rótulo de los microcosmos señala el día de incubación.

Análisis de las comunidades bacterianas a nivel de Género

En la figura IV.25 se muestra el heat-map, donde puede verse el agrupamiento jerárquico resultante del análisis de los perfiles de la comunidad bacteriana a nivel de género. Se realizó basado en la frecuencia de las secuencias de los 31 géneros más abundantes (presentes en más del 3% de abundancia relativa), que cubrieron más del 70% de todas las secuencias (Tabla S3, Material Suplementario).

En dicho análisis se identificaron claramente dos grupos: el perfil bacteriano de todos los microcosmos en el tiempo inicial (día 1) formó un cluster separado de los microcosmos tratados con surfactante después del día 14 y 63 de incubación y del C al día 14. El perfil bacteriano del suelo en el microcosmos C después de 63 días fue claramente diferente a todos los demás sistemas.

Las estructuras de las comunidades bacterianas en las muestras iniciales agrupadas bajo un mismo cluster (Cl1) mostraron alta similitud, siendo caracterizadas por el predominio de los géneros *Brevundimonas*, *Nocardioides* y *Acinetobacter*; dentro de este cluster, particularmente en C se vio dominancia de *Acinetobacter* y *Bacillus*.

El otro cluster (Cl2) se conformó por dos subclusters. Uno de ellos (Sc1) agrupó a todos los microcosmos al día 14 del tratamiento, los cuales se caracterizaron por la prevalencia de *Brevundimonas*, *Nocardioides*, *Sphingomonas*, *Xanthomonas* y *Chloroflexus*, entre otros (Fig. IV.25). El segundo subcluster (Sc2) relacionó a los microcosmos tratados con surfactante al día 63, pudiéndose observar una primera rama formada por los sistemas con dosis sub-CMC (T-A y T-B) caracterizados por el predominio de *Sphingomonas*, *Novosphingobium* y *Brevundimonas*; la segunda rama incluyó a T-CMC, donde se vio prevalencia de *Stenotrophomonas*.

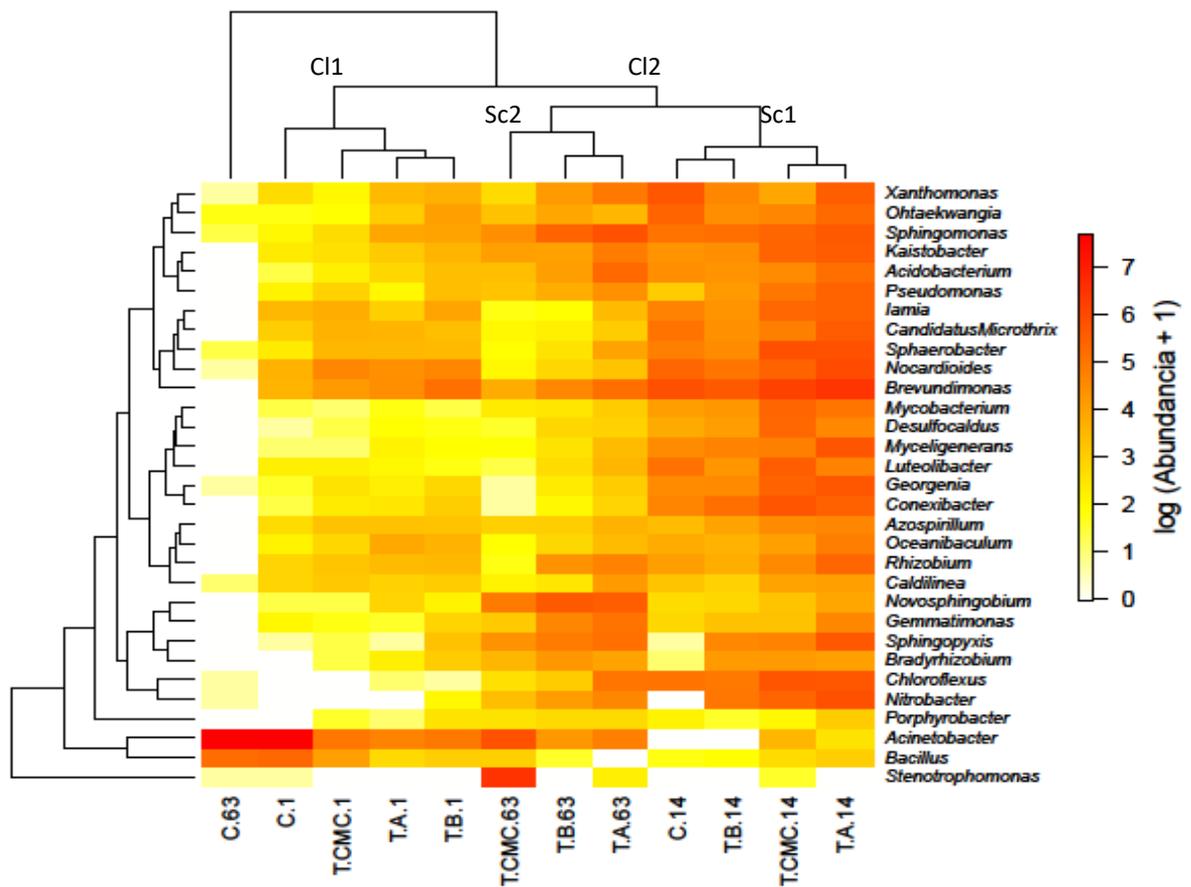


Figura IV.25. El heat-map describe la frecuencia de cada género bacteriano (variables agrupadas en el eje Y) en cada una de las muestras (agrupamiento en el eje X). Los valores en el heat-map corresponden al logaritmo de la abundancia más 1 ($\log X + 1$) de los géneros, y se encuentran representados por la intensidad del color según la leyenda que se muestra a la derecha de la figura. La distribución bacteriana entre los microcosmos se muestra en un dendrograma jerárquico doble. El agrupamiento filogenético bacteriano y la relación entre las muestras fueron determinados por distancia de Bray-Curtis. El número indicado en cada rótulo de los microcosmos señala el día de incubación.

IV.3. Discusión

Los efectos del surfactante no iónico Triton X-100 sobre la degradación y desorción de PAH por un lado y sobre la comunidad bacteriana del suelo por otro, fueron evaluados sobre un suelo crónicamente contaminado, en dosis igual a la CMC de dicho surfactante y en dosis sub-CMC.

En los microcosmos con Triton X-100 se detectó una caída en la tensión superficial de las suspensiones de suelo, significativamente mayor a la medida obtenida en el microcosmos C, que se mantuvo a lo largo del tiempo de incubación. Esto permitiría confirmar la presencia del surfactante en el suelo. La disminución de la tensión superficial de las suspensiones de suelo de los microcosmos con surfactante mostró correlación con la concentración que había sido aplicada (Figura IV.7); confirmando así que las dosis en T-A y T-B fueron sub-CMC. En el suelo existen varios componentes con estructuras anfipáticas que influyen en la tensión superficial de las suspensiones del mismo, como lo son los ácidos húmicos y fúlvicos, proteínas, ácidos grasos, biosurfactantes, como también cambios en el pH y la temperatura (Anderson y col., 1995). Es así que una disminución en la tensión superficial como la que se observó en el presente trabajo en el microcosmos control (Tabla IV.1, Figura IV.7) es factible de ocurrir tras la incubación.

Los microcosmos con dosis sub-CMC, donde la solubilización de los PAH en micelas habría sido despreciable, fueron los únicos en los que se llegó a registrar menores concentraciones de PAH sorbidos con respecto a C (Figura IV.8). Asimismo en estos sistemas se obtuvo una mayor recuperación de fluoróforos asociados a la familia de compuestos de los PAH (Figura IV.14), por lo que puede sugerirse que las dosis sub-CMC mostraron una mayor desorción de PAH con respecto a C y T-CMC. Debe destacarse que en dosis por debajo de la CMC, la tasa de desorción de PAH desde un geosorbente podría aumentar a través de una modificación directa de la matriz del contaminante (Adrion y col., 2016). Incluso Yeom y colaboradores (1996), hallaron que los surfactantes estimularon la liberación de PAH de un suelo estudiado principalmente por aumento de difusividades de la matriz, mientras que la liberación por solubilización en la pseudofase micelar jugó un rol secundario. Los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían avalar dicha hipótesis basándonos en que las matrices de excitación-emisión de los

extractos alcalinos de los microcosmos con el surfactante (IV.14) evidenciaron cambios en la solubilización de especies fluoróforas con respecto al control. Adicionalmente, en el microcosmos T-CMC, donde la mayoría de las moléculas del surfactante estarían agregadas en micelas, la concentración de PAH sorbidos no presentó diferencias significativas con el control (Figura IV.10).

En concordancia con la mayor desorción de PAH, los microcosmos T-A y T-B, fueron los únicos que se diferenciaron de C en cuanto a la degradación de dichos hidrocarburos, habiendo presentado al día 42 de incubación menor concentración remanente de PAH. Sin embargo, la cuantificación de cada PAH de forma individual mostró menores concentraciones de distintos PAH con respecto al microcosmos C en los tres microcosmos con Triton X-100. Mientras que en los microcosmos con dosis sub-CMC tanto los PAH de bajo como de alto peso molecular presentaron niveles remanentes menores que en el microcosmos C, en T-CMC únicamente disminuyeron los de alto peso molecular.

Adicionalmente a la movilización de compuestos hidrofóbicos sorbidos a la matriz del suelo, los surfactantes pueden influir en la actividad degradadora de PAH de la comunidad microbiana endógena en un ambiente contaminado (Makkar y Rockne, 2003). A pesar de que ha habido pocos intentos de evaluar los cambios en las comunidades microbianas del suelo provocados por la aplicación de surfactantes, se ha encontrado evidencia sobre una posible contribución biológica al mejoramiento de la degradación de PAH (Singleton y col., 2016). Los resultados aquí analizados, mostraron que la estructura y dinámica de la comunidad bacteriana fueron notablemente diferentes entre los microcosmos C, T-CMC y los que fueron tratados con dosis sub-CMC, habiéndose notado esto tanto a nivel cultivable (Figuras IV.4, IV.17 y IV.18) como a través de técnicas moleculares (Figuras IV.5, IV.24, IV.25). En consistencia con el efecto estimulador en la degradación de PAH en los microcosmos con dosis sub-CMC observado después de 42 días de incubación (Figura IV.8), la abundancia relativa de genes PAH-RHD α GN (Figura IV.20) indicó un aumento en el potencial biodegradador de PAH de la comunidad. Si bien esta técnica molecular se encuentra limitada por la utilización de primers específicos diseñados para una determinada población, permitió

registrar resultados similares a los obtenidos en la cuantificación de bacterias degradadoras de PAH por la técnica del NMP dependiente de cultivo.

Las diferencias observadas en las comunidades bacterianas podrían haber llevado al variado perfil de degradación de distintos PAH registrado al día 42 (Figura IV.10). En estudios anteriores de bioestimulación con surfactantes (Adrion y col., 2016; Zhu y Aitken, 2010), el impacto de estos químicos sobre la comunidad microbiana se ha atribuido como probable causa de las diferencias en la degradación de PAH.

En el microcosmos C el armado del sistema y las condiciones de incubación produjeron un aumento en la riqueza y diversidad de la comunidad bacteriana (Figura IV.22) seguido por una disminución brusca de dichos parámetros. Thomson y col. (2010), usando técnicas moleculares (T-RFLP), encontraron en el estudio de un suelo que el método de tamización-homogeneización había alterado significativamente la estructura de la comunidad bacteriana. En el suelo crónicamente contaminado que ensayamos, los PAH inaccesibles atrapados en los agregados del suelo podrían haber sido expuestos a la microbiota nativa por la tamización. En concordancia, los resultados analíticos mostraron que inmediatamente después del armado de los microcosmos, la fracción BDP de PAH representó una proporción mayoritaria (60%, Figura IV.8) que fue rápidamente degradada (7 días) por una comunidad microbiana altamente seleccionada por la historia en la contaminación (Figuras IV.24 y IV.25). Se han encontrado especies capaces de degradar hidrocarburos dentro de los géneros *Acinetobacter* y *Bacillus* (Das y Mukherjee, 2007; Golby y col., 2012), que dominaron ampliamente en el microcosmos C al principio del período de incubación.

Los HAF, al igual que los PAH, presentaron inicialmente un alto porcentaje de degradación en todos los sistemas en estudio, aunque destacándose un efecto negativo en el microcosmos T-CMC con respecto al control. La presencia del surfactante sintético en alta concentración, cuya molécula presenta una cadena hidrocarbonada alifática, podría haber estimulado el crecimiento de la población bacteriana degradadora de HAF (Figuras IV.4 y IV.10) al encontrarse disponible como posible fuente de carbono en un suelo crónico, llevando a la competencia entre sustratos de estructura similar. Con el transcurso del tiempo de incubación este efecto se revirtió, observándose la estimulación en la degradación de HAF con respecto al control, en primer lugar, en T-

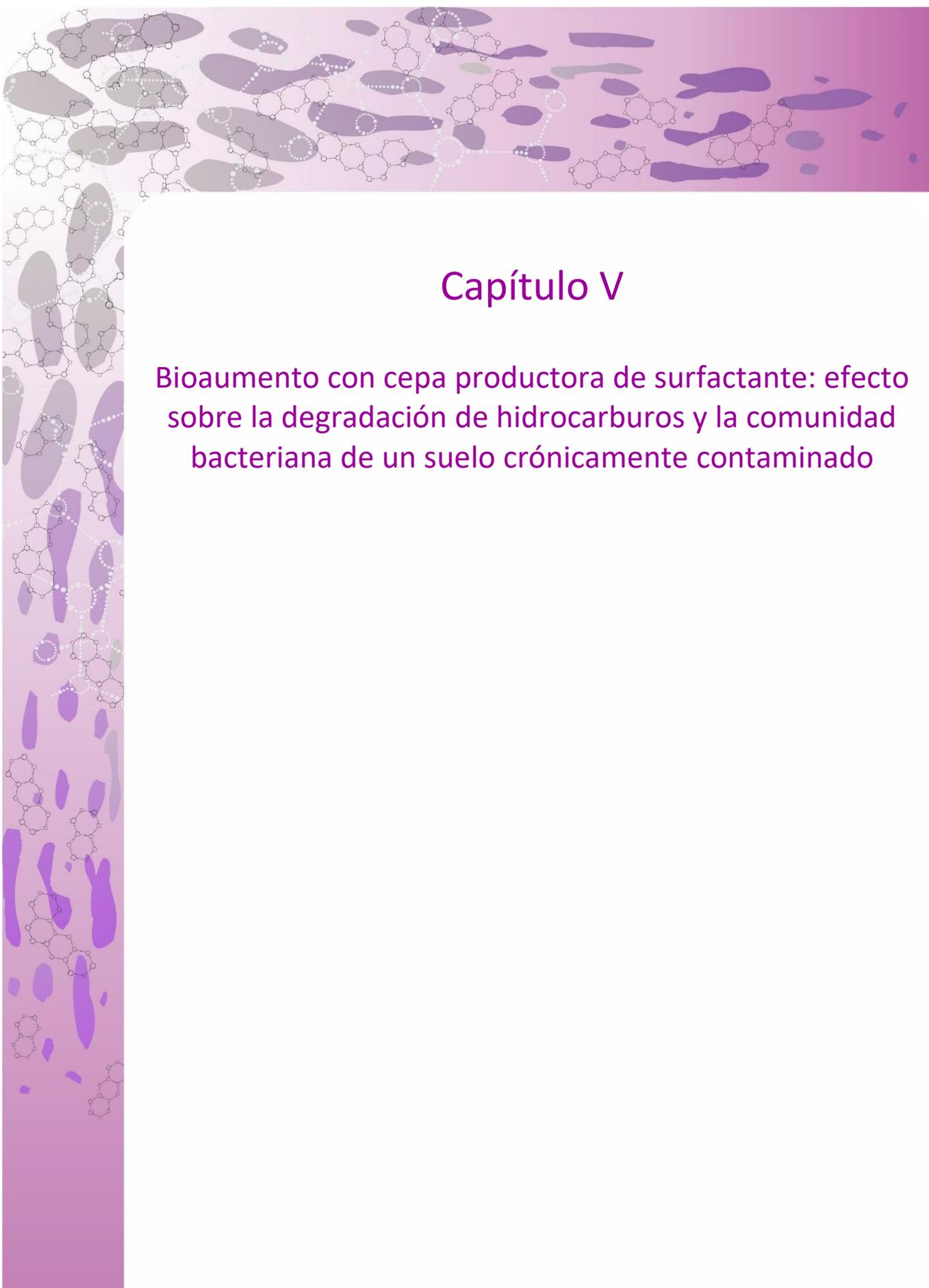
CMC a los 30 días y posteriormente a los 63 días en las dosis sub-CMC (Figura IV.10). Estos resultados podrían explicarse, en parte, por la estimulación sobre la población de bacterias degradadoras de HAF con respecto a C y, por otra parte, por el posible efecto de la solubilización de estos hidrocarburos por acción del Triton X.100. El análisis de las familias de especies de fluoróforos de las MEEF permitió demostrar que este surfactante produce cambios en la matriz del suelo, independientemente de la contaminación o no que pueda haber sufrido, reflejados en la solubilización de distintos fluoróforos (Figuras IV.13 y IV.14). Esta observación, podría ser otra de las causas que habría estimulado la degradación de HAF en los microcosmos tratados con Triton X-100.

La adición del surfactante en cualquiera de las concentraciones estudiadas generó, con respecto al microcosmos control, cambios importantes en la dinámica de la comunidad bacteriana del suelo (Figuras IV.22 y IV.25); dichos cambios se reflejaron al día 63, donde las comunidades bacterianas de los sistemas tratados con Triton X-100 mostraron diferencias notables con C a nivel de diversidad (Figura IV.22) y de composición (Figura IV.25). Incluso entre el día 14 y 63 de incubación el perfil de la comunidad bacteriana del suelo en T-CMC difirió de los microcosmos con dosis sub-CMC (Figuras IV.24 y IV.25), habiéndose observado en simultáneo diferencias en la degradación de PAH (Figura IV.8).

Particularmente al día 63 de tratamiento los perfiles de la comunidad bacteriana de T-A y T-B mostraron predominio de los órdenes Sphingomonadales, Acidobacteriales y Gemmatimonadales (Figura IV.25). Sphingomonadales, principalmente representado por los géneros *Sphingomonas* y *Novosphingobium* (Figura IV.25, Tabla S3 en Material Suplementario), ha sido señalado como un cluster fundamental en la degradación de PAH (Bastida y col., 2016; Festa y col., 2016). Por otra parte, Jiang y col. (2015) usando isótopos estables de ADN (DNA-SIP, del inglés *DNA-Stable Isotope Probing*), demostraron que bacterias relacionadas con *Acidobacterium* fueron vinculadas con degradación de PAH. A pesar de que el grupo Gemmatimonadetes fue recientemente descrito y ha tenido pocos representantes cultivables, algunos estudios han mostrado que el desarrollo de este filo ha sido promovido en suelos contaminados con PAH (Tejada-Agredano y col., 2013; Muangchinda y col., 2015).

La comunidad bacteriana del microcosmos T-CMC después de 63 días de incubación fue caracterizada por una disminución de la riqueza e índice de diversidad comparada con T-A y T-B (Figura IV.22), con un destacable predominio del orden Xanthomonadales (Figura IV.25), representado principalmente por el género *Stenotrophomonas*. En otros estudios se han descrito efectos inhibitorios de los surfactantes no-iónicos en la degradación microbiana de PAH a concentraciones superiores a la CMC (Lladó y col., 2015; Singleton y col., 2016), lo que podría deberse a una interacción fisiológica entre las micelas y las paredes celulares, provocando la disrupción de la estructura de lamelar de la membrana (Laha y Luthy, 1991). Por otro lado, cepas del género *Stenotrophomonas* han sido reportadas como bacterias degradadoras de PAH (Bautista y col., 2009) e incluso de Triton X-100 (Chen y col., 2004). El aumento en la tensión superficial observado en el microcosmos T-CMC a los 63 días de incubación (Figura IV.8) y la estimación de la concentración de los distintos tipos de picos de Triton X-100 identificados (Tabla V.2) sugieren la degradación de Triton X-100 por una comunidad bacteriana altamente seleccionada, implicando un impacto negativo sobre la biodegradación de PAH.

En este capítulo se demostró que la adición de Triton X-100 sobre un suelo crónicamente contaminado aceleró la biodegradación de PAH sólo en dosis sub-CMC. Resultados similares fueron estudiados por Singleton y col. (2016) en un biorreactor de suelo con el agregado de otro surfactante no-iónico (Brij 30). En los microcosmos estudiados en el presente capítulo, prestando atención a las concentraciones alcanzadas de cada PAH identificado, pudo notarse que únicamente el sistema tratado con la menor concentración de Triton X-100 (T-A) alcanzó niveles que se aproximaron a los límites de calidad de suelo de uso industrial. La combinación de las determinaciones químicas de las proporciones sorbidas y biodisponibles de PAH y el uso de pirosecuenciación, una herramienta poderosa para analizar comunidades microbianas complejas, nos ha permitido obtener evidencias sólidas de la contribución de factores fisicoquímicos y biológicos a los diferentes comportamientos en los microcosmos estudiados. De esta forma, constituye una contribución significativa a la optimización de las estrategias de mejoramiento de biorremediación utilizando surfactantes.



Capítulo V

Bioaumentación con cepa productora de surfactante: efecto sobre la degradación de hidrocarburos y la comunidad bacteriana de un suelo crónicamente contaminado

V. Bioaumentación con cepa productora de surfactante: efecto sobre la degradación de hidrocarburos y la comunidad bacteriana de un suelo crónicamente contaminado

Los microorganismos, debido a su amplia biodiversidad y gran potencial catabólico, se han convertido en una herramienta atractiva para la remediación de suelos contaminados. En aquellos casos de contaminación puntual o de compuestos recalcitrantes, puede ser necesaria la inoculación de poblaciones alóctonas, con capacidades especializadas, para posibilitar la degradación de los contaminantes existentes, técnica conocida como bioaumentación (Lladó, 2012). La aplicación de microorganismos degradadores de hidrocarburos en simultáneo con productores de biosurfactantes o incluso microorganismos con ambas propiedades, brindaría una doble ventaja, donde los biosurfactantes podrían aumentar la biodisponibilidad de los sustratos hidrofóbicos y modificar la hidrofobicidad de la membrana celular, lo que permitiría a las bacterias degradadoras interactuar libremente con el contaminante (Megharaj y col., 2011; Lim y col., 2016).

El biosurfactante lipopeptídico surfactina, producido por cepas de *Bacillus subtilis*, se ha estudiado en varios trabajos (Moran y col., 2000; Lai y col., 2009; de França y col., 2015; Mnif y col., 2017). Si bien se ha comprobado la efectiva capacidad de este bioproducto en la remoción de hidrocarburos tanto en soluciones acuosas como en sistemas batch de suelos contaminados, poco se conoce sobre el efecto de la surfactina producida *in situ*, estrategia que permitiría reducir los costos de potenciales tratamientos con biosurfactantes sobre suelos contaminados.

En este capítulo se evaluó el impacto del bioaumentación con una cepa capaz de producir surfactina sobre la degradación de hidrocarburos y la comunidad bacteriana de un suelo crónicamente contaminado. El efecto de esta estrategia se ensayó sobre la biorremediación por atenuación natural y adicionalmente, sobre el bioaumentación con una cepa degradadora de hidrocarburos policíclicos aromáticos. Asimismo, se comparó con el impacto generado por el surfactante sintético Triton X-100.

El suelo utilizado en esta instancia provino de reservorios de una industria petrolera de la provincia de Mendoza. Se trata de un suelo crónicamente contaminado

de textura franco-arenosa (78% arena) y de naturaleza salina (CE= 4 mS/cm). En el laboratorio, fue contaminado con fluoreno (FLU), fenantreno (FEN), antraceno (ANT) y pireno (PIR) durante 3 meses. Luego de 3 meses sin otra intervención, se procedió al armado de los microcosmos.

V.1. Caracterización de las cepas utilizadas en la estrategia de bioaumentación: determinación de tensión superficial y degradación de fenantreno

Una de las cepas utilizadas para la realización de los ensayos de bioaumentación fue *Bacillus subtilis* NCIB3610 (B *srf*+), capaz de producir el biosurfactante surfactina, de naturaleza lipopeptídica, que interviene en la formación de biofilm y en la movilidad sobre superficies (Kearns y col., 2003; McLoon y col., 2011). Como control para evaluar el efecto causado por la cepa, no atribuible a la producción de biosurfactante, se utilizó una cepa mutante *Bacillus subtilis* NCIB3610 *srf*- (B *srf*-), que tiene una delección en el primer gen del operón que codifica para surfactina, con la inserción de un gen de resistencia a cloranfenicol, por lo que no produce el biosurfactante y es resistente a dicho antibiótico (5 µg/ml). Ambas cepas de *Bacillus* fueron provistas por el Dr. Roberto Grau, investigador de la Facultad de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de Rosario (Santa Fé). La figura V.1 muestra las colonias características de estas cepas en medio R3A. La cepa productora de surfactina genera colonias grandes, blancas, de aspecto mucoso y borde irregular, mientras que las colonias de la cepa mutante son igualmente blancas con aspecto mucoso, pero de contorno más definido y tamaño levemente menor.

En esta sección, se evaluó la capacidad de ambas cepas de producir biosurfactante (BioS) mediante la medida de tensión superficial (TS) del sobrenadante de medios de cultivo, y la capacidad de crecer en fenantreno como única fuente de carbono y energía.

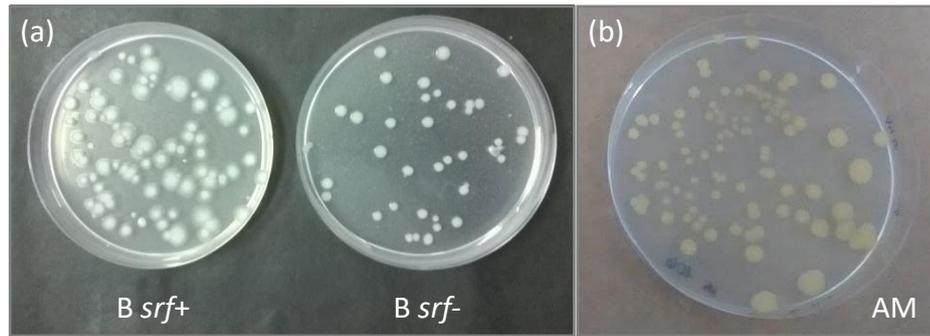


Figura V.1. Desarrollo de colonias en R3A de (a) las cepas *Bacillus subtilis* NCIB3610, su mutante *Bacillus subtilis* NCIB3610 *srf-* y (b) *Sphingobium* sp. AM.

Adicionalmente, se realizaron estos ensayos para la cepa degradadora de fenantreno *Sphingobium* sp. AM (AM), utilizada en los microcosmos como bioaumentado combinado tanto con el tratamiento con el surfactante sintético como con la inoculación de las dos cepas de *Bacillus*. La cepa AM fue aislada de un consorcio bacteriano degradador de fenantreno obtenido de un suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos, situado en los alrededores de la ciudad de La Plata (Festa y col., 2013). AM evidenció la capacidad de utilizar fenantreno como única fuente de carbono y energía en MML suplementado con dicho PAH, logrando una degradación del $87,4 \pm 4,0\%$ a los 7 días de incubación, acompañada de la coloración del medio por la formación de intermediarios de degradación (Festa y col., 2013). En medio de cultivo R3A el desarrollo de AM genera colonias amarillas de tamaño pequeño a mediano y de contorno definido (Figura V.1).

Se llevó a cabo la medida de tensión superficial de sobrenadantes de los cultivos de las cepas *B srf+*, *B srf-* y AM luego de 24 hs de incubación en caldo LB suplementado con glucosa al 1%. El suplemento de glucosa permite disminuir la tasa de esporulación. La cepa PAO-1 (Pearson y col., 1997) conocida productora de BioS se utilizó como control de la disminución de la TS por la producción del mismo. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla V.1.

En el medio LB, medio complejo y nutricionalmente rico, PAO-1 generó una importante caída de la tensión superficial del medio luego de 24 hs de incubación confirmando la producción del biosurfactante. *B srf+* produjo una disminución de TS

significativamente mayor ($P < 0,05$) que la producida por la cepa PAO-1, evidenciando también su capacidad de generar un BioS. *Sphingobium* sp AM provocó una disminución de TS significativa ($P < 0,05$) con respecto al control, aunque en menor medida que B *srf+* y PAO-1. En el cultivo de la cepa mutante de *Bacillus subtilis* NCIB3610, la TS fue comparable a la del control sin inocular.

Tabla V.1. Medidas de tensión superficial (mN/m) de sobrenadantes de cultivos de las cepas: AM, PAO-1, B *srf+* y B *srf-*. Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 24 hs.

Cultivos	LB/glc 1%*
Control	52,8 ± 0,8 ^a
B <i>srf-</i>	50 ± 2 ^a
AM	46,1 ± 0,9 ^b
PAO-1	34,9 ± 0,3 ^c
B <i>srf+</i>	30,4 ± 0,2 ^d

*El suplemento de glucosa disminuye la tasa de esporulación.
Las letras en superíndice diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Una vez comprobada la producción de surfactina y su liberación al medio, se utilizó un medio de cultivo mínimo con 200 mg/kg de fenantreno (MML/FEN), PAH modelo, para evaluar la capacidad de las cepas de *Bacillus* y AM de crecer en dicho PAH como única fuente de carbono y energía y de producir BioS. Al cabo de 7 días de incubación se registró:

- la medida de tensión superficial,
- la evidencia cualitativa de degradación de fenantreno por coloración del medio,
- y el desarrollo de colonias características en medio R3A.

En el sobrenadante del medio de cultivo sin inocular se obtuvo una tensión superficial de 63,2 mN/m y similares valores se midieron en los cultivos puros de AM, B *srf+* y B *srf-*: 61,4 mN/m, 62,2 mN/m y 62,6 mN/m respectivamente.

Los cultivos de AM presentaron coloración por la generación de intermediarios de la degradación del fenantreno y luego de inocular una alícuota de este cultivo en

placas de R3A, se observó el desarrollo de colonias amarillas características de esta cepa. En los cultivos de los *Bacillus* no se evidenció desarrollo alguno de colonias y tampoco se observó coloración del medio, demostrando que no tienen la capacidad de crecer en fenantreno como única fuente de carbono y energía.

V.2. Caracterización de co-cultivos de las cepas utilizadas en el bioaumentación

A continuación, con el objetivo de estudiar la interacción de AM con la cepa productora de BioS en la degradación de fenantreno, se realizaron co-cultivos de ambas cepas en MML/FEN. Como control de los efectos que pudieran no ser generados por el BioS, se realizó el co-cultivo de la cepa B *srf*⁻ con AM. Adicionalmente, estos co-cultivos se reiteraron en MML/FEN suplementado con peptona al 0,3% y 0,5% p/v. Al cabo de 7 días de incubación a 30°C, se registró:

- la medida de tensión superficial,
- la coloración del medio,
- el porcentaje de fenantreno remanente,
- y el desarrollo de colonias características en medio R3A.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla V.2. En los co-cultivos de AM con B *srf*⁺ por un lado y con B *srf*⁻ por el otro en MML/FEN, no se observó disminución de la TS, y únicamente desarrollaron colonias amarillas en R3A. Ambos co-cultivos presentaron coloración del medio, indicando la presencia de intermediarios de degradación del FEN (Figura V.2). Mientras se conoce que AM en MML/FEN alcanza una degradación del 87 ± 4% (Festa y col., 2013), en el caso de los co-cultivos AM+B *srf*⁺ y AM+B *srf*⁻, pudo detectarse un efecto negativo en el porcentaje de degradación alcanzado (Tabla V.2).

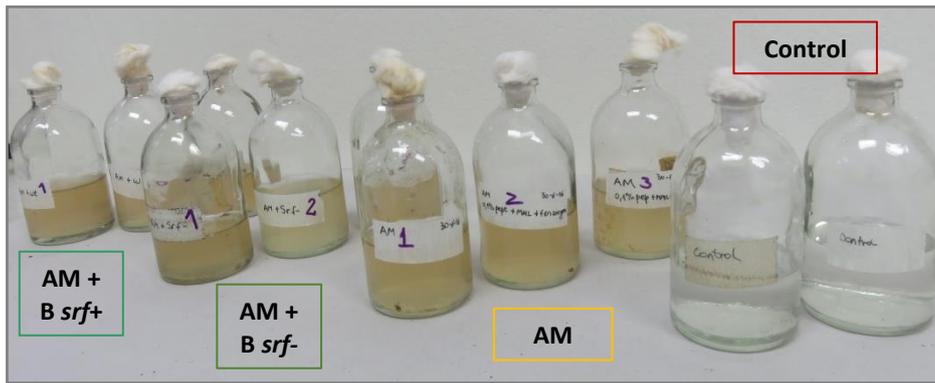


Figura V.2. Ensayos en MML con 200 mg/L de fenantreno inoculado con los co-cultivos AM+B *srf+* y AM+B *srf-* junto con los controles sin inocular e inoculado con AM. El cambio de color con respecto al control se debe a la generación de intermediarios de la degradación del fenantreno.

En los co-cultivos incubados en MML/FEN con peptona en 0,5% p/v como fuente adicional de carbono y energía, al cabo de 7 días de incubación y de manera opuesta a lo observado en ausencia de peptona, no fue posible recuperar colonias amarillas y se obtuvo desarrollo únicamente de colonias blancas en R3A (Tabla V.2). En contraste con la medida de TS del medio control de 63,2 mN/m, AM+B *srf+* evidenció un valor significativamente menor ($P < 0,05$) mientras que tanto en los cultivos de AM (56,4 mN/m) como AM+B *srf-* sólo hubo un leve descenso de la TS. La eliminación de fenantreno en AM+B *srf+* y AM+B *srf-* no fue significativa, por lo cual no se continuaron los estudios bajo esta condición.

En la condición intermedia, con un suplemento de peptona en 0,3% p/v en MML/FEN, en ambos co-cultivos ensayados de AM+B *srf+* y AM+B *srf-* lograron recuperarse colonias amarillas y blancas características de cada cepa inoculada en R3A. En los controles de cultivos puros de ambos *Bacillus* en el mismo medio, si bien no se observó degradación de fenantreno, se recuperaron las colonias características. En el ensayo con AM+B *srf+* se produjo una disminución significativa de la tensión superficial con respecto al medio de cultivo control ($P < 0,05$) y un efecto estimulador sobre la degradación de fenantreno, alcanzándose un porcentaje mayor ($99,5 \pm 0,4\%$) y significativamente diferente ($P < 0,05$) al correspondiente al cultivo puro de AM en este mismo medio ($95 \pm 3\%$ de degradación) (Tabla V.2). Por otra parte, en AM+B *srf-* no se observó descenso de la tensión superficial y se registró un impacto negativo en la

eliminación del PAH con respecto al comportamiento de los cultivos puros de AM en MML/FEN con 0,3% peptona.

Tabla V.2. Ensayos realizados en MML/FEN (200 mg/L de fenantreno) sin peptona y suplementado con peptona en 0,3% y 0,5% p/v, inoculando las mezclas de AM+B *srf+* y AM+B *srf-* durante 7 días a 30°C.

Medio de cultivo	Ensayos	AM+B <i>srf+</i>	AM+B <i>srf-</i>
MML/FEN	Tensión superficial (mN/m)	59,2 ± 0,2 ^a	60 ± 3 ^a
	% degradación FEN	57,6 ± 0,7 ^a	62 ± 12 ^a
	Colonias amarillas	+	+
	Colonias blancas	-	-
MML/FEN/0,3% peptona p/v	Tensión superficial (mN/m)	46 ± 5 ^b	61 ± 3 ^a
	% degradación FEN	99,5 ± 0,4 ^a	73 ± 1 ^b
	Colonias amarillas	+	+
	Colonias blancas	+	+
MML/FEN/0,5% peptona p/v	Tensión superficial (mN/m)	33,9	50,4
	% degradación FEN	14,2	0
	Colonias amarillas	-	-
	Colonias blancas	+	+

Las determinaciones se realizaron por triplicados con excepción de los cultivos con peptona en 0,5% p/v.

Los superíndices iguales indican que los valores no difieren significativamente (P>0,05).

V.3. Ensayos de bioaumentación en microcosmos de suelo crónicamente contaminado

El armado de los microcosmos se planteó teniendo en cuenta los siguientes tratamientos:

- Monitoreo de atenuación natural: microcosmos m-C
- Inoculación con *Bacillus subtilis* NCIB3610: microcosmos m-B *srf*⁺
- Inoculación con *Bacillus subtilis* NCIB3610 *srf*⁻: microcosmos m-B *srf*⁻
- Inoculación con *Sphingobium* sp. AM: microcosmos m-AM
- Inoculación con AM + *Bacillus subtilis* NCIB3610: microcosmos m-AM+B *srf*⁺
- Inoculación con AM + *Bacillus subtilis* NCIB3610 *srf*⁻: microcosmos m-AM+B *srf*⁻
- Tratamiento con Triton X-100: microcosmos m-T
- Inoculación con AM y tratamiento con Triton X-100: microcosmos m-AM/T

En los casos m-B *srf*⁺, m-B *srf*⁻, m-AM y m-AM/T, cada microcosmos se inoculó con 1×10^8 UFC/g de suelo seco de la cepa correspondiente. Las co-inoculaciones se llevaron a cabo de forma de obtener en los microcosmos $0,5 \times 10^8$ UFC/g de suelo seco de cada una de las cepas co-inoculadas. El surfactante Triton X-100 fue agregado a la CMC correspondiente a este suelo, equivalente a 19 mg/g de suelo seco (Figura S.2, en Material Suplementario).

En la figura V.3 se muestra la fotografía en el momento en que se inoculaban los microcosmos m-B *srf*⁺ y m-AM/T. En el segundo caso (Figura V.3b) pudo observarse el efecto del surfactante sintético sobre la suspensión de células que se inoculó gota a gota, donde la disminución de la tensión interfacial y superficial se evidenció al impedir que la gota quedara formada sobre la superficie como en m-B *srf*⁺ (Figura V.3a).

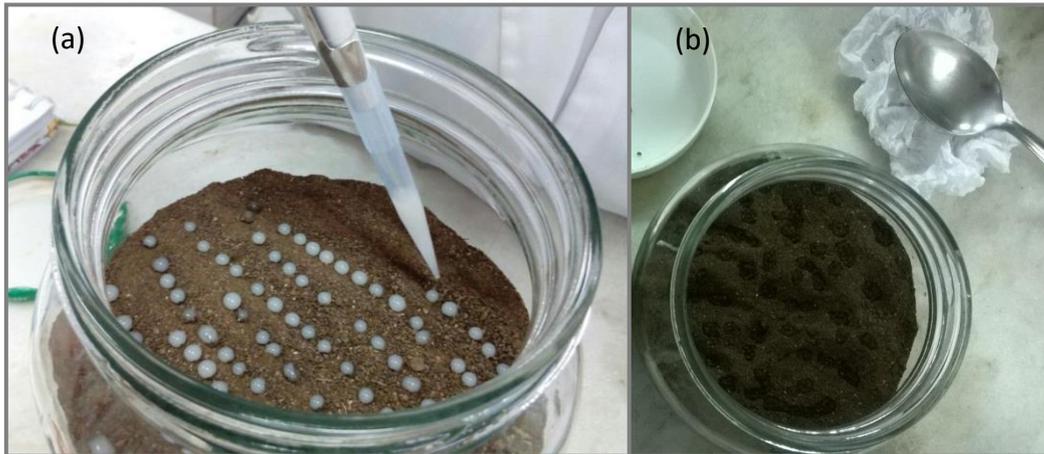


Figura V.3. Fotografía durante la inoculación del microcosmos (a) m-B *srf+* y (b) m-AM/T.

V.3.1. Efecto en la tensión superficial

Se determinó la tensión superficial de suspensiones de suelo de los microcosmos estudiados a los distintos tiempos de muestreo. En la figura V.4 se pudo observar que el suelo control no presentó cambios en la TS a lo largo del período de incubación. El seguimiento de la TS mostró cómo la adición de Triton X-100 generó una considerable disminución de la TS en los sistemas m-T y m-AM/T con respecto al control ($P < 0,05$) y a los demás microcosmos inoculados. Este comportamiento se mantuvo a lo largo de los 85 días de incubación, sin observarse cambios entre las medidas de los microcosmos con el surfactante sintético.

En el caso de los sistemas que no fueron tratados con surfactante, únicamente al día inicial el sistema m-AM+B *srf+* fue significativamente diferente ($P < 0,05$) a m-C. Luego, con el transcurso del tiempo se fue igualando a las restantes condiciones y todas se mantuvieron constantes hasta el final del monitoreo.

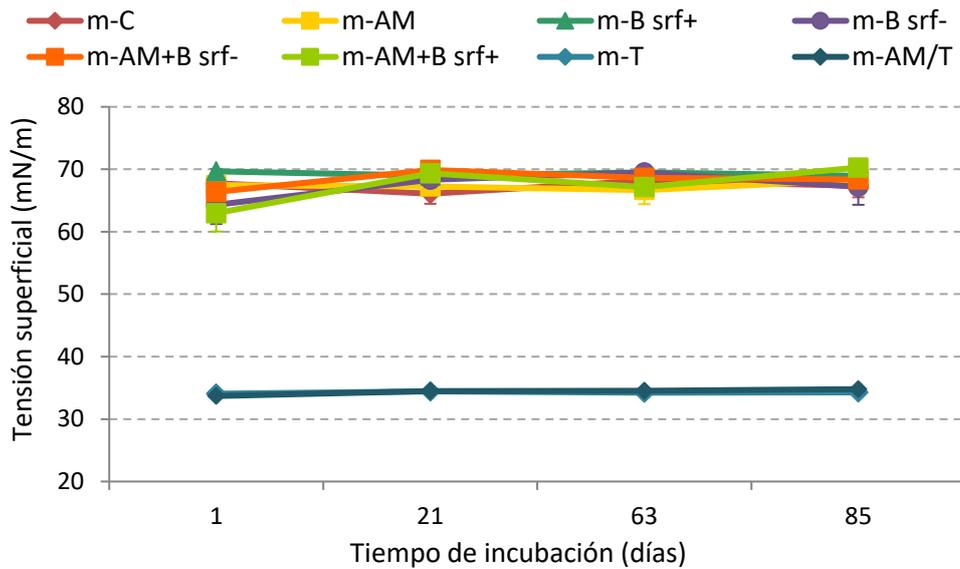


Figura V.4. Seguimiento de la tensión superficial (mN/m) en cada microcosmos durante 85 días de incubación. Se graficaron promedios de triplicados con sus respectivas desviaciones estándar (barras).

V.3.2. Desorción y biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos

Durante el período de incubación, se tomaron muestras de cada microcosmos por triplicado para la determinación de la concentración total de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) a los días 1, 21, 63 y 85. Para los días 1, 21 y 63 se determinó la fracción biodisponible (BDP) de PAH mediante extracción con la resina Amberlite XAD-2.

La figura V.5 muestra las fracciones sorbidas y BDP de la suma de los PAH identificados por GC-FID al día 1, 21 y 63. Durante los primeros 63 días, la concentración total de PAH en el microcosmos m-C disminuyó un 12% y los restantes tratamientos no se diferenciaron significativamente de dicho porcentaje ($P > 0,05$). La determinación de la fracción sorbida evidenció un porcentaje de PAH biodisponibles superior al 90% en todos los microcosmos desde el comienzo. Con el transcurso del tiempo, pudo observarse que la fracción sorbida al suelo presentó cierta tendencia a aumentar en m-C, m-AM y m-B *srf*⁻, disminuyendo significativamente ($P < 0,05$) las proporciones de los PAH BDP al día 63 con respecto a los valores iniciales. Asimismo, dentro de este grupo de microcosmos, en m-B *srf*⁻ se registró la menor fracción sorbida de PAH, seguido en mayor medida por m-AM y luego por m-C.

Los microcosmos tratados con el surfactante sintético y los inoculados con la cepa productora de surfactina mantuvieron altos porcentajes de BDP que no se diferenciaron significativamente entre sí ($P > 0,05$). Cabe destacar que el sistema m-AM+B *srf*⁻ mantuvo valores de PAH sorbidos comparables a los registrados inicialmente.

Después de 85 días de tratamiento, la repetición de la extracción de hidrocarburos no permitió detectar cambios en la concentración residual de PAH con respecto al día 63. Teniendo en cuenta esta limitación en la degradación, que más del 90% de los PAH se encontraba BDP y la relación C/N/P del suelo en estudio (100/6/0,14), a los 180 días de incubación se adicionó el fertilizante Nitrofoska® (NPK) en todos los microcosmos alcanzándose una relación 100/10/2, recomendada como guía para estimular la actividad microbiana nativa (Wu y col., 2016).

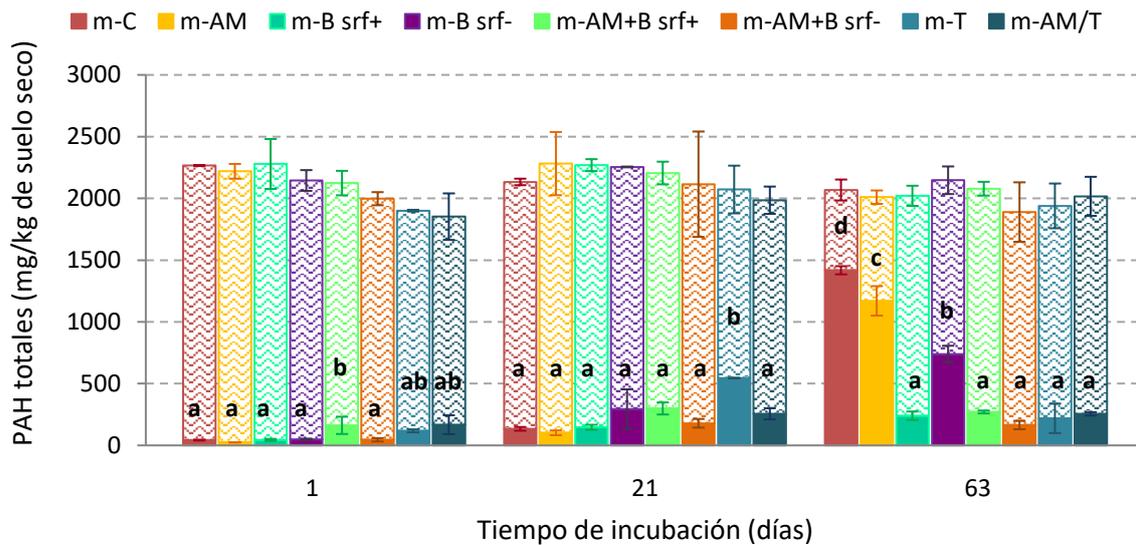


Figura V.5. Concentración (mg/kg de suelo seco) de la suma de los PAH identificados por GC-FID (columna entera) a los días 1, 28 y 63. Se diferenciaron las fracciones biodisponibles (columna texturada) de las sorbidas a la matriz del suelo (columnas lisas). Se graficaron promedios de triplicados con su respectiva desviación estándar (barras). Las letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre microcosmos en la fracción sorbida a un mismo tiempo de incubación.

En la figura V.6 se graficó el porcentaje de degradación de PAH a lo largo del período de incubación para cada una de las condiciones estudiadas. Luego de 180 días

de incubación, momento previo a la adición de NPK, únicamente el microcosmos m-AM presentó diferencias significativas con el control, evidenciando un 43% de degradación. Las otras condiciones en estudio no presentaron diferencias significativas con m-C ($P > 0,05$).

Después de 28 días del tratamiento con el fertilizante se analizaron nuevamente los PAH totales y el porcentaje de degradación de los mismos se expuso en la figura V.6. En esta instancia, pudo registrarse un aumento significativo en el porcentaje de degradación de m-C con respecto al registrado al día 21 ($P < 0,05$). Se evidenció una continuidad en la degradación en los microcosmos inoculados con AM sin y con Triton X-100, siendo en ambos significativamente mayor ($P < 0,05$) a m-C: 60% y 77% respectivamente, pero sin haber evidenciado diferencias significativas entre sí ($P > 0,05$). En el caso de m-B *srf+*, m-B *srf-*, m-AM+B *srf+*, m-AM+B *srf-* y m-T, no se detectaron porcentajes de degradación diferentes al de m-C.

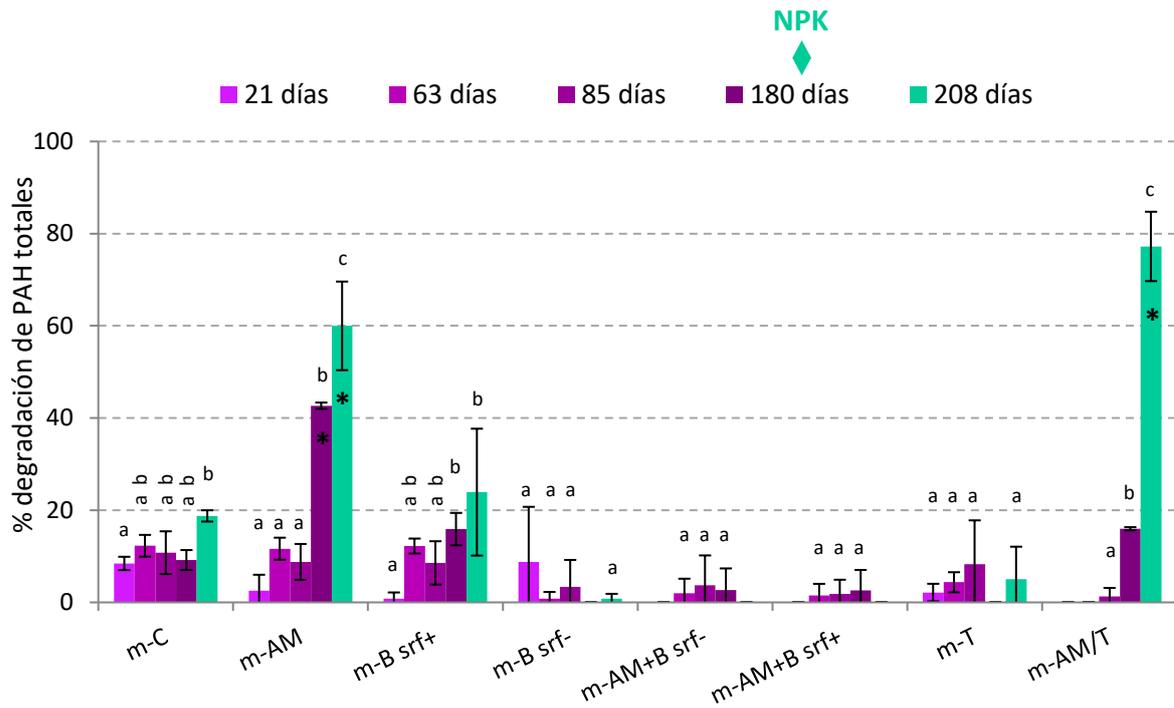


Figura V.6. Porcentaje de degradación de PAH totales con respecto al valor inicial de cada sistema. Se graficaron los promedios de determinaciones por triplicado con sus respectivas desviaciones estándar (barras). Los asteriscos indican diferencia significativa ($P < 0,05$) de los distintos microcosmos con el control en un mismo tiempo de incubación. Las letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre distintos tiempos para un mismo microcosmos.

En las siguientes figuras V.7 y V.8 se contrastaron los cambios en las concentraciones de los PAH residuales de forma individual en el momento previo al agregado de NPK (180 días) y 28 días después (208 días), respectivamente. En el primer caso, pasados 180 días de incubación, en el microcosmos m-C la concentración de los cuatro PAH (FLU, FEN, ANT y PIR) no se diferenció de la inicial. En m-B *srf*⁻, m-AM+B *srf*⁻, m-AM+B *srf*⁺ y m-T, no se encontraron diferencias significativas con m-C ($P > 0,05$).

El microcosmos m-AM evidenció una importante disminución en la concentración remanente de FEN únicamente, mientras que en los restantes PAH no se vieron cambios significativos con respecto a m-C ($P > 0,05$). Esto permitió demostrar que el 43% de degradación de PAH observado en la figura V.6 se debió a la eliminación de FEN. Si bien el sistema inoculado con AM en simultáneo al tratamiento con Triton X-100 (m-AM/T) no había evidenciado diferencia en la degradación en el total de PAH con respecto a m-C, presentó menor concentración de FEN que la inicial, pero

significativamente mayor que la encontrada en m-AM ($P < 0,05$). Adicionalmente, mostró un leve descenso en la concentración de FLU, que fue significativamente menor a la inicial ($P < 0,05$), aunque ningún cambio se registró en ANT y PIR.

Finalmente, en m-B *surf+*, donde hasta los 180 días de incubación no se había observado degradación de PAH que se diferenciara del control, se registró en ese momento una concentración de FEN significativamente menor ($P < 0,05$) que la inicial; dicha concentración fue mayor que la correspondiente a m-AM y m-AM/T. Los restantes PAH no evidenciaron cambios.

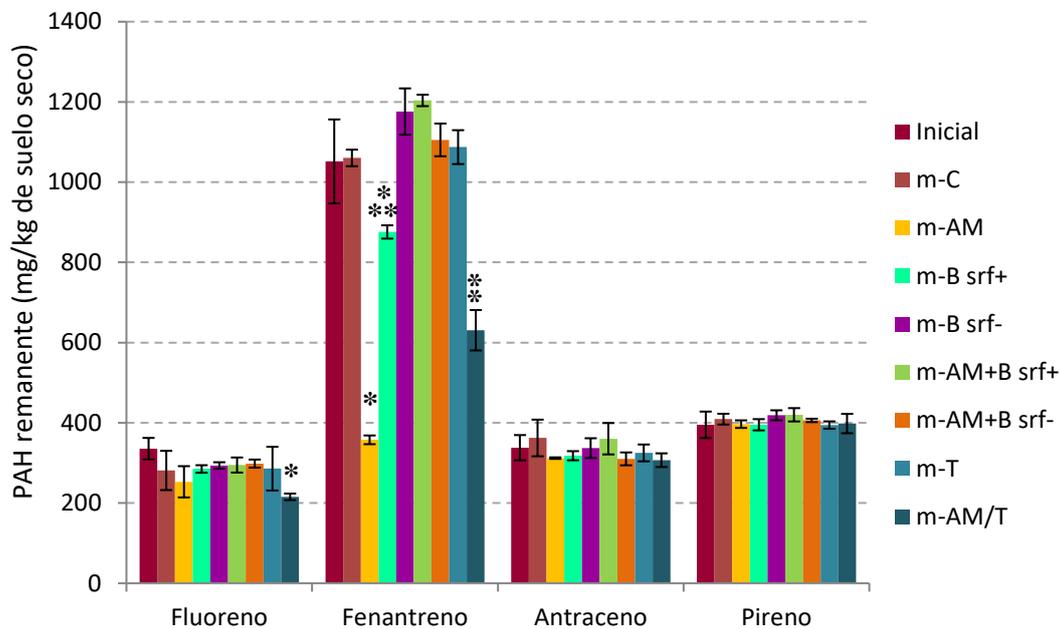


Figura V.7. Concentración de PAH (mg/kg) en los diferentes microcosmos al momento previo del agregado de NPK diferenciando en fluoreno, fenantreno, antraceno y pireno. La primera columna dentro del grupo de cada PAH indica la concentración al día 1 de incubación. Se graficaron promedios de triplicados con sus respectivas desviaciones estándar (barras). Los asteriscos indican una concentración significativamente menor ($P < 0,05$) con respecto al valor inicial (distinto número de asteriscos, diferencia significativa entre sí).

Pasados 28 días de incubación luego de haber agregado NPK (Figura V.8), en m-AM/T se observó una concentración significativamente menor con respecto al valor inicial en los cuatro PAH analizados. La inoculación sólo con AM evidenció

concentraciones remanentes significativamente menores al valor inicial tanto de FEN como de FLU, pero el ANT y PIR no presentaron cambios. Particularmente la degradación del fenantreno superó el 90% tanto en m-AM como en m-AM/T, sin diferencias significativas entre sí ($P > 0,05$).

La inoculación con la cepa B *srf+* resultó en una menor cantidad de FEN remanente que la inicial ($P < 0,05$), pero no ocurrió así con los restantes PAH.

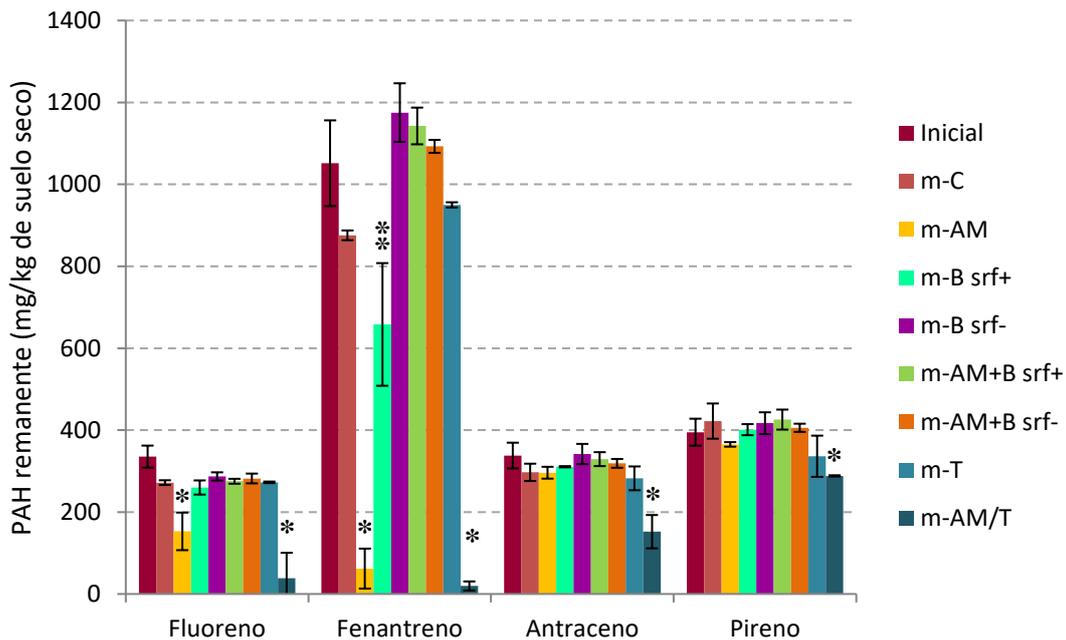


Figura V.8. Concentración de PAH (mg/kg de suelo seco) en los diferentes microcosmos 28 días después del agregado de NPK diferenciando en fluoreno, fenantreno, antraceno y pireno. La primera columna dentro del grupo de cada PAH indica la concentración al día 1 de incubación. Se graficaron promedios de triplicados con sus respectivas desviaciones estándar (barras). Los asteriscos indican una concentración significativamente menor ($P < 0,05$) con respecto al valor inicial (distinto número de asteriscos, diferencia significativa entre sí).

En la figura V.9 se graficaron los porcentajes de las fracciones BDP a los 63 días de incubación de los distintos PAH en estudio para todos los microcosmos. Esta gráfica permitió detectar un aumento en la BDP de los cuatro PAH en los microcosmos m-B *srf+*, m-B *srf-*, m-AM+B *srf+*, m-AM+B *srf-*, m-T y m-AM/T, diferenciándose significativamente

($P < 0,05$) de m-C. Contrariamente, m-AM no evidenció diferencias significativas con el control ($P < 0,05$).

En los sistemas m-C, m-AM y m-B *srf*⁻ pudo evidenciarse una tendencia a disminuir la biodisponibilidad a medida que aumenta el peso molecular del PAH. Por otra parte, esta relación entre BDP y peso molecular se vio alterada en los microcosmos inoculados con B *srf*⁺ (m-B *srf*⁺ y m-AM+B *srf*⁺), tratados con Triton X-100 (m-T y m-AM/T) y en m-AM+B *srf*⁻.

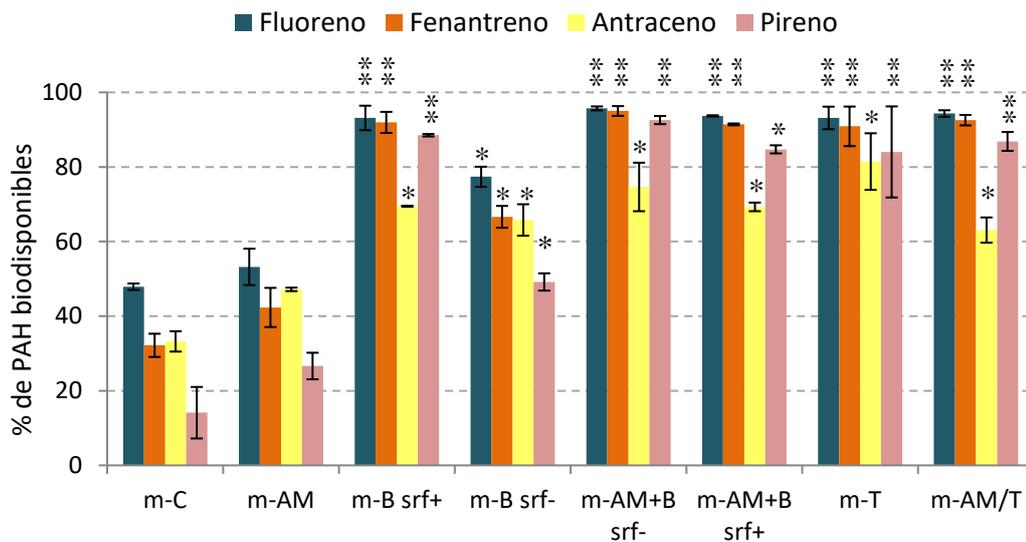


Figura V.9. Porcentaje de los diferentes PAH biodisponibles al día 63 de incubación en los distintos microcosmos. Se graficaron promedios de triplicados con sus respectivas desviaciones estándar (barras). Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$) con el control para un mismo PAH.

V.3.3. Degradación de hidrocarburos alifáticos

La figura V.10 muestra los porcentajes de degradación de hidrocarburos alifáticos (Haf) a lo largo del tiempo de incubación para los microcosmos estudiados. Aproximadamente el 70% de los Haf identificados inicialmente fueron de longitud intermedia (C_{10} - C_{25}). Después de 21 días de incubación, en todos los tratamientos se observó una degradación superior al 20%, presentando diferencias significativas ($P < 0,05$) con m-C los sistemas m-AM, m-B *srf*⁺, m-B *srf*⁻, m-AM+B *srf*⁺, m-T y m-AM/T.

En cambio, al día 85 sólo los microcosmos inoculados con *B srf+* y tratados con Triton X-100 se diferenciaron significativamente ($P < 0,05$) de m-C con una mayor degradación.

A los 180 días de incubación, en el microcosmos control se alcanzó un porcentaje de eliminación mayor al 80%, y los tratamientos no se diferenciaron significativamente ($P > 0,05$) del mismo. Luego del agregado del fertilizante, la totalidad de los sistemas alcanzó el 100% de eliminación de HAF.

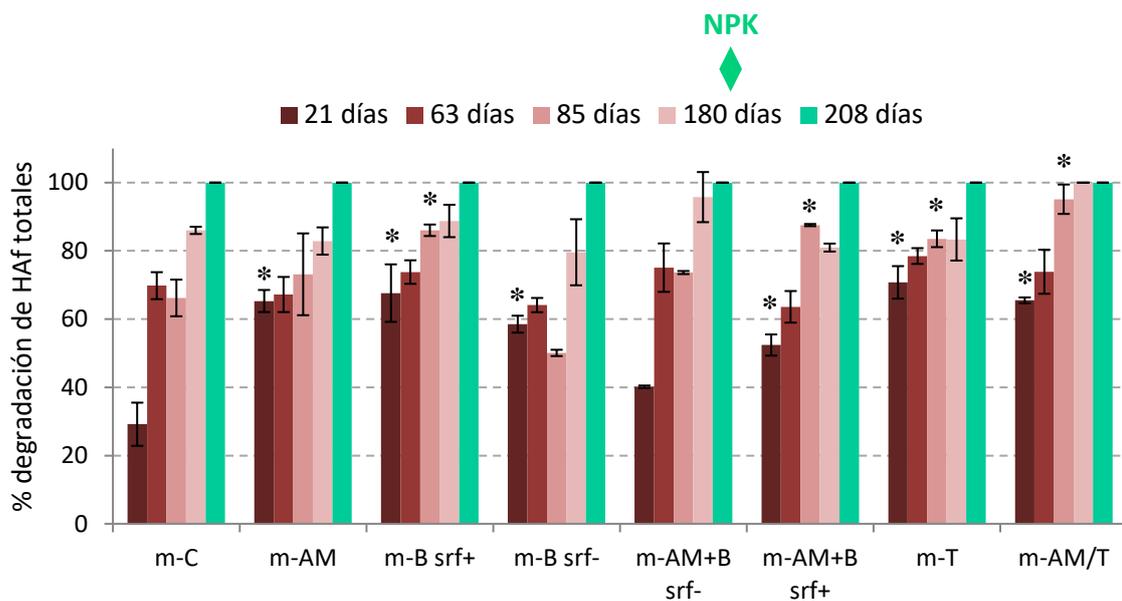


Figura V.10. Porcentaje de degradación de HAF totales con respecto al valor inicial de cada sistema. Se graficaron los promedios de determinaciones por triplicado con sus respectivas desviaciones estándar (barras). Los asteriscos indican diferencia significativa ($P < 0,05$) con el control en un mismo tiempo de incubación.

V.3.4. Monitoreo de Triton X-100

A partir del análisis de los cromatogramas obtenidos por CG-FID para la determinación de HC, se lograron identificar 7 picos pertenecientes al Triton X-100 al superponer los cromatogramas de los microcosmos tratados con el surfactante sobre los del control (Figura S3, en Material Suplementario). La concentración de cada pico fue

determinada en relación al patrón del hidrocarburo alifático de tiempo de retención más cercano, por lo que se indica como mg/kg* de suelo seco.

En ambos sistemas con Triton X-100, se calcularon los porcentajes de eliminación de cada pico identificado al día 85 con respecto a los valores iniciales. Los resultados se exponen en la tabla V.3. A simple vista pudo destacarse que la degradación fue menor en m-T, donde se observó que los picos de mayor tiempo de retención no fueron eliminados. En paralelo, en m-AM/T si bien el pico que se detecta a los 56,1 min no pudo eliminarse, el siguiente, correspondiente a los 48,9 min, llegó a disminuir en cierto porcentaje.

Tabla V.3. Porcentaje de eliminación de cada pico identificado de Triton X-100 al día 85 de incubación.

Tiempo de retención	% de Eliminación	
	m-T	m-AM/T
34,10	-	16,2
37,30	15,7	33,2
39,85	14,4	32,0
42,05	10,6	23,0
44,66	17,3	24,5
48,86	-	23,0
56,10	-	2,6

V.3.5. Análisis del efecto de los tratamientos sobre la comunidad bacteriana del suelo

V.3.5.1. Recuento de bacterias heterótrofas cultivables en R2A

En esta sección se describe la dinámica en los recuentos bacterianos de bacterias heterótrofas cultivables en R2A, graficada en la figura V.11. En el transcurso del tratamiento, los datos de heterótrofas viables recolectados para el microcosmos m-C no evidenciaron cambios en el tiempo, manteniéndose alrededor de 1×10^8 UFC/g de suelo seco. Los sistemas inoculados con AM, B *srf*⁻ y AM+B *srf*⁻ se comportaron de forma comparable a m-C (Figura V.11b). Si bien m-B *srf*⁺ comenzó presentando un recuento significativamente menor ($P < 0,05$) a m-C, desde la primera semana de incubación y

hasta el último día de monitoreo siguió la tendencia del microcosmos control (Figura V.11a). Por otra parte, m-AM+B *srf+*, que inicialmente tuvo un recuento comparable tanto a m-C como a m-AM, evidenció un descenso durante la primera semana (Figura V.11a). Dicha disminución fue seguida por una recuperación de los valores iniciales hacia el día 14, llegando a igualar a m-C y comportándose como tal de ese momento en adelante.

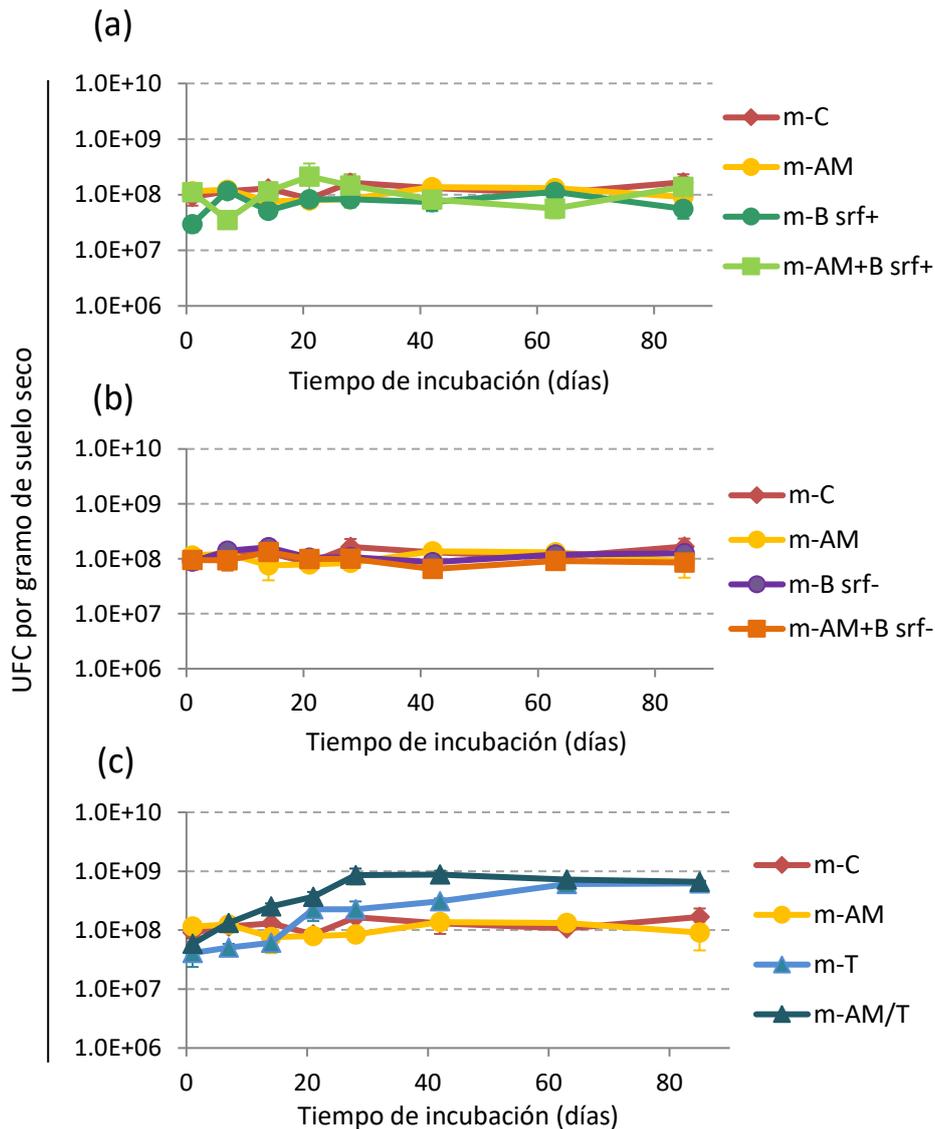


Figura V.11. Dinámica del recuento de bacterias heterótrofas cultivables en R2A (UFC/g de suelo seco) durante 85 días de incubación en (a) m-C, m-AM, m-B *srf+* y m-AM+B *srf+*; (b) m-C, m-AM, m-B *srf-* y m-AM+B *srf-*; y (c) m-C, m-AM, m-T y m-AM/T. Se graficaron los promedios de los sistemas por triplicado y sus respectivas desviaciones estándar (barras).

El microcosmos tratado con Triton X-100 presentó durante los primeros 14 días un efecto negativo sobre el recuento de bacterias heterótrofas cultivables con respecto al control sin tratamiento (Figura V.11c), probablemente por un efecto tóxico de dicho químico. A partir de allí, evidenció un aumento gradual llegando a diferenciarse de m-C al día 42 y continuando el incremento hacia los 85 días. La inoculación con AM sumada al tratamiento con el surfactante (m-AM/T) inicialmente se comportó de la misma manera que el control, pero luego lo superó significativamente ($P < 0,05$) a partir del día 14 y continuó aumentando en adelante. Incluso presentó recuentos mayores que m-T hasta el día 42, a partir del cual se igualaron ambos microcosmos tratados con el surfactante sintético (Figura V.11c).

En la figura V.12 se muestran las suspensiones de suelo MTC en solución fisiológica a partir de las cuales se llevaron a cabo los recuentos. Pudo observarse a simple vista la facilidad de dispersarse las partículas de suelo de los microcosmos tratados con Triton X-100 en contraste con los que no fueron tratados con el surfactante. Si bien inicialmente se registró un probable efecto tóxico del surfactante en m-T en el recuento de bacterias heterótrofas, con el transcurso del tiempo tanto en m-T como en m-AM/T se evidenció un aumento gradual de los recuentos que podría deberse a un fenómeno de adaptación de los microorganismos a dicho químico y/o a una mayor recuperación de células en los sobrenadantes de las suspensiones.



Figura V.12. Suspensiones de suelo MTC (10 g de suelo en 90 ml de solución fisiológica) de microcosmos tratados con Triton X-100 (hacia la izquierda) y sin tratar (hacia la derecha).

V.3.5.2. Recuento de bacterias cultivables degradadoras de hidrocarburos policíclicos aromáticos

En la figura V.13 se muestra el NMP de degradadoras de PAH en función del tiempo para todos los microcosmos estudiados. En el microcosmos control, se observó una disminución del NMP desde el momento inicial hasta los 42 días de incubación, seguida de una tendencia a aumentar, recuperando los valores iniciales hacia el día 85. Los microcosmos m-AM y m-B *srf+* mostraron recuentos de bacterias degradadoras de PAH significativamente superiores a m-C ($P < 0,05$) en el período comprendido entre los días 21 y 28; a partir de los 42 días su comportamiento se igualó al de m-C hasta el final del monitoreo (Figura V.13a). Los microcosmos inoculados con AM+B *srf+*, B *srf-* y AM+B *srf-* se equipararon al control en todo momento (Figuras V.13a y V.13b).

Los microcosmos m-T y m-AM/T no presentaron cambios significativos en el tiempo del NMP de degradadoras de PAH (Figura V.13c). Teniendo en cuenta el posible incremento en la resuspensión de células en solución fisiológica por acción del Triton X-100 (Figura V.12) reflejado en el aumento del recuento de heterótrofas cultivables (Figura V.11c), podría deducirse una disminución de la proporción de bacterias degradadoras de PAH como consecuencia del tratamiento con el surfactante sintético.

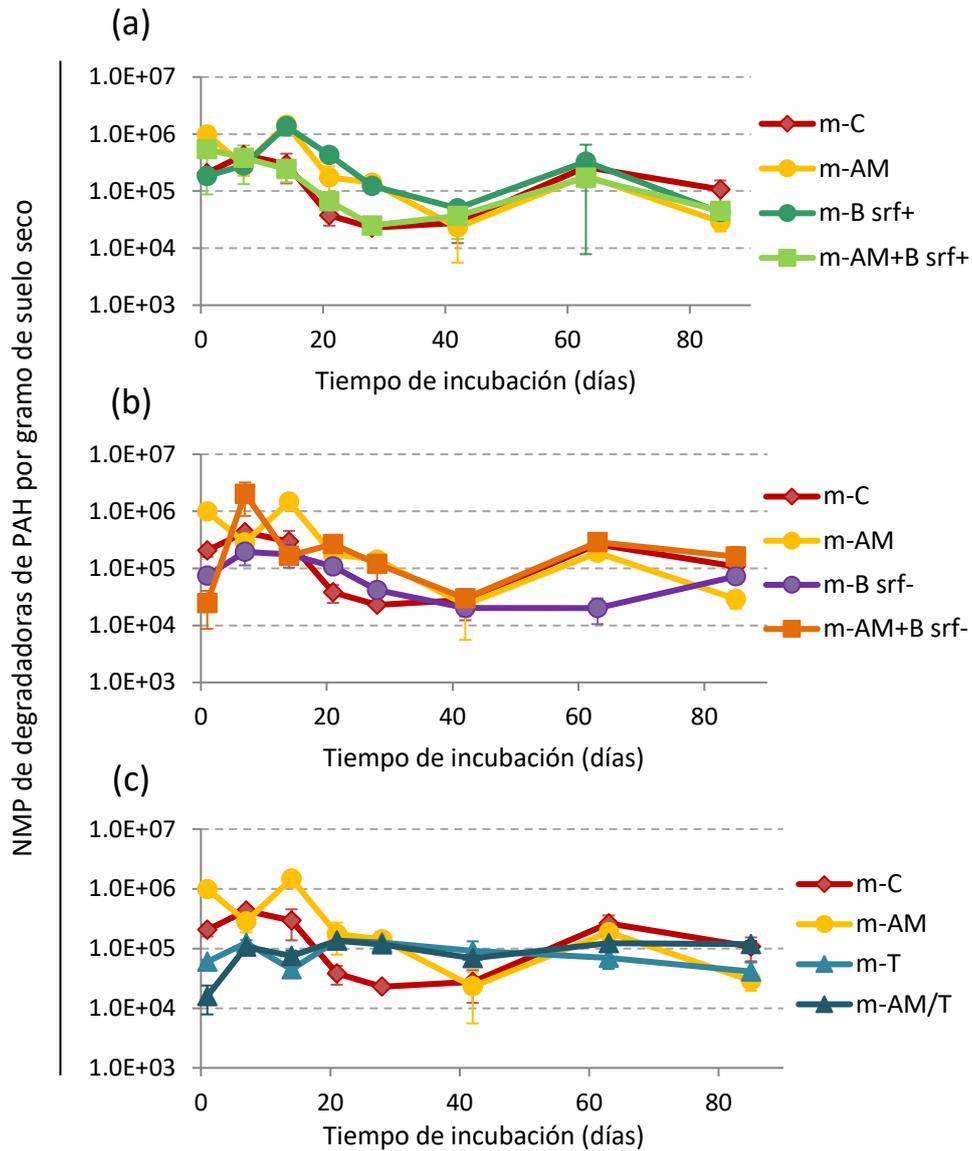


Figura V.13. Dinámica del recuento de bacterias degradadoras de PAH (NMP/g de suelo seco) durante 85 días de incubación en (a) m-C, m-AM, m-B *srf+* y m-AM+B *srf+*; (b) m-C, m-AM, m-B *srf-* y m-AM+B *srf-*; y (c) m-C, m-AM, m-T y m-AM/T. Se graficaron los promedios de los sistemas por triplicado y sus respectivas desviaciones estándar (barras).

V.3.5.3. Diversidad, estructura y composición de la comunidad bacteriana del suelo

La estructura de las comunidades del suelo, así como su composición taxonómica y diversidad se analizaron mediante secuenciación por Illumina de amplicones de genes 16S rARN de los microcosmos m-C, m-AM, m-B *srf*⁺, m-AM+B *srf*⁺ y m-AM/T en los días 1, 28, 85 y 180 de incubación. Después de la aplicación de la NPK (día 208) se secuenciaron muestras de ADN de suelo de los microcosmos m-C, m-AM y m-AM/T, donde se observó el mayor porcentaje de degradación de PAH significativamente diferente al control.

El análisis de secuenciación permitió obtener un rango de número de secuencias que varió entre 22.123 y 24.580 lecturas, agrupadas según el 97% de similitud en 10.270 Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU) diferentes (Tabla V.4). Los índices de Good estiman el porcentaje total de OTU bacterianas representadas en la muestra, dando información sobre la cobertura del análisis. Como se muestra en la tabla V.4, los índices de Good obtenidos variaron en un rango de 0,90 a 0,94 y junto con las curvas de rarefacción (Figura V.14) demostraron que la cobertura alcanzada fue suficiente para cubrir la mayor parte de la diversidad.

Tabla V.4. Número de secuencias obtenidas a partir del análisis por Illumina para los distintos microcosmos a los días indicados, número de OTU agrupadas al 97% de similitud e índices de Good.

Día de incubación	Microcosmos	N° de secuencias	N° de OTU	Índice de Good
1	m-C	24.580	4.470	0,92
	m-AM	24.580	4.604	0,92
	m-B <i>surf</i> +	22.123	4.397	0,91
	m-AM+B <i>surf</i> +	24.580	4.224	0,92
	m-AM/T	24.580	3.569	0,93
28	m-C	22.123	4.468	0,90
	m-AM	22.123	4.497	0,90
	m-B <i>surf</i> +	24.580	4.338	0,91
	m-AM+B <i>surf</i> +	24.580	4.420	0,92
	m-AM/T	24.580	3.942	0,92
85	m-C	24.580	4.147	0,91
	m-AM	22.123	4.397	0,90
	m-B <i>surf</i> +	24.580	4.269	0,92
	m-AM+B <i>surf</i> +	24.580	4.011	0,92
	m-AM/T	22.123	3.627	0,91
180	m-C	24.580	4.453	0,91
	m-AM	22.123	4.243	0,91
	m-B <i>surf</i> +	22.123	4.455	0,91
	m-AM+B <i>surf</i> +	24.580	3.798	0,92
	m-AM/T	22.123	2.627	0,94
208(NPK)	m-C	22.123	4.102	0,91
	m-AM	22.123	3.925	0,91
	m-AM/T	22.123	2.839	0,94

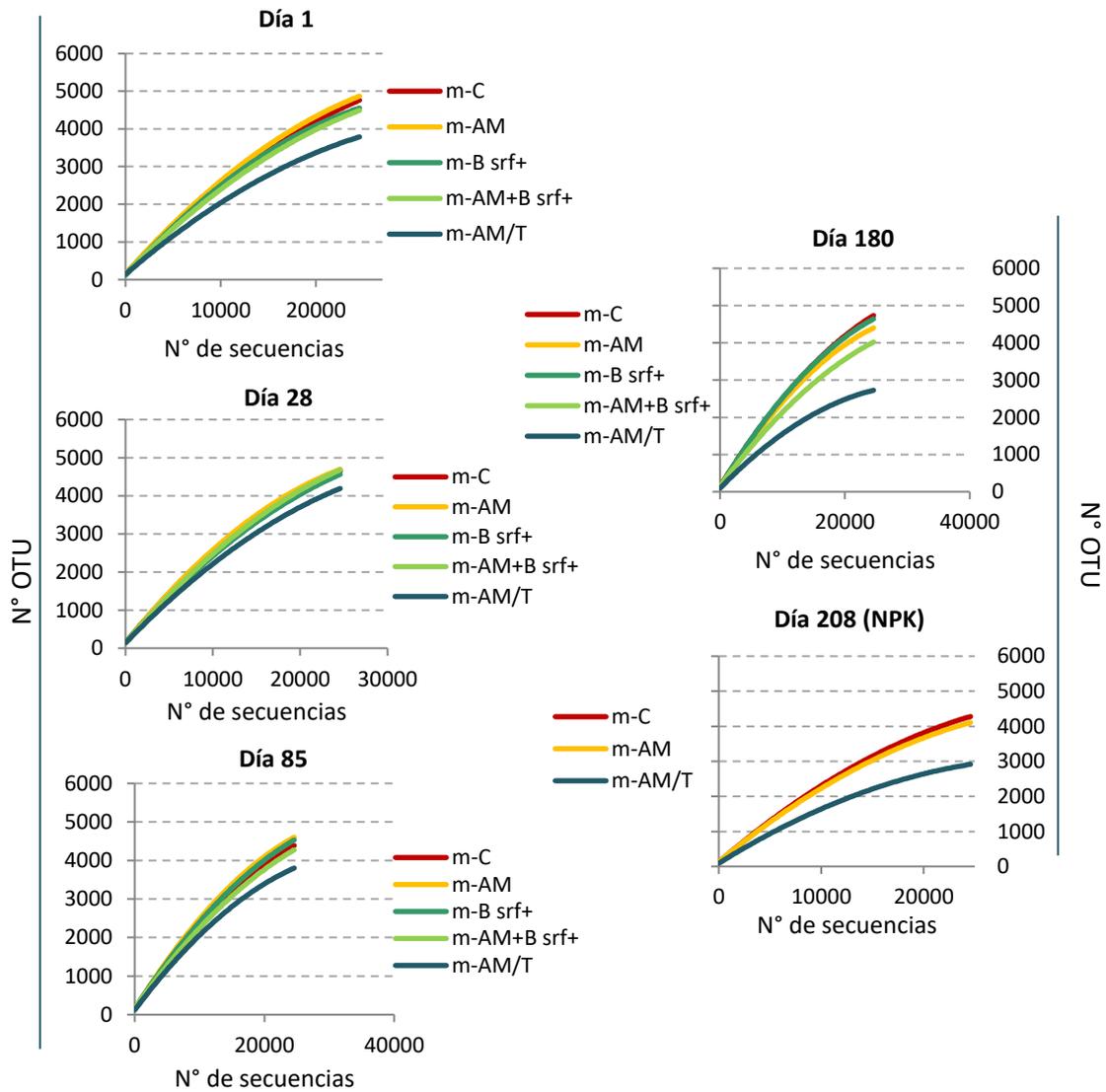


Figura V.14. Curvas de rarefacción obtenidas a través de los datos de Illumina analizados mediante Quiime por MR DNA; se muestran los días 1, 28, 85, 180 y luego del agregado de NPK, día 208(NPK).

Para comparar las comunidades de los distintos microcosmos y estudiar cómo variaron en el tiempo, se calcularon tres estimadores pertenecientes a la familia de los números de Hill, descritos por Mark Hill (Hill, 1973) como un concepto unificado de diversidad que considera tanto el número de especies como los pesos diferentes de las especies en base a su abundancia relativa (Kang y col., 2016). Como se describió en la Sección III.2.7.10 (Materiales y Métodos), 0D permite estimar la riqueza de especies, 1D es una medida de diversidad calculada como la exponencial de Shannon y 2D estima la equitatividad como la inversa del índice de Simpson. Como estas determinaciones son influenciadas por la profundidad en la secuenciación, se realizó una normalización a

través del re-muestreo y los parámetros descriptos se estimaron para 22.123 secuencias (correspondiente al menor número de lecturas obtenido entre todas las muestras analizadas) seleccionadas al azar en cada muestra.

La tabla V.5 muestra dichos estimadores para todas las muestras analizadas en esta sección. Durante los primeros 180 días de incubación, el suelo control evidenció un aumento en 0D (indicador de riqueza), el índice de diversidad 1D osciló alrededor del valor inicial y 2D no presentó cambios significativos durante la incubación hasta ese momento. Luego del agregado de NPK, disminuyeron tanto los índices de diversidad como el de riqueza, el cual alcanzó un valor comparable al inicial, indicando que un aumento de la conductividad provocado por el agregado de nutrientes podría haber afectado a la comunidad.

La inoculación con AM (m-AM) provocó un aumento inmediato en la diversidad, riqueza y en la equitatividad con respecto al microcosmos control. Hasta los 180 días de incubación no evidenció posteriores cambios en cuanto a la riqueza, mientras que se observó una disminución gradual del índice 2D correspondiente a un aumento de la dominancia y consecuente disminución de la diversidad. Luego del agregado de NPK, de forma comparable al control, disminuyeron los tres índices.

El microcosmos m-B *srj+* presentó valores iniciales de riqueza y diversidad comparables al control, aunque una levemente mayor equitatividad. Durante el primer mes de incubación, se observó un aumento de la riqueza acompañado por una disminución en la diversidad probablemente por el incremento en la dominancia evidenciado por una caída en el valor de 2D . Hacia los 180 días de incubación, se recuperaron los valores iniciales de diversidad, principalmente por un aumento en la equitatividad ya que no se observaron cambios significativos en la riqueza de especies (0D).

La co-inoculación con AM+B *srj+* (m-AM+B *srj+*) generó una disminución de la diversidad a partir del día 85 de incubación, en simultáneo a una leve reducción de la riqueza y aumento de la dominancia.

En el microcosmos tratado con Triton X-100 e inoculado con AM (m-AM/T), desde el inicio del tratamiento y en cada uno de los días muestreados, pudo destacarse

un efecto negativo en los estimadores de riqueza 0D , diversidad 1D y equitatividad 2D , ya que mantuvo valores por debajo del control y los sistemas inoculados en todo momento, pudiendo atribuir entonces este efecto a la acción del surfactante. El agregado de nutrientes mediante NPK, provocó una disminución en el índice de riqueza sin mayores cambios en la equitatividad y un leve aumento en la diversidad.

Tabla V.5. Índices de diversidad de los distintos microcosmos en los días de incubación 1, 28, 85, 180 y luego del agregado de NPK, 208(NPK).

Día de incubación	Microcosmos	Índices de diversidad*		
		0D	1D	2D
1	m-C	7.391,1	419,0	37,7
	m-AM	7.635,4	515,9	65,4
	m-B srf+	7.269,6	426,6	48,5
	m-AM+B srf+	7.435,1	363,2	36,2
	m-AM/T	6.258,8	240,8	26,0
28	m-C	7.851,7	422,2	41,6
	m-AM	7.776,4	480,7	57,5
	m-B srf+	7.877,1	351,1	33,4
	m-AM+B srf+	7.571,9	385,8	35,9
	m-AM/T	7.470,2	184,0	11,5
85	m-C	7.854,0	351,1	37,9
	m-AM	7.949,5	454,1	63,0
	m-B srf+	7.545,5	353,1	32,6
	m-AM+B srf+	7.185,1	239,5	20,7
	m-AM/T	7.117,7	205,2	20,9
180	m-C	8.176,5	408,4	42,5
	m-AM	7.878,1	313,3	29,1
	m-B srf+	7.811,0	444,0	55,9
	m-AM+B srf+	7.096,2	220,9	20,1
	m-AM/T	5.155,3	102,8	16,7
208(NPK)	m-C	7.682,0	206,7	18,5
	m-AM	7.194,4	188,2	18,3
	m-AM/T	4.747,9	114,2	18,7

*Los valores fueron calculados en base a 22.123 secuencias random por muestra.

Descripción de la composición de las comunidades bacterianas a nivel de Filo

Los datos obtenidos a partir de la secuenciación masiva mediante Illumina evidenciaron que todas las OTU fueron clasificadas bajo el dominio de Bacteria, incluyendo 28 filos (Tabla S.5, en la sección Material Suplementario). Los filos mayoritarios durante el período de incubación, teniendo en cuenta aquellos que se presentaron en al menos un microcosmos con un porcentaje de abundancia mayor a 0,5%, fueron Proteobacteria (31,3%-64,5%), Actinobacteria (22,7%-59,2%), Firmicutes (3,2%-24,7%), Bacteroidetes (0,8%-10,1%), Chloroflexi (0,8%-2,9%), Planctomycetes (0,6%-2,2%), Acidobacteria (0,1%-0,8%) y Verrucomicrobia (0%-0,5%) (Figura V.15).

En el suelo control predominaron los filos Proteobacteria (45 %) y Actinobacteria (35%), seguidos en menor proporción por Firmicutes (9%) y Bacteroidetes (5%) y otros filos representados por menos del 2% (Figura V.15). Se pudo observar en m-C, que a medida que fueron transcurriendo los primeros 6 meses de incubación, hubo un aumento paulatino en la abundancia relativa del filo Actinobacteria a expensas de otros filos que disminuyeron, principalmente de Bacteroidetes y Proteobacteria. Posteriormente al agregado de NPK, Actinobacteria aumentó aún más y Proteobacteria, que había ido disminuyendo desde el momento inicial, subió hasta alcanzar aproximadamente el valor del primer mes de monitoreo. Dichos aumentos se correspondieron con una disminución en Firmicutes, que se había mantenido aproximadamente constante, y del porcentaje de Bacteroidetes.

La inoculación con la cepa *Sphingobium* sp. AM (m-AM), perteneciente al filo Proteobacteria, mostró inicialmente una composición a nivel de filo similar a la descrita para m-C y contrariamente a lo esperado, evidenció una gradual disminución en Proteobacteria, que continuó incluso luego del mes de incubación con fertilizante. De forma comparable a m-C, ocurrió un aumento paulatino de Actinobacteria a expensas de menores abundancias relativas en Bacteroidetes, Proteobacteria y Firmicutes principalmente.

La inoculación con la cepa productora de surfactina *Bacillus subtilis* NCIB3610 (m-B *srf+*), perteneciente al filo Firmicutes, produjo un aumento del porcentaje de éste que tuvo como consecuencia una disminución en la proporción de Actinobacteria y

Proteobacteria desde el momento inicial. Firmicutes estuvo representado entre un 20%-25% de abundancia relativa hasta el día 85. A partir de allí se registró una caída debida probablemente al aumento en el porcentaje de Actinobacteria comparable a los valores en el control. Proteobacteria se mantuvo aproximadamente en un rango que varió del 40% inicialmente a 35% hacia los 6 meses de seguimiento.

La co-inoculación con AM+B *srf+* resultó en una composición de Proteobacteria similar a m-C, pero con menos del 40% de Actinobacteria, probablemente debido a la mayor proporción de Firmicutes. Actinobacteria, como en los microcosmos descritos anteriormente, fue aumentando su abundancia relativa gradualmente, y en este caso ocurrió como en m-C, principalmente a expensas de la disminución en Bacteroidetes y Firmicutes.

La inoculación de AM junto con el tratamiento con Triton X-100 a la CMC impactó desde el inicio sobre el porcentaje de Actinobacteria, que cayó a 22,7% para luego equipararse a m-C hacia el día 85 pero manteniéndose aproximadamente constante hasta el final del monitoreo. Esta disminución pudo haberse debido al aumento esperado en Proteobacteria como consecuencia de la inoculación de *Sphingobium* sp. AM, que desde un primer momento se presentó en un 50% y luego de un mes, coincidiendo con la caída de Actinobacteria, superó el 60% de abundancia relativa. A continuación de ese pico, fue disminuyendo hasta igualarse con el control. Tras el agregado de NPK, se detectó un aumento en la proporción de Bacteroidetes, a diferencia de los anteriores microcosmos descritos donde tendió a disminuir.

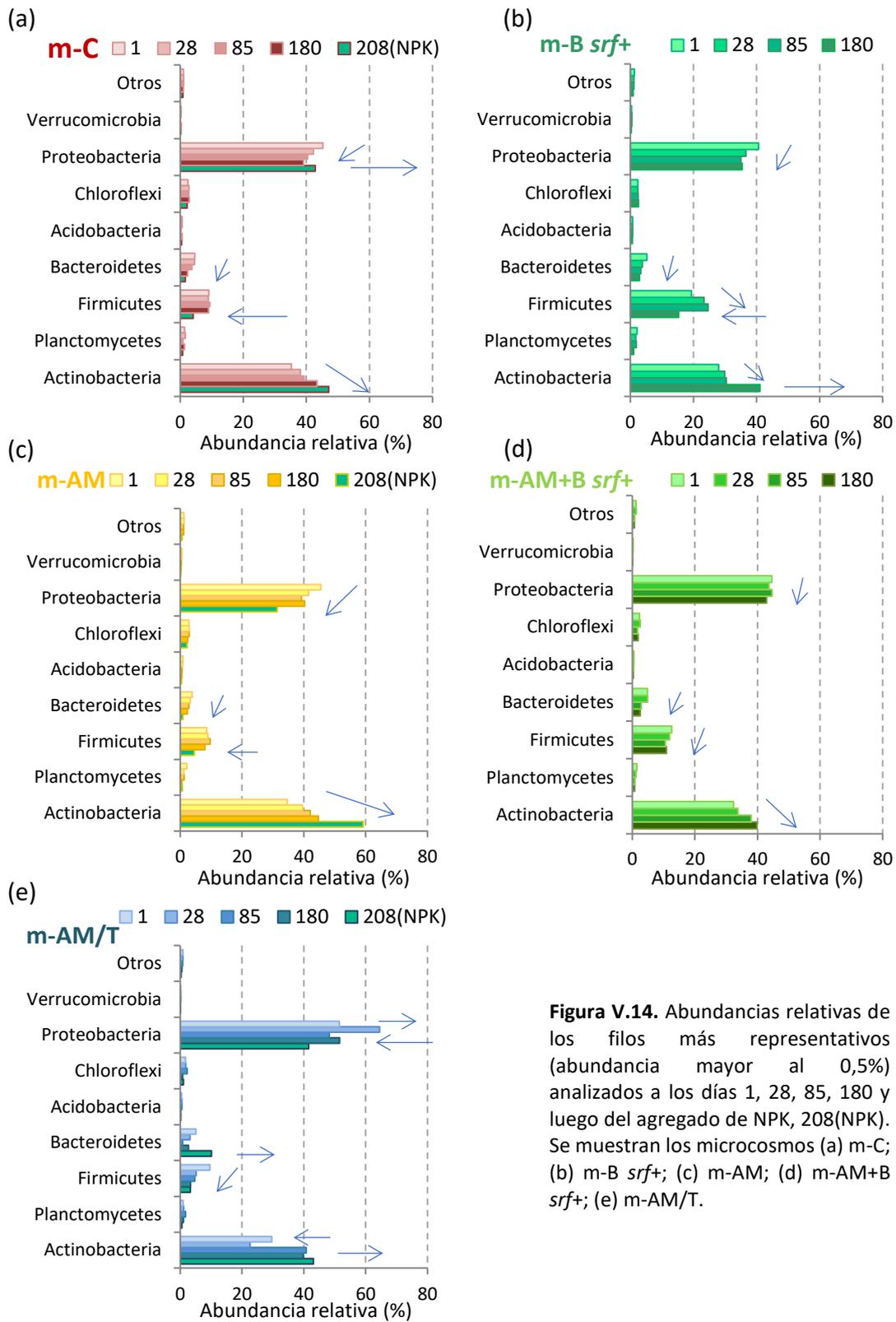


Figura V.14. Abundancias relativas de los filos más representativos (abundancia mayor al 0,5%) analizados a los días 1, 28, 85, 180 y luego del agregado de NPK, 208(NPK). Se muestran los microcosmos (a) m-C; (b) m-B *srf+*; (c) m-AM; (d) m-AM+B *srf+*; (e) m-AM/T.

Análisis de correspondencia de las comunidades bacterianas a nivel de Orden

Las composiciones a nivel de orden de los microcosmos analizados a los distintos tiempos de incubación se compararon mediante un análisis de correspondencia (AC). Como se muestra en la figura V.16, el eje AC1 logró explicar el 31% de la varianza observada y el eje AC2 el 30%.

A simple vista pudo observarse cómo el microcosmos m-C a los distintos tiempos de incubación analizados previos al tratamiento con el fertilizante se mantuvo siempre alrededor de una misma zona en el plano del AC, representada principalmente por la presencia de Actinomycetales y Pseudomonadales. Tras el agregado de la NPK, m-C se alejó hacia valores positivos del eje AC2, pasando a tener más contribución de Oceanospirillales (Proteobacteria) que en los tiempos anteriores.

El microcosmos inoculado con AM se distribuyó inicialmente hacia la derecha del eje AC1 cercano a m-C. Durante 85 días de incubación permaneció cercano al origen influenciado por la zona de los órdenes Rhizobiales y Rhodospirillales-ambos pertenecientes a Proteobacteria- además de Actinomycetales y Pseudomonadales como en m-C. Hacia los 180 y 208 (NPK) días de incubación, m-AM se movió en el plano hacia los valores positivos del eje AC 2, acercándose a m-C luego del agregado del fertilizante.

La inoculación con la cepa *Bacillus subtilis* NCIB3610 impactó sobre la composición del suelo original ya desde el inicio, evidenciándose esto al alejarse de m-C hacia el tercer cuadrante, zona influenciada principalmente por el orden Bacillales. A medida que transcurrió el tiempo de incubación, durante los primeros 85 días se fue acercando en el plano al orden Bacillales. Luego de seis meses de incubación, sin embargo, se ubicó en una zona más cercana a m-C, mayormente representada por Xanthomonadales y Clostridiales.

Los microcosmos que fueron co-inoculados con AM+B *srf+* se distribuyeron cercanos a m-C, siempre a la izquierda del eje AC1 donde se ubicaron los órdenes Clostridiales y Bacillales, pertenecientes a Firmicutes. Hacia los 85 y 180 días de incubación, este sistema se acercó hacia la zona con mayor contribución de Oceanospirillales.

Análisis de las comunidades bacterianas a nivel de Género

En la figura V.17 se muestra el gráfico heat-map, donde puede verse un doble dendrograma jerárquico con el agrupamiento resultante del análisis de los perfiles de la comunidad bacteriana a nivel de género. Se realizó basado en la frecuencia de las secuencias de los 26 géneros con abundancia relativa mayor al 2% en al menos uno de los microcosmos, las cuales cubrieron más del 50% de todas las secuencias.

El mapa de intensidades de color que hace referencia a la abundancia relativa de cada género graficado permitió notar que los géneros *Alcanivorax*, *Promicromonospora*, *Nocardioides* y *Bacillus* se mantuvieron presentes en mayor proporción en la mayoría de los microcosmos y no evidenciaron mayores variaciones durante el período de incubación en los sistemas sin Triton X-100.

A partir del dendrograma que agrupó a los microcosmos, se pudo destacar un gran cluster (Cl 1) que asoció al control junto con los sistemas inoculados con AM, B *srf+* y co-inoculado con AM+B *srf+* durante los primeros 6 meses de incubación e incluso a m-AM/T, aunque únicamente hasta los 28 días de tratamiento. Dentro de Cl 1 se pudieron diferenciar 4 sub-cluster (Sc 1 a 4 en la figura V.16). El sub-cluster 1 agrupó al microcosmos control y m-AM al día inicial y a m-B *srf+* durante los primeros 85 días de incubación. El microcosmos tratado con Triton X-100 sumado al bioaumentación con AM (m-AM/T) en los días 1 y 28 del monitoreo, fue agrupado en un segundo sub-cluster (Sc 2), evidenciándose así los cambios en la comunidad ya desde el comienzo con respecto a m-C y a m-AM. Pudo observarse que hacia el día 28 de m-AM/T hubo un incremento en la proporción de *Salinicola*, del filo Proteobacteria, además de destacarse la presencia de *Sphingobium*, del mismo filo. El sub-cluster 3 agrupó a m-C entre los días 28 a 85 y al microcosmos co-inoculado m-AM+B *srf+* del día inicial al 28, diferenciándose del Sc 2 por una menor proporción del género *Bacillus* y otra mayor de *Sphingobium*.

Adicionalmente dentro de Cl 1, se observó un cuarto sub-cluster (Sc 4) que evidenció una tendencia en la comunidad bacteriana hacia los 6 meses de los microcosmos inoculados sin el surfactante sintético, caracterizada por un importante aumento de la proporción de los géneros *Brevibacterium*, *Oryzihumus*, *Janibacter*,

Brachybacterium, *Georgenia* y *Cellulomonas* principalmente, pertenecientes a Actinobacteria.

El género *Sphingobium* se destacó en los microcosmos inoculados con AM durante el período de incubación previo al agregado de NPK, pero posterior a dicho suplemento, su proporción fue disminuyendo tanto en los microcosmos con la cepa productora de surfactina como con el surfactante sintético, así como en los sistemas donde sólo se inoculó AM.

Un segundo cluster (Cl 2) relacionó a m-C y m-AM luego de 28 días de incubación con NPK, donde se observó un incremento en la proporción de los géneros *Brevibacterium*, *Oryzihumus*, *Pseudomonas* y *Janibacter* con respecto al Sc 4, que agrupó a los microcosmos en el momento previo al suplemento con dichos nutrientes. Este cluster incluyó también a m-AM/T con 85 días de tratamiento, pero con menor fracción de *Oryzihumus*, *Pseudomonas* y *Janibacter* y mayor de *Halomonas*, *Salinicola* e *Hyphomicrobium*. De esta manera comenzó a diferenciarse del resto de los microcosmos y ya hacia los momentos previo y posterior a la adición de NPK, m-AM/T quedó completamente separado de las demás condiciones en un tercer cluster (Cl 3).

En ese último cluster se destacaron con alta frecuencia nuevos géneros dentro de Proteobacteria como *Inquilinus*, *Idiomarina*, *Pusillimonas* y *Erythrobacter*, además de *Galbibacter*, género perteneciente a Bacteroidetes. El agregado de NPK provocó un incremento en la proporción de: *Janibacter*, aunque en menor medida que en m-AM y m-C; *Pseudomonas*, con una fracción comparable a la alcanzada en m-AM y m-C; *Galbibacter* e *Idiomarina*, en muy baja proporción en m-AM y m-C.

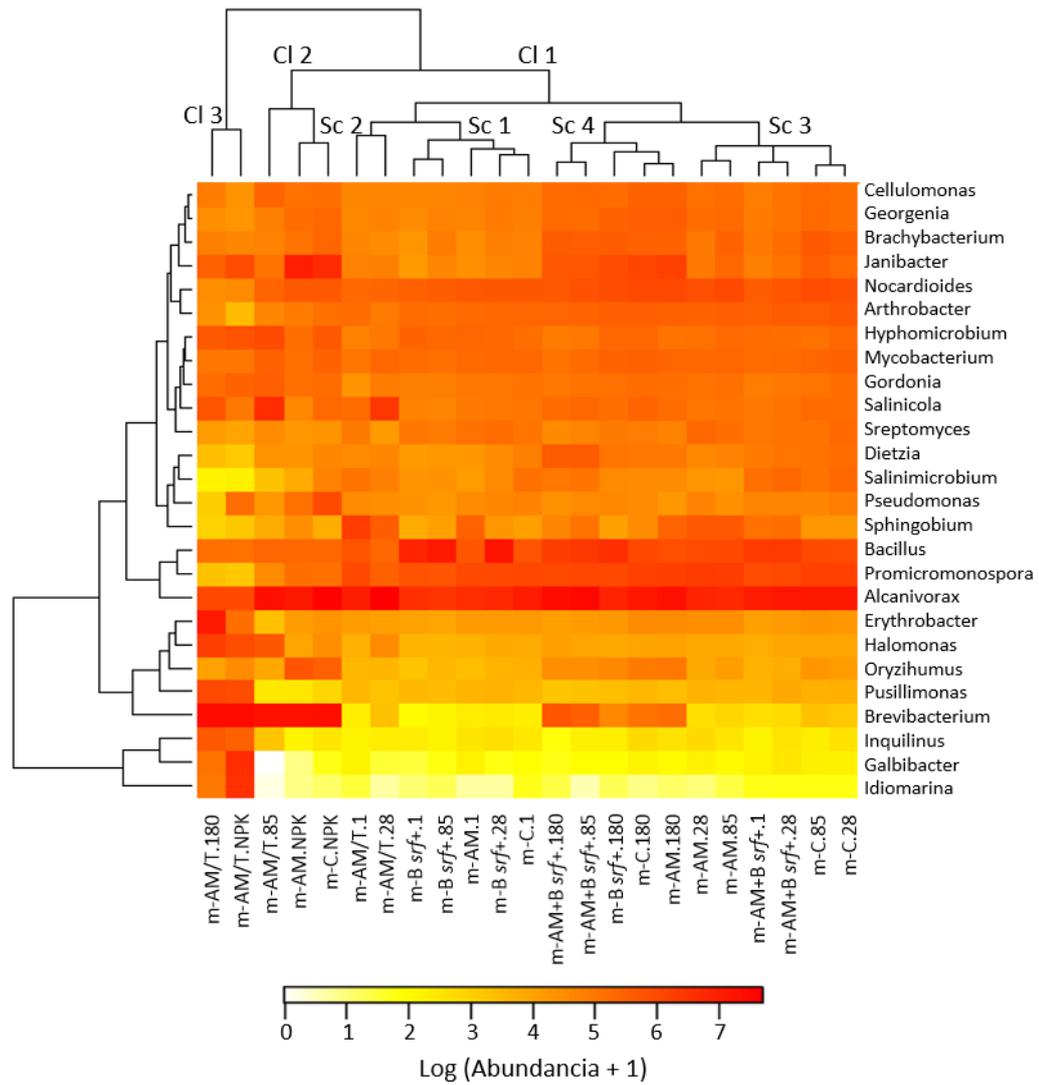


Figura V.17. El heat-map describe la frecuencia de cada género bacteriano (variables agrupadas en el eje Y) en cada una de las muestras (agrupamiento en el eje X). Los valores en el heat-map corresponden al logaritmo de la abundancia más 1 ($\text{Log } X + 1$) de los géneros, y se encuentran representados por la intensidad del color según la leyenda que se muestra debajo de la figura. La distribución bacteriana entre los microcosmos se muestra en un dendrograma jerárquico doble. El agrupamiento filogenético bacteriano y la relación entre las muestras fue determinado por distancia de Bray-Curtis. El número indicado en cada rótulo de los microcosmos señala el día de incubación.

V.4. Discusión

En este capítulo se evaluó el impacto de la inoculación de la cepa productora de surfactina, *Bacillus subtilis* NCIB3610, en microcosmos de un suelo contaminado (m-B *srf+*) y el efecto de la misma en la co-inoculación de la cepa degradadora de fenantreno *Sphingobium* sp. AM (m-AM+B *srf+*), comparándolo adicionalmente con el bioaumentación únicamente con AM (m-AM), el tratamiento del surfactante sintético Triton X-100 (m-T) y este mismo tratamiento en conjunto con la inoculación de AM (m-AM/T). Como control se siguió la atenuación natural en microcosmos del mismo suelo y además se analizaron los efectos de la inoculación de la cepa no productora de surfactina *Bacillus subtilis* NCIB3610 *srf-* (m-B *srf-*) y la co-inoculación de la misma con AM (m-AM+B *srf-*).

Previamente al armado de los microcosmos, se evaluó la capacidad del biosurfactante (BioS) producido por B *srf+* de potenciar la actividad degradadora de AM utilizando como PAH modelo al fenantreno. En primera instancia, la producción del biosurfactante y su secreción por la cepa B *srf+* se puso en evidencia en cultivos en medio líquido, donde la tensión superficial disminuyó entre el 50-57% con respecto a la tensión superficial del medio sin inocular para diferentes medios ensayados. Esta disminución fue mayor a la registrada para la cepa PAO-1 (Tabla V.1). Asimismo, otros autores han demostrado que la capacidad de la surfactina de disminuir la tensión superficial es considerablemente mayor con respecto a muchos otros biosurfactantes (Chen y col., 2015), lo que la convierte en uno de los más efectivos tensioactivos biológicos (Das y Mukherjee, 2007; de França y col., 2015). Por otra parte, los cultivos inoculados con la cepa AM y una mutante de *Bacillus subtilis* NCIB3610 incapaz de producir surfactina (B *srf-*), llevaron a poca o nula disminución de la tensión superficial de cada medio con respecto al control.

Si bien en bibliografía se ha descrito la producción de surfactina a partir de distintos hidrocarburos (Das y Mukherjee, 2007; Chen y col., 2015; de França y col., 2015) por cepas de *Bacillus subtilis*, no pudo evidenciarse crecimiento ni efectos en la tensión superficial en MML suplementado con 200 mg/kg de fenantreno (MML/FEN), como única fuente de carbono y energía, inoculado con B *srf+*. Esta cepa sí evidenció su crecimiento y producción de surfactina en el mismo medio suplementado con distintos

porcentajes de peptona como fuente de carbono adicional. La cepa AM es capaz de crecer en MML/FEN e incluso degradarlo hasta un porcentaje de 87,4% (Festa y col., 2013), sin consecuentes cambios en la tensión superficial del medio. En MML/FEN suplementado con 0,3% de peptona y co-inoculado con AM y B *srf+*, pudo verse un aumento significativo del porcentaje de degradación del PAH, en paralelo a una disminución de la tensión superficial. Este efecto podría explicarse por distintos mecanismos en los que actúan las moléculas de biosurfactante de bajo peso molecular como por ejemplo: la solubilización por micelas (en concentraciones por encima de la CMC) o co-agregados (por debajo de la CMC), la acumulación de monómeros en la interface contaminante-agua y consecuente disminución de la tensión interfacial, o la modificación de la hidrofobicidad de la superficie celular (Johnsen y col., 2005; Bouchez-Naïtali y Vandecasteele, 2008; Bezza y Chirwa, 2017; Zeng y col., 2018).

La surfactina, además de su acción como tensioactivo, puede actuar como antimicrobiano a través de la desestabilización de las membranas celulares como consecuencia de la formación de canales iónicos (Kinsella y col., 2009; Chen y col., 2015). A partir de las co-inoculaciones ensayadas en cultivos de MML/FEN y peptona se pudo descartar el efecto inhibitorio de la producción de surfactina por B *srf+* sobre AM. Por un lado, suplementando el medio con 0,3% de peptona se evidenció en simultáneo la actividad tensioactiva del biosurfactante producido por B *srf+* y la actividad degradadora de AM, además del desarrollo de colonias características tanto de ambos B *srf+* y B *srf-* como de AM. Por otro lado, a 0,5% de peptona, si bien no se recuperaron colonias amarillas ni hubo degradación de FEN en los co-cultivos de AM+B *srf+*, tampoco ocurrió con B *srf-*, incapaz de producir surfactina (Tabla V.2). La disminución en los porcentajes de degradación de FEN observada en MML/FEN, en MML/FEN suplementado con 0,3% de peptona en el co-cultivo AM+B *srf-* y en ambos co-cultivos con el suplemento de 0,5% de peptona (Tabla V.2), estaría indicando interacciones negativas entre AM y las cepas de *Bacillus*, como la competencia por un nutriente diferente a la fuente de carbono o la interferencia a través de señales (Cornforth y Foster, 2013).

De França y col. (2015) estudiaron el efecto del biosurfactante surfactina producido por una cepa de *Bacillus subtilis* sobre la degradación en sistemas batch de arena contaminada con crudo. Utilizaron el biosurfactante purificado y contrastaron su

efecto con el mismo químico sin purificar, aplicando el sobrenadante del cultivo; adicionalmente lo compararon con el efecto del surfactante sintético Triton X-100. Los resultados mostraron porcentajes similares de degradación en los tres casos, demostrando la efectividad del biosurfactante y que su eficiencia no dependería de la pureza, permitiendo disminuir los costos de su potencial aplicación. Mnif y col. (2017) estudiaron el efecto del biosurfactante producido por otra cepa de *B. subtilis* en la degradación de diesel por un consorcio bacteriano degradador sobre cultivos batch de suelo contaminado, tanto aplicando el surfactante purificado como también mediante la co-inoculación de dicho *Bacillus* sp con el mismo consorcio. En ambas condiciones lograron evidenciar un mayor grado de degradación con respecto a la inoculación del consorcio, demostrando un efecto sinérgico entre la capacidad degradadora del mismo y la producción de biosurfactante logrando acelerar el proceso de biodegradación.

Por otra parte, Whang y col. (2008), aplicaron surfactina purificada producida por otra cepa de *B. subtilis* en biopilas de un suelo contaminado con diesel, con alto porcentaje de arena en su composición. Luego de 88 días de tratamiento, evidenciaron un porcentaje de degradación de HC significativamente mayor en el tratamiento con el biosurfactante (76%) con respecto al control (47%). En base a estos antecedentes sobre la eficiencia de biosurfactantes producidos por *Bacillus subtilis* en el mejoramiento de procesos de biodegradación, sumados a los resultados obtenidos en medio líquido en el presente trabajo donde se demostró la capacidad de la cepa *Bacillus* NCIB3610 de potenciar la degradación de fenantreno por *Sphingobium* sp AM, se planteó evaluar el impacto de su inoculación en microcosmos de suelo contaminado con hidrocarburos.

Durante el estudio de microcosmos, los resultados de tensión superficial y los registros de las fracciones sorbidas/biodisponibles de PAH sugirieron que distintos mecanismos podrían haber actuado sobre la sorción de dichos hidrocarburos en los microcosmos con el surfactante sintético en comparación con los microcosmos inoculados con la cepa productora de surfactina. Esta observación se basa en que si bien únicamente en m-T y m-AM/T se registró una importante disminución en la TS (Figura V.4), tanto en estos últimos sistemas como en los inoculados con *B. srf+* (m-B *srf+* y m-AM+B *srf+*), las fracciones BDP se mantuvieron en altos porcentajes en el transcurso del tratamiento (Figura V.5); el mismo comportamiento se observó en el microcosmos co-

inoculado m-AM+B *srf*⁻. Por otro lado, m-C, m-AM y m-B *srf*⁻ mostraron una tendencia a aumentar la fracción sorbida de PAH. Mientras que la acción de Triton X-100, que fue agregado en la CMC, podría haberse debido tanto a la solubilización a través de la formación de micelas como a una modificación de la matriz del sistema, la surfactina, de haberse generado, podría haber actuado mediante la disminución de la tensión interfacial o por la formación de agregados, que puede ocurrir por debajo de la CMC (Johnsen y col., 2005; Bezza y Chirwa, 2017; Zeng y col., 2018). En cuanto al comportamiento en la fracción BDP de PAH observado en m-AM+B *srf*⁻ debe tenerse en cuenta que la mutación de B *srf*⁻ sólo afecta la producción de surfactina y no de otros lipopéptidos (iturinas y fengicinas) que pueden secretarse en cepas de *Bacillus subtilis* (Aleti y col., 2015). Asimismo, no debe descartarse la posible reversión de la mutación en B *srf*⁻ al sufrir el estrés provocado por la inoculación en un sistema complejo como el suelo, donde la producción de surfactina, responsable de la movilidad de B *srf*⁺ y de la formación de biofilm, podría permitir su supervivencia (comunicación personal de Marco Bartolini, Departamento de Microbiología, Universidad Nacional de Rosario).

Pese a que más del 90% de los PAH se encontraba BDP (Figura V.5), y que se obtuvieron recuentos de bacterias degradadoras de PAH de aproximadamente 1×10^5 NMP/g de suelo seco (Figura V.13), la determinación de hidrocarburos mediante CG-FID mostró que durante los primeros 63 días de incubación hubo una limitación en la eliminación de PAH del suelo, habiéndose registrado un 12% de degradación en m-C y porcentajes comparables en los otros tratamientos estudiados (Figura V.6). Por otra parte, no se observó limitación alguna en cuanto a la degradación de HAF, los cuales fueron degradados en todos los microcosmos gradualmente, superando el 80% a los 180 días de incubación (Figura V.10). Aproximadamente el 70% de los HAF identificados fueron de longitud intermedia (C₁₀-C₂₅), el grupo más sencillo de biodegradar (Koshlaf y Ball, 2017).

El análisis de secuenciación masiva mostró que el suelo en estudio se caracterizó desde el inicio por una predominancia de Proteobacteria y Actinobacteria (Figura V.15), filos a los que pertenecen los microorganismos degradadores de hidrocarburos usualmente involucrados en procesos de biorremediación (Brzeszcz y col., 2016). Según las estrategias de crecimiento microbiano r/K, los miembros del filo Actinobacteria son

considerados estrategias K, de baja velocidad de crecimiento, con mejor adaptación ante condiciones limitadas de recursos y mayor estabilidad, por lo que suelen ser los miembros permanentes en una comunidad. En los sistemas estudiados, se vio en todas las condiciones aplicadas un aumento paulatino de este filo desde el momento inicial y hasta el final del monitoreo. Dentro de este filo y del orden Actinomycetales, se destacaron dos de los géneros que se presentaron con mayor frecuencia en los microcosmos sin Triton X-100 durante todo el período de incubación: *Promicromonospora* y *Nocardioides* (Figura V.17). El primero se ha hallado como género dominante en respuesta al proceso de biorremediación en un suelo con contaminación aguda de crudo (Wu y col., 2017). *Nocardioides* también ha sido descrito en suelo contaminado con crudo y dentro del género se han reportado cepas degradadoras de hidrocarburos como fenantreno y alcanos, tanto de cadena corta como larga (Saito y col., 1999; Hamamura y Aro, 2000; Harwati y col., 2007; Abbasian y col., 2016).

El género *Alkanivorax*, perteneciente al orden Oceanospirillales dentro de Proteobacteria, fue el que se presentó en mayor proporción en todos los tratamientos estudiados. Dicho género ha sido recuperado generalmente de ambientes salinos contaminados, como sedimentos costeros, y se ha reportado como halotolerante y degradador principalmente de HAF (Röling y col., 2002; Dastgheib y col., 2012; Fathepure, 2014; Abed y col., 2014; Hassanshahian y Boroujeni, 2016).

Si bien Firmicutes no fue uno de los filos con mayor abundancia, dentro de su orden Bacillales, *Bacillus* se presentó con mayor frecuencia que otros géneros tanto en el suelo inicial como en todos los tratamientos. Se ha caracterizado por incluir cepas aisladas de suelos contaminados productoras de biosurfactantes y degradadoras de variados hidrocarburos como naftaleno, pireno, fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno y alcanos (Das y Chandran, 2001; Chaillan y col., 2004; Haritash y Kaushik, 2009; Velmurugan y Arunachalam, 2009; Moscoso y col., 2012; Bezza y Chirwa, 2016; Zhao y col., 2016; Joy y col., 2017; Koshlaf y Ball, 2017; Varjani, 2017); adicionalmente, se ha destacado su gran supervivencia bajo condiciones salinas (Zheng y col., 2017).

La medida de conductividad eléctrica del suelo utilizado (Tabla III.2, en Materiales y Métodos) reflejó su naturaleza salina (Setia y col., 2011). Los

microorganismos en suelos salinos se encuentran estresados por el bajo potencial osmótico que se presenta en el exterior de las células, lo que causa pérdida de agua desde su interior. Las bacterias resistentes a la salinidad pueden acumular rápidamente sales u osmolitos orgánicos para ajustar su potencial osmótico intracelular. Estos mecanismos de resistencia demandan energía y podrían afectar la eficiencia de la utilización del carbono por los microorganismos (Setia y col., 2011; Madueño, 2013). Generalmente, el potencial degradador y el espectro de sustratos a utilizar por los microorganismos halotolerantes y/o halófilos disminuye al aumentar la salinidad (Riis y col., 2003). En un ambiente con el grado de salinidad más alto tolerado, prefieren utilizar sólo sustratos bióticos (Riis y col., 2003). En esas condiciones, el crecimiento en aceites minerales usualmente se encuentra limitado a la utilización de unos pocos hidrocarburos, principalmente n-alcenos (Riis y col., 2003).

A los 180 días de incubación, la determinación de PAH demostró que la limitación en la degradación de estos hidrocarburos persistía en m-C (Figura V.6). Dicho momento se caracterizó por un importante aumento en la proporción de bacterias dentro del filo Actinobacteria, principalmente debido al incremento de los géneros *Brevibacterium*, *Oryzihumus*, *Janibacter*, *Brachybacterium*, *Georgenia* y *Cellulomonas* (Figuras V.15 y V.17), que se han reportado como géneros aislados de ambientes contaminados (Riis y col., 2003; Zhang y col., 2009; Das y Chandran, 2011; Lu y col., 2011; Lily y col., 2013; Yang y col., 2016). Cepas de *Brevibacterium* se han reportado como capaces de degradar fluoreno, fenantreno, alcanos lineales y ramificados y de producir biosurfactante (Pirnik y col., 1974; Trenz y col., 1994; Das y Chandran, 2011; Souza y col., 2014; Lim y col., 2016; Koshlaf y Ball, 2017). Adicionalmente, en varias ocasiones se ha estudiado el mecanismo de adaptación ante estrés osmótico de cepas halófilas del género *Brevibacterium* por la acumulación de solutos compatibles y se ha confirmado el mismo para su supervivencia en condiciones de alta salinidad (Frings y col., 1993; Zahran, 1997; Nagata y Wang, 2005). Yamazoe y col. (2004) y Zhang y col. (2009) han estudiado cepas del género *Janibacter* aisladas de suelos contaminados capaces de degradar gran variedad de compuestos aromáticos como naftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno y pireno. Cepas de *Brachybacterium* se han reportado también como degradadoras tanto de HAF como PAH, incluyendo en este grupo aislamientos en condiciones salinas (Velmurugan

y Arunachalam, 2009; Lily y col., 2013; Ranjit y col., 2014; Yetti y col., 2015; Koshlaf y Ball, 2017). El género *Cellulomonas*, también destacado por varios autores como degradador de HC (Koshlaf y Ball, 2017; Varjani, 2017) ha presentado secuencias en una comunidad aislada de suelo patagónico que fue capaz de degradar diesel en distintas concentraciones de sal (Riis y col., 2003).

Dado el potencial degradador observado en la comunidad tanto a nivel cultivable como por secuenciación masiva, sumado al alto porcentaje de PAH biodisponibles, se decidió en consecuencia agregar a los microcosmos el fertilizante NPK con el fin de evaluar una posible limitación de nutrientes. Los sistemas de suelo consisten en complejas matrices tanto por las distintas condiciones fisicoquímicas que pueden presentar como por la diversidad biológica, factores que influyen en la disponibilidad de nutrientes y, en consecuencia, sobre la efectividad de los procesos de biorremediación. Por esta razón, la relación C:N:P óptima debería testarse cada vez que se considere el desarrollo de un proceso de biorremediación (Martínez Álvarez y col., 2015). En el presente trabajo de tesis se eligió la relación C:N:P de 100:10:1, utilizada en muchos trabajos como valor guía para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos y para la síntesis de biomasa a partir de HC (Martínez Álvarez y col., 2015). Luego de la incubación durante 28 días con el fertilizante, el microcosmos m-C evidenció un estímulo en la degradación de PAH con respecto a lo registrado al día 21 de incubación, sugiriendo que los nutrientes habrían sido una limitante para el proceso de biodegradación. El agregado de nutrientes generó cambios en la comunidad bacteriana en m-C, disminuyendo los índices de riqueza, equitatividad y diversidad. Se evidenció un aumento de Actinobacteria y Proteobacteria a expensas principalmente de la disminución en Firmicutes y Bacteroidetes, Los géneros que llevaron al aumento de Actinobacteria fueron principalmente *Brevibacterium* y *Janibacter*.

A los 180 días de incubación, el sistema m-AM se diferenció del control en la eliminación de PAH (43%) (Figura V.6), mientras que los restantes microcosmos no se diferenciaron significativamente de m-C. Dentro de los PAH analizados, sólo la concentración de FEN fue significativamente menor con respecto a su valor inicial (Figura V.7). La composición de la comunidad bacteriana en m-AM luego de 180 días de tratamiento a nivel de género fue comparable a la que se presentó en m-C y en los

tratamientos de bioaumentación con las cepas de *Bacillus*, tanto individuales como co-inoculados con AM. Sin embargo, *Sphingobium* fue la principal diferencia hallada entre las comunidades de m-C y m-AM con porcentajes de: 0,7% y 2% respectivamente. *Sphingobium* spp. además de haberse reportado como género ubicuo degradador de PAH en varias ocasiones (Waigi y col., 2015; Festa y col., 2016; Koshlaf y Ball, 2017) es el taxón correspondiente a la cepa *Sphingobium* sp. AM inoculada en el microcosmos m-AM, cuya eficiencia en degradación de fenantreno ha sido probada en trabajos anteriores (Festa y col., 2013). En el bioaumentación con AM (m-AM) las evidencias de la degradación de FEN y de su supervivencia a través del análisis de secuenciación estarían indicando que hasta esta instancia la cepa AM habría logrado establecerse, sin provocar alteraciones en la composición de la comunidad (Figura V.16).

Luego de la incubación con NPK se observó una continuidad en la degradación de PAH en m-AM, alcanzando un 60% de degradación significativamente superior a lo registrado en m-C (Figura V.6). En esta instancia, la degradación fue exclusivamente a expensas de la eliminación de FLU y FEN (Figura V.8). Como se señaló en m-C, en m-AM el agregado de nutrientes generó cambios en la comunidad disminuyendo los índices de riqueza, equitatividad y diversidad (Tabla V.5). Una caída en la proporción de Proteobacteria llevó al aumento del porcentaje de Actinobacteria. Los géneros que llevaron al aumento de Actinobacteria fueron principalmente *Brevibacterium* y *Janibacter*; *Alcanivorax* y *Sphingobium* fueron los que mayormente reflejaron la disminución en Proteobacteria en m-AM, aunque de todas formas *Sphingobium* aún se mantuvo en mayor porcentaje (0,6%) con respecto a m-C (0,2%) (Figura V.17).

El efecto conocido como diversidad-invasión (Mallon y col., 2015b) establece que la riqueza y equitatividad son factores que contribuyen a la resistencia a la invasión de las comunidades microbianas nativas teniendo en cuenta que al ser más altos dichos parámetros, habrá mayor cantidad de especies diferentes y en consecuencia abarcarán mayor diversidad en habilidades para explotar diferentes tipos de recursos (Mallon y col., 2015b); bloqueando así el acceso del invasor a los recursos disponibles. Ante esta situación, un pulso de recursos podría llevar a que la oferta de los mismos supere su utilización, provocando el desacople del efecto diversidad-invasión y aumentando la probabilidad de la invasión, facilitando la coexistencia entre la comunidad y el invasor

(Mallon y col., 2015a). Los resultados obtenidos en los sistemas de microcosmos estudiados en este capítulo sugieren que el pulso de PAH agregado al suelo en estudio previamente al armado de los microcosmos, no habría formado parte de los recursos utilizados por la comunidad, permitiendo así la invasión del sistema por la cepa AM, que habría subsistido a expensas del FEN.

En el microcosmos m-B *srf+*, si bien no se observaron diferencias significativas con respecto a m-C en la degradación de PAH totales, a los 180 días de tratamiento se registró una concentración remanente de FEN significativamente menor que la inicial, aunque mayor que en m-AM (Figura V.7). Luego del agregado de NPK, no se observaron cambios significativos en la degradación de PAH con respecto a los datos de los 180 días de incubación. La comunidad bacteriana de m-B *srf+* fue similar a m-C, con excepción del género *Bacillus*, que se presentó con mayor abundancia relativa (Figura V.16). Estos resultados podrían relacionarse con la capacidad comprobada de la surfactina de potenciar la actividad degradadora (Tabla V.2) (Whang y col., 2008; de França y col., 2015; Mnif y col., 2017), que podría haber favorecido la degradación de FEN por miembros de la comunidad o incluso por la misma cepa de *Bacillus*, ya que no se puede descartar que pueda utilizar el FEN en conjunción con otras fuentes de carbono y/o en consorcios.

En el microcosmos m-AM+B *srf+*, donde se hubiera esperado un efecto sinérgico sobre la degradación de PAH, se registró un efecto negativo con respecto a la degradación observada en m-AM y no mostró diferencias con respecto a m-C (Figura V.6). La composición de la comunidad bacteriana fue similar a la del microcosmos m-C a lo largo del período de incubación (Figuras V.16 y V.17). En este caso, el efecto de competencia observado en los ensayos en cultivo líquido (Tabla V.2) podría haber impedido el establecimiento de la cepa AM.

El microcosmos m-AM/T, hacia los 180 días de incubación no reflejó diferencias significativas en la suma de PAH totales con respecto a m-C, aunque sí mostró una menor concentración de FEN (significativamente menor que m-AM) y FLU con respecto a las concentraciones iniciales respectivas (Figuras V.6 y V.7). Luego de 28 días de incubación de los microcosmos con NPK, se observó una importante estimulación en la degradación de PAH en el sistema m-AM/T, presentando un 77% de eliminación siendo

significativamente superior al control. Si bien este grado de degradación alcanzado no fue significativamente diferente al de m-AM en el mismo momento, m-AM/T evidenció la degradación de cada uno de los PAH presentes, incluyendo de alto peso molecular como el PIR (Figura V.8).

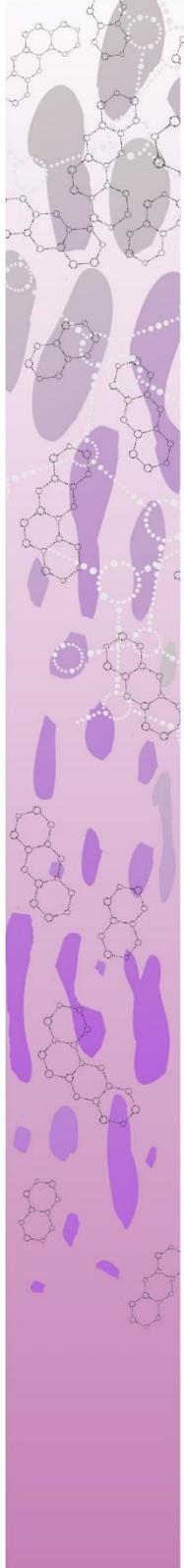
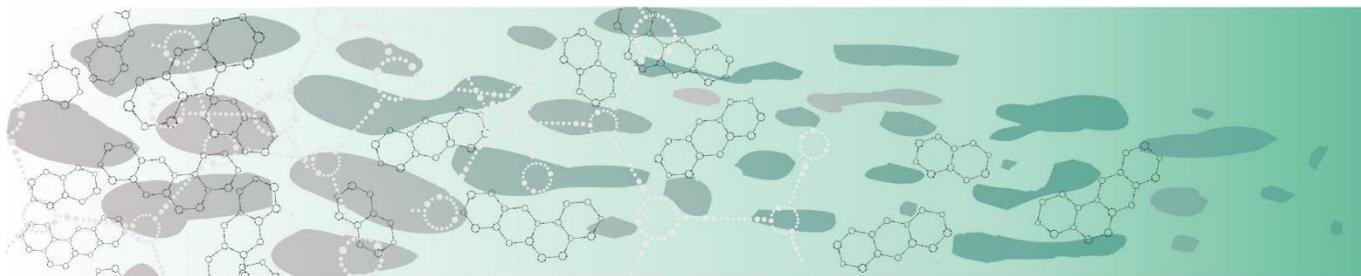
En m-AM/T el análisis de los datos de secuenciación masiva permitió registrar la supervivencia del género *Sphingobium* hasta el primer mes de incubación (Figura V.17) en simultáneo a grandes cambios en la comunidad bacteriana con respecto a m-C y m-AM (Figuras V.16 y V.17). A partir de los 85 días de incubación se registró una progresiva disminución en la proporción de secuencias relacionadas a *Sphingobium* spp., y la estructura de la comunidad continuó diferenciándose de m-C hasta el final del monitoreo (Figura V.16). Si bien no se analizó la secuenciación del ADN total de suelo del microcosmos m-T, impidiendo discriminar si los cambios en la comunidad se debieron al impacto del surfactante o de AM, las diferencias en la degradación en el microcosmos m-T con respecto a lo observado en m-AM y en m-AM/T, sugirió que la acción del Triton X-100 habría permitido el establecimiento e invasión de la cepa degradadora. Cuando una comunidad es sometida a disturbios, la densidad y diversidad tienden a disminuir, aumentando potencialmente los nichos disponibles o bien, en otras palabras, disminuyendo temporalmente la competencia. El establecimiento del invasor depende entonces de su habilidad para cubrir aquellos nichos en la comunidad afectada (Kinnunen y col., 2016). El impacto del surfactante sintético en este caso pudo evidenciarse en la disminución observada de los índices de riqueza y diversidad analizados (Tabla V.5). Asimismo, el efecto del Triton X-100 observado al momento de la inoculación de AM (Figura V.3) sobre la tensión interfacial y superficial podría haber significado una ventaja para el establecimiento de AM.

Los cambios en la comunidad bacteriana generados por el agregado de la NPK en m-AM/T, que ya se había diferenciado de los restantes microcosmos en monitoreos anteriores, difirieron de los observados en m-C y m-AM. En este caso, el indicador de riqueza disminuyó y un leve aumento se observó en la diversidad (Tabla V.5). La comunidad estuvo representada principalmente por el género *Brevibacterium* (25%) que fue seguido en menor medida por *Galbibacter* (10%, orden Flavobacteriales) e *Idiomarina* (9%, orden Alteromonadales). *Galbibacter* no es un género muy estudiado

hasta el presente; así como otros miembros dentro del filo Bacteroidetes, ha sido reportado en ambientes salinos (Li y col., 2013; He y col., 2015), aunque poco se conoce sobre su relación con suelos contaminados con hidrocarburos. Se han reportado en ambientes marinos contaminados cepas degradadoras de naftaleno asociadas al género *Idiomarina* (Hassanshahian y Boroujeni, 2016) y adicionalmente se encontraron secuencias relacionadas al mismo género en un consorcio halófilo degradador de fenantreno (Fathepure, 2014).

En los microcosmos inoculados con la cepa mutante m-B *srf*⁻ y m-AM+B *srf*⁻, se observó un efecto negativo sobre la actividad degradadora de FEN de la comunidad nativa y de la cepa AM a lo largo de todo el período de incubación, incluso luego del agregado de NPK. Esto podría explicarse por el efecto de competencia observado en medio líquido, donde se registró la inhibición de la degradación de FEN por la cepa AM en MML/FEN suplementado con 0,3% de peptona. En este mismo medio, la co-inoculación de AM con B *srf*⁺ productora de surfactina había llevado a alcanzar un grado de degradación cercano al 100%.

Los cambios en la comunidad nativa y en la matriz del suelo en estudio generados en m-AM/T a lo largo de la incubación probablemente por acción del Triton X-100, expusieron otro escenario para el establecimiento de la cepa AM y luego de la aplicación de nutrientes podrían haberse estimulado las interacciones entre esta cepa degradadora y la comunidad posiblemente a partir de un aumento en la disponibilidad de compuestos presentes en el sistema y/o a la utilización de Triton X-100 como fuente de carbono alternativa.



Capítulo VI

Conclusiones Generales

VI. Conclusiones generales

Los reportes bibliográficos de la aplicación de surfactantes como estrategia de bioestimulación en suelos contaminados con PAH han arrojado resultados contradictorios, evidenciándose tanto la estimulación de la biodegradación como efectos nulos o negativos sobre este proceso.

En el presente trabajo de tesis, se ha demostrado:

La importancia del análisis integral de los factores tanto fisicoquímicos como biológicos para comprender a los suelos como sistemas complejos, donde la interacción de dichos factores podrá llevar a diferentes resultados.

La aplicación del surfactante no-iónico Triton X-100 en concentraciones por debajo de la CMC en un suelo crónicamente contaminado logró acelerar el proceso de biorremediación al estimular la desorción de los PAH sorbidos a la matriz del suelo en tratamiento.

En un suelo crónicamente contaminado y contaminado artificialmente con PAH, el tratamiento con el surfactante Triton X-100 en combinación con el bioaumentación con la cepa degradadora de PAH *Sphingobium* sp. AM y el suplemento de nutrientes, permitió mejorar la eficiencia en la degradación de PAH con respecto a lo observado para cada uno de los tres tratamientos aplicados de forma individual: el suplemento con nutrientes, tratamiento con Triton X-100 y el bioaumentación con AM.

Independientemente del tipo de suelo en estudio y de su historia de contaminación, logró demostrarse que el surfactante sintético Triton X-100 produce cambios en la estructura y composición de las comunidades bacterianas, que en combinación con los factores fisicoquímicos de cada sistema pueden llevar a resultados benéficos o perjudiciales para el proceso de biorremediación. Estos cambios han probado ser perjudiciales para la biorremediación en el suelo estudiado en el Capítulo IV cuando se aplicó el surfactante en la CMC, pero beneficiosos en las concentraciones sub-CMC. En el Capítulo V, el tratamiento únicamente con Triton X-100 resultó perjudicial para la biorremediación pero al combinarse con el bioaumentación con AM y

suplemento con nutrientes, los cambios que generó mejoraron la eficiencia del proceso de biorremediación.

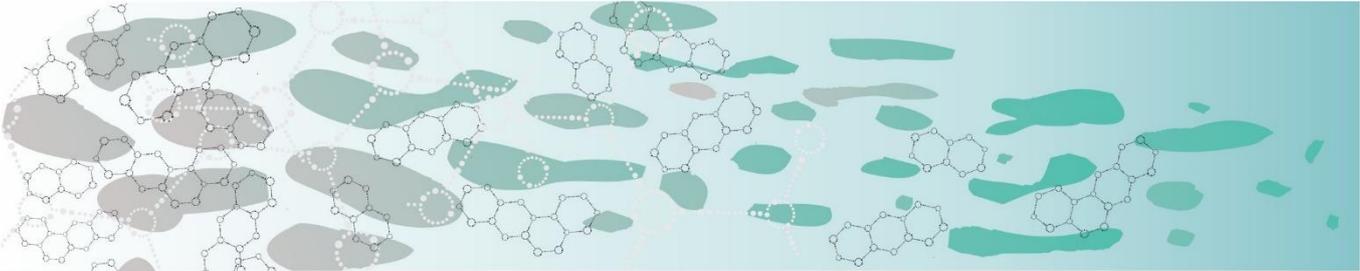
El tratamiento con Triton X-100, independientemente del suelo en estudio, aceleró la degradación de los hidrocarburos alifáticos.

En cultivos en medio líquido, se confirmó la capacidad de la cepa *Bacillus subtilis* NCIB3610 (B *srf*+) de producir y secretar el biosurfactante surfactina. Este bioproducto, en la co-inoculación de B *srf*+ con AM en medio mineral líquido con fenantreno (200 mg/L) suplementado con 0,3% de peptona, demostró mejorar el grado de degradación de dicho PAH por AM.

El bioaumentación con B *srf*+ en un suelo crónicamente contaminado con PAH evitó el aumento de la fracción sorbida de dichos hidrocarburos a la matriz del suelo de forma comparable a lo observado en el mismo suelo tratado con el surfactante sintético Triton X-100. El bioaumentación mencionado, logró un grado de degradación de fenantreno mayor a lo registrado en el sistema control, aunque esto no se vio reflejado en el porcentaje de degradación de la suma total de PAH.

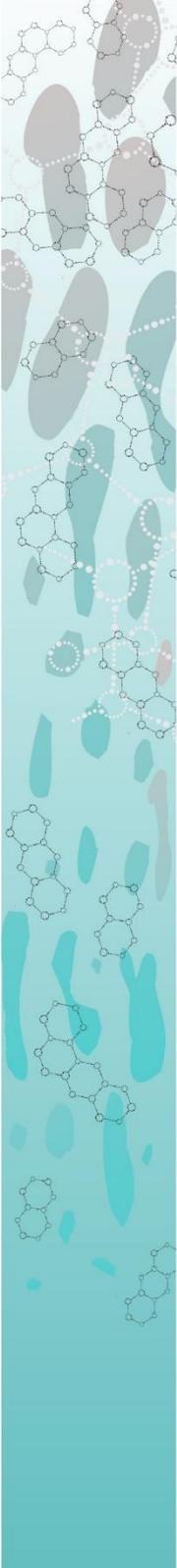
El bioaumentación con la cepa AM en combinación con la cepa B *srf*+, a pesar de haber impedido la sorción de los PAH al suelo, no logró mejorar la efectividad del proceso de biorremediación de PAH; por el contrario, provocó un efecto negativo en la degradación de fenantreno debido probablemente a la competencia entre ambas cepas.

La biodisponibilidad de PAH en suelos crónicamente contaminados, contrariamente a lo postulado, ha demostrado no ser el principal factor limitante de la biodegradación de estos hidrocarburos, pudiendo depender asimismo de la capacidad degradadora de la comunidad microbiana nativa y de la disponibilidad de nutrientes.



Capítulo VII

Bibliografía



VII. Bibliografía

- Abbasian, F., Palanisami, T., Megharaj, M., Naidu, R., Lockington, R., Ramadass, K., 2016. Microbial diversity and hydrocarbon degrading gene capacity of a crude oil field soil as determined by metagenomics analysis. *Biotechnol. Prog.* 32, 638–648. <https://doi.org/10.1002/btpr.2249>
- Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M., Abdel-Haleem Hassouna, N., 2008. Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. *Appl Biochem Biotechnol* 305–325. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8155-x>
- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Pet.* 25, 107–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- Abed, R.M.M., Al-Sabahi, J., Al-Maqrashi, F., Al-Habsi, A., Al-Hinai, M., 2014. Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the Sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 89, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.006>
- Adrion, A.C., Nakamura, J., Shea, D., Aitken, M.D., 2016. Screening Nonionic Surfactants for Enhanced Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Remaining in Soil after Conventional Biological Treatment. *Environ. Sci. Technol.* 50, 3838–3845. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05243>
- Agudo, A., 2009. Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) Acercamiento a su problemática como riesgo laboral. *Secr. Salud y medio Ambient. MCA-UGT.*
- Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A., Maier, R.M., 2000. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3262–3268. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3262-3268.2000>
- Aleti, G., Sessitsch, A., Brader, G., 2015. Genome mining: Prediction of lipopeptides and

- polyketides from *Bacillus* and related Firmicutes. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 13, 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.03.003>
- Anderson, M.A., Hung, A.Y., Mills, D., Scott, M.S., 1995. Factors affecting the surface tension of soil solutions and solutions of humic acids. *Soil Sci.* 160.
- Atlas, R., Bartha, R. 2001. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. 4ta. ed. Addison Wesley. Madrid, España. 677 p.
- Bamforth, S.M., Singleton, I., 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 723–736. <https://doi.org/10.1002/jctb.1276>
- Bastida, F., Jehmlich, N., Lima, K., Morris, B.E.L., Richnow, H.H., Hernández, T., von Bergen, M., García, C., 2016. The ecological and physiological responses of the microbial community from a semiarid soil to hydrocarbon contamination and its bioremediation using compost amendment. *J. Proteomics* 135, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.023>
- Bautista, L.F., Sanz, R., Molina, M.C., González, N., Sánchez, D., 2009. Effect of different non-ionic surfactants on the biodegradation of PAHs by diverse aerobic bacteria. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 63, 913–922. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.06.013>
- Bezza, F.A., Chirwa, E.M.N., 2017. The role of lipopeptide biosurfactant on microbial remediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil. *Chem. Eng. J.* 309, 563–576. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.055>
- Bezza, F.A., Chirwa, E.M.N., 2016. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere* 144, 635–644. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.027>
- Birdwell, J.E., Engel, A.S., 2010. Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV–Vis absorbance and fluorescence spectroscopy. *Org. Geochem.* 41, 270–280. <https://doi.org/10.1016/J.ORGGEOCHEM.2009.11.002>
- Bosio, G.N., David Gara, P., García Einschlag, F.S., Gonzalez, M.C., Del Panno, M.T., Mártire, D.O., 2008. Photodegradation of Soil Organic Matter and its Effect on

- Gram-negative Bacterial Growth. *Photochem. Photobiol.* 84, 1126–1132.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00274.x>
- Bouchez-Naïtali, M., Vandecasteele, J.P., 2008. Biosurfactants, an help in the biodegradation of hexadecane? The case of *Rhodococcus* and *Pseudomonas* strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1901–1907.
<https://doi.org/10.1007/s11274-008-9691-9>
- Brzeszcz, J., Steliga, T., Kapusta, P., Turkiewicz, A., Kaszycki, P., 2016. r-strategist versus K-strategist for the application in bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 106, 41–52.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.10.001>
- Bueno-Montes, M., Springael, D., Ortega-Calvo, J.J., 2011. Effect of a nonionic surfactant on biodegradation of slowly desorbing PAHs in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3019–3026. <https://doi.org/10.1021/es1035706>
- Burns, R.G., DeForest, J.L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R.L., Stromberger, M.E., Wallenstein, M.D., Weintraub, M.N., Zoppini, A., 2013. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biol. Biochem.* 58, 216–234. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.11.009>
- Cébron, A., Norini, M.P., Beguiristain, T., Leyval, C., 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J. Microbiol. Methods* 73, 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.009>
- Chaillan, F., Le Flèche, A., Bury, E., Phantavong, Y., Grimont, P., Saliot, A., Oudot, J., 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Res. Microbiol.* 155, 587–595.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.04.006>
- Chang, Y.T., Thirumavalavan, M., Lee, J.F., 2010. Effects of PAH biodegradation in the presence of non-ionic surfactants on a bacterial community and its exoenzymatic activity. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* 45, 421–431. <https://doi.org/10.1080/10934520903540141>
- Chao, A., Chiu, C.-H., Jost, L., 2010. Phylogenetic diversity measures based on Hill

- numbers. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 3599–3609.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0272>
- Chen, H.-J., Tseng, D.-H., Huang, S.-L., 2005. Biodegradation of octylphenol polyethoxylate surfactant Triton X-100 by selected microorganisms. *Bioresour. Technol.* 96, 1483–1491. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.11.013>
- Chen, H.J., Huang, S.L., Tseng, D.H., 2004. Aerobic biotransformation of octylphenol polyethoxylate surfactant in soil microcosms. *Environ. Technol.* 25, 201–210.
<https://doi.org/10.1080/09593330409355453>
- Chen, W.C., Juang, R.S., Wei, Y.H., 2015. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochem. Eng. J.* 103, 158–169.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.07.009>
- Chiu, C.H., Jost, L., Chao, A., 2014. Phylogenetic beta diversity, similarity, and differentiation measures based on Hill numbers. *Ecol. Monogr.* 84, 21–44.
<https://doi.org/10.1890/12-0960.1>
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37, D141–D145. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn879>
- Colores, G.M., Macur, R.E., Ward, D.M., Inskeep, W.P., 2000. Molecular analysis of surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2959. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2959-2964.2000>
- Colwell, R.K., Elsensohn, J.E., 2014. EstimateS turns 20: statistical estimation of species richness and shared species from samples, with non-parametric extrapolation. *Ecography (Cop.)*. 37, 609–613. <https://doi.org/10.1111/ecog.00814>
- Coppotelli, B.M., Ibarrolaza, A., Dias, R.L., Del Panno, M.T., Berthe-Corti, L., Morelli, I.S., 2010. Study of the degradation activity and the strategies to promote the bioavailability of phenanthrene by *Sphingomonas paucimobilis* Strain 20006FA. *Microb. Ecol.* 59, 266–276. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9563-3>

- Cornforth, D.M., Foster, K.R., 2013. Competition sensing: The social side of bacterial stress responses. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 285–293.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2977>
- Das, K., Mukherjee, A.K., 2007. Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains: Role of biosurfactants in enhancing bioavailability. *J. Appl. Microbiol.* 102, 195–203.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03070.x>
- Das, N., Chandran, P., 2011. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants : An Overview. *Biotechnol. Res. Int.* 2011.
<https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- Dastgheib, S.M.M., Amoozegar, M.A., Khajeh, K., Shavandi, M., Ventosa, A., 2012. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 789–798.
<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3706-4>
- David Gara, P.M., Rosso, J.A., Martin, M. V, Bosio, G.N., Gonzalez, M.C., Martire, D.O., 2011. Characterization of humic substances and their role in photochemical processes of environmental interest. *Trends Photochem. Photobiol.* 13, 51–70.
- de França, Í.W.L., Lima, A.P., Lemos, J.A.M., Lemos, C.G.F., Melo, V.M.M., De Sant’ana, H.B., Gonçalves, L.R.B., 2015. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catal. Today* 255, 10–15.
<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2015.01.046>
- de la Cueva, S.C., Hernández-Rodríguez, C., Soto-Cruz, N.O., Rojas Contreras, J.A., López Miranda, J., 2016. Changes in Bacterial Populations During Bioremediation of Soil Contaminated with Petroleum Hydrocarbons. *Water, Air, Soil Pollut.* 227.
<https://doi.org/10.1007/s11270-016-2789-z>
- de Maagd, P.G.-J., Ten Hulscher, D.T.E.M., Van Den Heuvel, H., Opperhuizen, A., Sijm, D.T.H.M., 1998. Physicochemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons: Aqueous solubilities, n-octanol/water partition coefficients, and Henry’s law constants. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 251–257. <https://doi.org/10.1897/1551-5028>

- Dean, S.M., Jin, Y., Cha, D.K., Wilson, S. V, Radosevich, M., 2001. Phenanthrene Degradation in Soils Co-Inoculated with Phenanthrene-Degrading and Biosurfactant-Producing Bacteria. *J. Environ. Qual.* 30, 1126–1133.
- Desai, C., Pathak, H., Madamwar, D., 2010. Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. *Bioresour. Technol.* 101, 1558–1569. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.10.080>
- Dowd, S.E., Callaway, T.R., Wolcott, R.D., Sun, Y., McKeethan, T., Hagevoort, R.G., Edrington, T.S., 2008a. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-125>
- Dowd, S.E., Sun, Y., Wolcott, R.D., Domingo, A., Carroll1, J.A., 2008b. Bacterial Tag—Encoded FLX Amplicon Pyrosequencing (bTEFAP) for Microbiome Studies: Bacterial Diversity in the Ileum of Newly Weaned Salmonella-Infected Pigs. *Foodborne Pathog. Dis.* 5. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0107>
- Dowd, S.E., Zaragoza, J., Rodriguez, J.R., Oliver, M.J., Payton, P.R., 2005. Windows .NET Network Distributed Basic Local Alignment Search Toolkit (W.ND-BLAST). *BMC Bioinformatics* 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-6-93>
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Elgh-Dalgren, K., Arwidsson, Z., Ribé, V., Waara, S., von Kronhelm, T., van Hees, P.A.W., 2011. Bioremediation of a Soil Industrially Contaminated by Wood Preservatives—Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Monitoring of Coupled Arsenic Translocation. *Water, Air, Soil Pollut.* 214, 275–285. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0422-0>
- Elliot, R., Singhal, N., Swift, S., 2011. Surfactants and bacterial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil-unlocking the targets. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 41, 78–124. <https://doi.org/10.1080/00102200802641798>
- Fathepure, B.Z., 2014. Recent studies in microbial degradation of petroleum

- hydrocarbons in hypersaline environments. *Front. Microbiol.* 5, 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00173>
- Festa, S., 2016. Biorremediación de suelos contaminados con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos: una visión molecular. Facultad de Ciencias Exactas - Universidad Nacional de La Plata.
- Festa, S., Coppotelli, B.M., Morelli, I.S., 2013. Bacterial diversity and functional interactions between bacterial strains from a phenanthrene-degrading consortium obtained from a chronically contaminated-soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.06.006>
- Festa, S., Macchi, M., Cortés, F., Morelli, I.S., Coppotelli, B.M., 2016. Monitoring the impact of bioaugmentation with a PAH-degrading strain on different soil microbiomes using pyrosequencing. *Fed. Eur. Microbiol. Soc.* 1–12.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiw125>
- Fortin, N., Beaumier, D., Lee, K., Greer, C.W., 2004. Soil washing improves the recovery of total community DNA from polluted and high organic content sediments. *J. Microbiol. Methods* 56, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.10.006>
- Franska, M., Franski, R., Szymanski, A., Lukaszewski, Z., 2003. A central fission pathway in alkylphenol ethoxylate biodegradation. *Water Res.* 37, 1005–1014.
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00444-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00444-X)
- Friedrich, M., Grosser, R.J., Kern, E.A., Inskeep, W.P., Ward, D.M., 2000. Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: Molecular analysis of enrichments and isolates suggests selection based on bioavailability. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2703–2710. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2703-2710.2000>
- Frings, E., Kunte, H.J., Galinski, E.A., 1993. Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: Occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine. *FEMS Microbiol. Lett.* 109, 25–32.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06138.x>
- García, Y., Ramírez, W., Sánchez, S., 2012. Indicadores de la calidad de los suelos: una nueva manera de evaluar este recurso. *Pastos y Forrajes* 35, 125–138.

- Ghosh, I., Mukherji, S., 2016. Diverse effect of surfactants on pyrene biodegradation by a *Pseudomonas* strain utilizing pyrene by cell surface hydrophobicity induction. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 108, 67–75.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.010>
- Golby, S., Ceri, H., Gieg, L.M., Chatterjee, I., Marques, L.L.R., Turner, R.J., H, Y., N, K., LM, G., 2012. Evaluation of microbial biofilm communities from an Alberta oil sands tailings pond. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 240–250.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01212.x>
- Hamamura, N., Aro, D.J., 2000. Isolation and characterization of alkane-utilizing *Nocardioides* sp. strain CF8. *FEMS Microbiol.* 186, 21–26.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00830.x>
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* 169, 1–15.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>
- Harms, G., Layton, A.C., Dionisi, H.M., Gregory, I.R., Garrett, V.M., Hawkins, S.A., Robinson, K.G., Sayler, G.S., 2003. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Env. Sci Technol* 37, 343–351.
<https://doi.org/10.1021/es0257164>
- Harwati, T.U., Kasai, Y., Kodama, Y., Susilaningih, D., Watanabe, K., 2007. Characterization of Diverse Hydrocarbon-Degrading Bacteria Isolated from Indonesian Seawater. *Microbes Environ.* 22, 412–415.
<https://doi.org/10.1264/jsme2.22.412>
- Hassanshahian, M., Boroujeni, N.A., 2016. Enrichment and identification of naphthalene-degrading bacteria from the Persian Gulf. *Mar. Pollut. Bull.* 107, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.020>
- He, S., Niu, Q., Li, Y.-Y., Nie, Y., Hou, M., 2015. Factors associated with the diversification of the microbial communities within different natural and artificial saline environments. *Ecol. Eng.* 83, 476–484.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.06.029>
- Hill, M.O., 1973. Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences.

- Ecology 54, 427–432.
- Hua, Z., Chen, J., Lun, S., Wang, X., 2003. Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. *Water Res.* 37, 4143–4150. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00380-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00380-4)
- Hughes, J.B., Hellmann, J.J., Ricketts, T.H., Bohannan, B.J.M., 2001. Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4399–4406. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4399-4406.2001>
- Ishiguro, M., Koopal, L.K., 2016. Surfactant adsorption to soil components and soils. *Adv. Colloid Interface Sci.* 231, 59–102. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.01.006>
- Jiang, L., Song, M., Luo, C., Zhang, D., Zhang, G., 2015. Novel Phenanthrene-Degrading Bacteria Identified by DNA-Stable Isotope Probing. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130846>
- Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.* 133, 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.015>
- Joy, S., Rahman, P.K.S.M., Sharma, S., 2017. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chem. Eng. J.* 317, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.054>
- Kang, S., Rodrigues, J.L.M., Ng, J.P., Gentry, T.J., 2016. Hill number as a bacterial diversity measure framework with high-throughput sequence data. *Sci. Rep.* 6, 38263. <https://doi.org/10.1038/srep38263>
- Kearns, D.B., Losick, R., 2003. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 49, 581–590. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03584.x>
- Kinnunen, M., Dechesne, A., Proctor, C., Hammes, F., Johnson, D., Quintela-Baluja, M., Graham, D., Daffonchio, D., Fodelianakis, S., Hahn, N., Boon, N., Smets, B.F., 2016. A conceptual framework for invasion in microbial communities. *ISME J.* 10, 2773–2779. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.75>

- Kinsella, K., Schulthess, C.P., Morris, T.F., Stuart, J.D., 2009. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 41, 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.11.019>
- Koshlaf, E., S Ball, A., 2017. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiol.* 3, 25–49. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.1.25>
- Kumar, M., Leon, V., De Sisto Materano, A., Ilzins, O.A., 2006. Enhancement of Oil Degradation by Co-culture of Hydrocarbon Degrading and Biosurfactant Producing Bacteria. *Polish J. Microbiol.* 55, 139–146.
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., Venkateswarlu, K., Lee, Y.B., Naidu, R., Megharaj, M., 2017. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere* 168, 944–968. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.115>
- Laha, S., Luthy, R.G., 1991. Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems. *Environ. Sci. Technol.* 25, 1920–1930. <https://doi.org/10.1021/es00023a013>
- Lai, C., Huang, Y.-C., Wei, Y., Chang, J., 2009. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 167, 609–614. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.017>
- Lamichhane, S., Bal Krishna, K.C., Sarukkalige, R., 2017. Surfactant-enhanced remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *J. Environ. Manage.* 199, 46–61. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.037>
- Li, C., Lai, Q., Fu, Y., Chen, S., Shao, Z., 2013. *Galbibacter marinus* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 1427–1430. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.044305-0>
- Li, J.L., Chen, B.H., 2009. Surfactant-mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Materials (Basel).* 2, 76–94. <https://doi.org/10.3390/ma2010076>
- Lillis, L., Clipson, N., Doyle, E., 2010. Quantification of catechol dioxygenase gene

- expression in soil during degradation of 2,4-dichlorophenol. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 363–369. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00906.x>
- Lily, M.K., Bahuguna, A., Bhatt, K.K., Dangwal, K., 2013. Degradation of Anthracene by a novel strain *Brachybacterium paraconglomeratum* BMIT637C (MTCC 9445). *Int. J. Environ. Sci.* 3. <https://doi.org/10.6088/ijes.2013030400003>
- Lim, M.W., Lau, E. Von, Poh, P.E., 2016. A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil — Present works and future directions. *Mar. Pollut. Bull.* 109, 14–45. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.023>
- Liu, S., Guo, C., Liang, X., Wu, F., Dang, Z., 2016. Nonionic surfactants induced changes in cell characteristics and phenanthrene degradation ability of *Sphingomonas* sp. GY2B. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 129, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.03.035>
- Lladó Fernández, S., 2012. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas. Universitat de Barcelona.
- Lladó, S., Covino, S., Solanas, A.M., Petruccioli, M., D’annibale, A., Viñas, M., 2015. Pyrosequencing reveals the effect of mobilizing agents and lignocellulosic substrate amendment on microbial community composition in a real industrial PAH-polluted soil. *J. Hazard. Mater.* 283, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.065>
- Lladó, S., Covino, S., Solanas, A.M., Viñas, M., Petruccioli, M., D’annibale, A., 2013. Comparative assessment of bioremediation approaches to highly recalcitrant PAH degradation in a real industrial polluted soil. *J. Hazard. Mater.* 248, 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.020>
- Lu, X.-Y., Zhang, T., Fang, H.H.-P., 2011. Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1357–1371. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3072-7>
- Lu, X., Zhang, T., Han-Ping Fang, H., Leung, K.M.Y., Zhang, G., 2011. Biodegradation of naphthalene by enriched marine denitrifying bacteria. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.11.004>

- Madueño, L., 2013. Obtención de inoculantes bacterianos y evaluación de su aplicación en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) de la Patagonia semiárida. Universidad Nacional de La Plata-Facultad de Ciencias Exactas.
- Makkar, R.A.S.M., Rockne, K.J., 2003. Comparison of Synthetic Surfactants and Biosurfactants in Enhancing Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2280–2292. <https://doi.org/10.1897/02-472>
- Mallon, C.A., Poly, F., Le Roux, X., Marring, I., van Elsas, J.D., Salles, J.F., 2015a. Resource pulses can alleviate the biodiversity-invasion relationship in soil microbial communities, in: *Soil Microbial Invasions*. p. 25.
- Mallon, C.A., van Elsas, J.D., Salles, J.F., 2015b. Microbial Invasions : The Process , Patterns , and Mechanisms. *Trends Microbiol.* 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.013>
- Mao, X., Jiang, R., Xiao, W., Yu, J., 2015. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. *J. Hazard. Mater.* 285, 419–435. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.009>
- Martínez Álvarez, L.M., Lo Balbo, A., Mac Cormack, W.P., Ruberto, L.A.M., 2015. Bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated Antarctic soil: Optimization of a biostimulation strategy using response-surface methodology (RSM). *Cold Reg. Sci. Technol.* 119, 61–67. <https://doi.org/10.1016/J.COLDREGIONS.2015.07.005>
- McLoon, A.L., Guttenplan, S.B., Kearns, D.B., Kolter, R., Losick, R., 2011. Tracing the domestication of a biofilm-forming bacterium. *J. Bacteriol.* 193, 2027–2034. <https://doi.org/10.1128/JB.01542-10>
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., Naidu, R., 2011. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ. Int.* 37, 1362–1375. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.003>
- Mnif, I., Ellouze-Chaabouni, S., Ayedi, Y., Ghribi, D., 2014. Treatment of Diesel- and Kerosene-Contaminated Water by *B. subtilis* SPB1 Biosurfactant-Producing Strain. *Water Environ. Res.* 86, 707–716.

<https://doi.org/10.2175/106143014X13975035525780>

Mnif, I., Sahnoun, R., Ellouz-Chaabouni, S., Ghribi, D., 2017. Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. *Process Saf. Environ. Prot.* 109, 72–81.

<https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.02.002>

Mora, V.C., Madueño, L., Peluffo, M., Rosso, J.A., Del Panno, M.T., Morelli, I.S., 2014. Remediation of phenanthrene-contaminated soil by simultaneous persulfate chemical oxidation and biodegradation processes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 7548–7556. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2687-0>

Morán, A.C., Olivera, N., Commendatore, M., Esteves, J.L., Siñeriz, F., 2000.

Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* 09. *Biodegradation* 11, 65–71.

<https://doi.org/10.1023/A:1026513312169>

Morelli, I.S., Del Panno, M.T., De Antoni, G.L., Pinceira, M.T., 2005. Laboratory study on the bioremediation of petrochemical sludge-contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 55, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2005.03.001>

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2005.03.001>

Moscoso, F., Tejjiz, I., Sanromán, M.A., Deive, F.J., 2012. On the Suitability of a Bacterial Consortium To Implement a Continuous PAHs Biodegradation Process in a Stirred Tank Bioreactor. *Ind. Eng. Chem. Res.* 51, 15895–15900.

<https://doi.org/10.1021/ie3021736>

Muangchinda, C., Chavanich, S., Viyakarn, V., Watanabe, K., Imura, S., Vangnai, A.S., Pinyakong, O., 2015. Abundance and diversity of functional genes involved in the degradation of aromatic hydrocarbons in Antarctic soils and sediments around Syowa Station. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 4725–4735.

<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3721-y>

Mulligan, C.N., 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133, 183–198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>

Mulligan, C.N., Yong, R.N., 2004. Natural attenuation of contaminated soils. *Environ. Int.* 30, 587–601. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2003.11.001>

- Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review. *Eng. Geol.* 60, 371–380.
[https://doi.org/10.1016/S0013-7952\(00\)00117-4](https://doi.org/10.1016/S0013-7952(00)00117-4)
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Nagata, S., Wang, C.X., 2005. Efficient utilization of ectoine by halophilic *Brevibacterium* species and *Escherichia coli* subjected to osmotic downshock. *J. Biosci. Bioeng.* 99, 61–67. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.061>
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Lan Di, L., Pietramellar, G., Renell, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 54, 655.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2003.00556.x>
- Northcott, G.L., Jones, K.C., 2001. Partitioning, Extractability, and Formation of Nonextractable PAH Residues in Soil. 2. Effects on Compound Dissolution Behavior. *Environ. Sci. Technol.* 35, 1111–1117.
<https://doi.org/10.1021/es000072q>
- Oksanen, J., F. Guillaume Blanchet, R.K., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., M. Henry H. Stevens, H.W., 2015. Package “vegan.” R Packag. version 2.3-4.
- Ortega-Calvo, J.J., Tejeda-Agredano, M.C., Jimenez-Sanchez, C., Congiu, E., Sungthong, R., Niqui-Arroyo, J.L., Cantos, M., 2013. Is it possible to increase bioavailability but not environmental risk of PAHs in bioremediation? *J. Hazard. Mater.* 261, 733–745. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.03.042>
- Paria, S., 2008. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Adv. Colloid Interface Sci.* 138, 24–58.
<https://doi.org/10.1016/J.CIS.2007.11.001>
- Pearlman, R.S., Yalkowsky, samuel. H., Banerjee, S., 1984. Water Solubility of Polynuclear Aromatic and Heteroaromatic Compounds. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 13, 555–562.

- Pearson, J.P., Pesci, E.C., Iglewski, B.H., 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 179, 5756–67.
<https://doi.org/10.1128/JB.179.18.5756-5767.1997>
- Peluffo, M., 2016. Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos mediante oxidación química. Universidad Nacional de La Plata.
- Pirnik, M.P., Atlas, R.M., Bartha, R., 1974. Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: normal and branched alkanes. *J. Bacteriol.* 119, 868–878.
- Porta, J., López-Acevedo, M., Roquero, C., 2003. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Mundi-Prensa 3a edición, 929.
- Providenti, M.A., Flemming, C.A., Lee, H., Trevors, J.T., 1995. Effect of addition of rhamnolipid biosurfactants or rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17, 15–26.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1995.tb00123.x>
- Ranjit, D., Poonam, C., Singh, O.A., Priyadarshini, D., Sufia K., K., 2014. Community composition and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) biodegradation potential of microorganism isolated from oily sludge. *J. Environ. Res. Dev.* 9, 38–49.
- Reasoner, D.J., Geldreich, E.E., 1985. A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1–7.
- Ren, X., Zeng, G., Tang, L., Wang, J., Wan, J., Liu, Y., Yu, J., Yi, H., Ye, S., Deng, R., 2017. Sorption, transport and biodegradation – An insight into bioavailability of persistent organic pollutants in soil. *Sci. Total Environ.* 1154–1163.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.089>
- Riding, M.J., Doick, K.J., Martin, F.L., Jones, K.C., Semple, K.T., 2013. Chemical measures of bioavailability/bioaccessibility of PAHs in soil: Fundamentals to application. *J. Hazard. Mater.* 261, 687–700. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.03.033>
- Riis, V., Kleinstüber, S., Babel, W., 2003. Influence of high salinities on the degradation of diesel fuel by bacterial consortia. *Can. J. Microbiol.* 49, 713–721.
<https://doi.org/10.1139/w03-083>

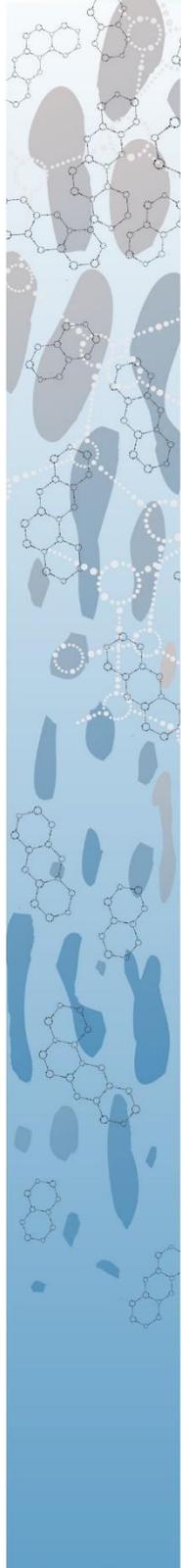
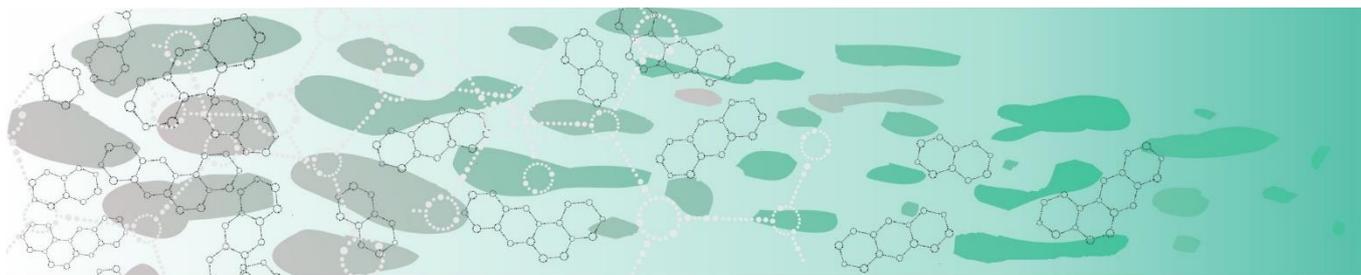
- Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J.P., Head, M., Head, I.M., 2002. Robust Hydrocarbon Degradation and Dynamics of Bacterial Communities during Nutrient-Enhanced Oil Spill Bioremediation Robust Hydrocarbon Degradation and Dynamics of Bacterial Communities during Nutrient-Enhanced Oil Spill Bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5537–5548. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5537>
- Rosenberg, E., Ron, E.Z., 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 154–162. <https://doi.org/10.1007/s002530051502>
- Rungrassamee, W., Klanchui, A., Chaiyapechara, S., Maibunkaew, S., Tangphatsornruang, S., Jiravanichpaisal, P., Karoonuthaisiri, N., 2013. Bacterial Population in Intestines of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) under Different Growth Stages. *PLoS One* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060802>
- Saito, A., Iwabuchi, T., Harayama, S., 1999. Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioides* sp. KP7. *Chemosphere* 38, 1331–1337. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00534-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00534-7)
- Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A., Harms, H., 2004. Peer Reviewed: Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment is Complicated. *Environ. Sci. Technol.* 38, 228A–231A. <https://doi.org/10.1021/es040548w>
- Setia, R., Marschner, P., Baldock, J., Chittleborough, D., Smith, P., Smith, J., 2011. Salinity effects on carbon mineralization in soils of varying texture. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1908–1916. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.05.013>
- Shahsavari, E., Aburto-Medina, A., Taha, M., Ball, A.S., 2016. A quantitative PCR approach for quantification of functional genes involved in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soils. *MethodsX* 3, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2016.02.005>
- Singleton, D.R., Adrion, A.C., Aitken, M.D., 2016. Surfactant-induced bacterial community changes correlated with increased polycyclic aromatic hydrocarbon

- degradation in contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 10165–10177.
<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7867-z>
- Sokal, R.R., Michener, C.D., 1958. *A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships*. University of Kansas.
- Souza, E.C., Vessoni-Penna, T.C., De Souza Oliveira, R.P., 2014. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 89, 88–94.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.01.007>
- Stokes, J.D., Paton, G.I., Semple, K.T., 2006. Behaviour and assessment of bioavailability of organic contaminants in soil: relevance for risk assessment and remediation. *Soil Use Manag.* 21, 475–486. <https://doi.org/10.1079/SUM2005347>
- Sun, M., Luo, Y., Christie, P., Jia, Z., Li, Z., Teng, Y., 2012. Methyl- β -cyclodextrin enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and associated microbial activity in contaminated soil. *J. Environ. Sci.* 24, 926–933.
[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60865-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60865-6)
- Tamaki, H., Wright, C.L., Li, X., Lin, Q., Hwang, C., Wang, S., Thimmapuram, J., Kamagata, Y., Liu, W.-T., 2011. Analysis of 16S rRNA Amplicon Sequencing Options on the Roche/454 Next-Generation Titanium Sequencing Platform. *PLoS One* 6, 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025263>
- Tejeda-Agredano, M.C., Gallego, S., Vila, J., Grifoll, M., Ortega-Calvo, J.J., Cantos, M., 2013. Influence of the sunflower rhizosphere on the biodegradation of PAHs in soil. *Soil Biol. Biochem.* 57, 830–840.
- Thomson, B.C., Ostle, N.J., McNamara, N.P., Whiteley, A.S., Griffiths, R.I., 2010. Effects of sieving, drying and rewetting upon soil bacterial community structure and respiration rates. *J. Microbiol. Methods* 83, 69–73.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.07.021>
- Trenz, S.P., Engesser, K.H., Fischer, P., Knackmuss, H.-J., 1994. Degradation of Fluorene by *Brevibacterium* sp. Strain DPO 1361 : a Novel C-C Bond Cleavage Mechanism via. *J. Bacteriol.* 176, 789–795.
- Tzilivakis, J., Lewis, K.A., Williamson, A.R., 2005. A prototype framework for assessing

- risks to soil functions. *Environ. Impact Assess. Rev.* 25, 181–195.
<https://doi.org/10.1016/j.eiar.2004.02.003>
- Varjani, S.J., 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresour. Technol.* 223, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
- Vecchioli, G.I., Del Panno, M.T., Paineira, M.T., 1990. Use of selected autochthonous soil bacteria to enhanced degradation of hydrocarbons in soil. *Environ. Pollut.* 67, 249–258. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(90\)90190-N](https://doi.org/10.1016/0269-7491(90)90190-N)
- Velmurugan, A.M., Arunachalam, C., 2009. Bioremediation of phenol and naphthalene by *Bacillus* species and *Brachybacterium* species isolated from pharma soil sample. *Curr. Worl Environ.* 4, 299–306.
- Volkering, F., Breure, A.M., Van Andel, J.G., Rulkens, W.H., 1995. Influence of Nonionic Surfactants on Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1699–1705. <https://doi.org/0099-2240/95>
- Waigi, M.G., Kang, F., Goikavi, C., Ling, W., Gao, Y., 2015. Phenanthrene biodegradation by sphingomonads and its application in the contaminated soils and sediments: A review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 104, 333–349.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.06.008>
- Wang, L., Li, F., Zhan, Y., Zhu, L., 2016. Shifts in microbial community structure during in situ surfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6630-4>
- Whang, L.M., Liu, P.W.G., Ma, C.C., Cheng, S.S., 2008. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *J. Hazard. Mater.* 151, 155–163.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.05.063>
- Wrenn, B.A., Venosa, A.D., 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Can. J. Microbiol.* 42, 252–258. <https://doi.org/https://doi.org/10.1139/m96-037>

- Wu, M., Dick, W.A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., Xu, L., Zhang, M., Chen, L., 2016. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 107, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.11.019>
- Wu, M., Ye, X., Chen, K., Li, W., Yuan, J., Jiang, X., 2017. Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil. *Environ. Pollut.* 223, 657–664. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.079>
- Yamazoe, A., Yagi, O., Oyaizu, H., 2004. Biotransformation of fluorene, diphenyl ether, dibenzo-p-dioxin and carbazole by *Janibacter* sp. *Biotechnol. Lett.* 26, 479–486.
- Yang, S., Wen, X., Shi, Y., Liebner, S., Jin, H., Perfumo, A., 2016. Hydrocarbon degraders establish at the costs of microbial richness, abundance and keystone taxa after crude oil contamination in permafrost environments. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep37473>
- Yeom, I.T., Ghosh, M.M., Cox, C.D., 1996. Kinetic aspects of surfactant solubilization of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1589–1595. <https://doi.org/10.1021/es950567t>
- Yetti, E., Thontowi, A., Lisdiyanti, P., 2015. Screening of marine bacteria capable of degrading various polyaromatic hydrocarbons. *Squalen Bull. Mar. Fish. Postharvest Biotechnol.* 10, 121–127. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15578/squalen.v10i3.123>
- Yu, S., Li, S., Tang, Y., Wu, X., 2011. Succession of bacterial community along with the removal of heavy crude oil pollutants by multiple biostimulation treatments in the Yellow River Delta, China. *J. Environ. Sci.* 23, 1533–1543. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60585-2](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60585-2)
- Zahran, H.H., 1997. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biol. Fertil. Soils* 25, 211–223. <https://doi.org/10.1007/s003740050306>
- Zeng, Z., Liu, Y., Zhong, H., Xiao, R., Zeng, G., Liu, Z., Cheng, M., Lai, C., Zhang, C., Liu, G., Qin, L., 2018. Mechanisms for rhamnolipids-mediated biodegradation of

- hydrophobic organic compounds. *Sci. Total Environ.* 634, 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.349>
- Zhang, G.-Y., Ling, J.-Y., Sun, H.-B., Luo, J., Fan, Y.-Y., Cui, Z.-J., 2009. Isolation and characterization of a newly isolated polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Janibacter anophelis* strain JY11. *J. Hazard. Mater.* 172, 580–586.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.037>
- Zhao, J.-K., Li, X.-M., Ai, G.-M., Deng, Y., Liu, S.-J., Jiang, C.-Y., 2016. Reconstruction of metabolic networks in a fluoranthene-degrading enrichments from polycyclic aromatic hydrocarbon polluted soil. *J. Hazard. Mater.* 318, 90–98.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.06.055>
- Zheng, W., Xue, D., Li, X., Deng, Y., Rui, J., Feng, K., Wang, Z., 2017. The responses and adaptations of microbial communities to salinity in farmland soils : A molecular ecological network analysis. *Appl. Soil Ecol.* 120, 239–246.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.08.019>
- Zhi, Y., Wu, Q., Xu, Y., 2017. Production of surfactin from waste distillers' grains by co-culture fermentation of two *Bacillus amyloliquefaciens* strains. *Bioresour. Technol.* 235, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.090>
- Zhu, H., Aitken, M.D., 2010. Surfactant-enhanced desorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7260–7265. <https://doi.org/10.1021/es100112a>



Capítulo VIII

Material Suplementario

VIII. Material suplementario

VIII.1. Figuras y tablas suplementarias al Capítulo IV.

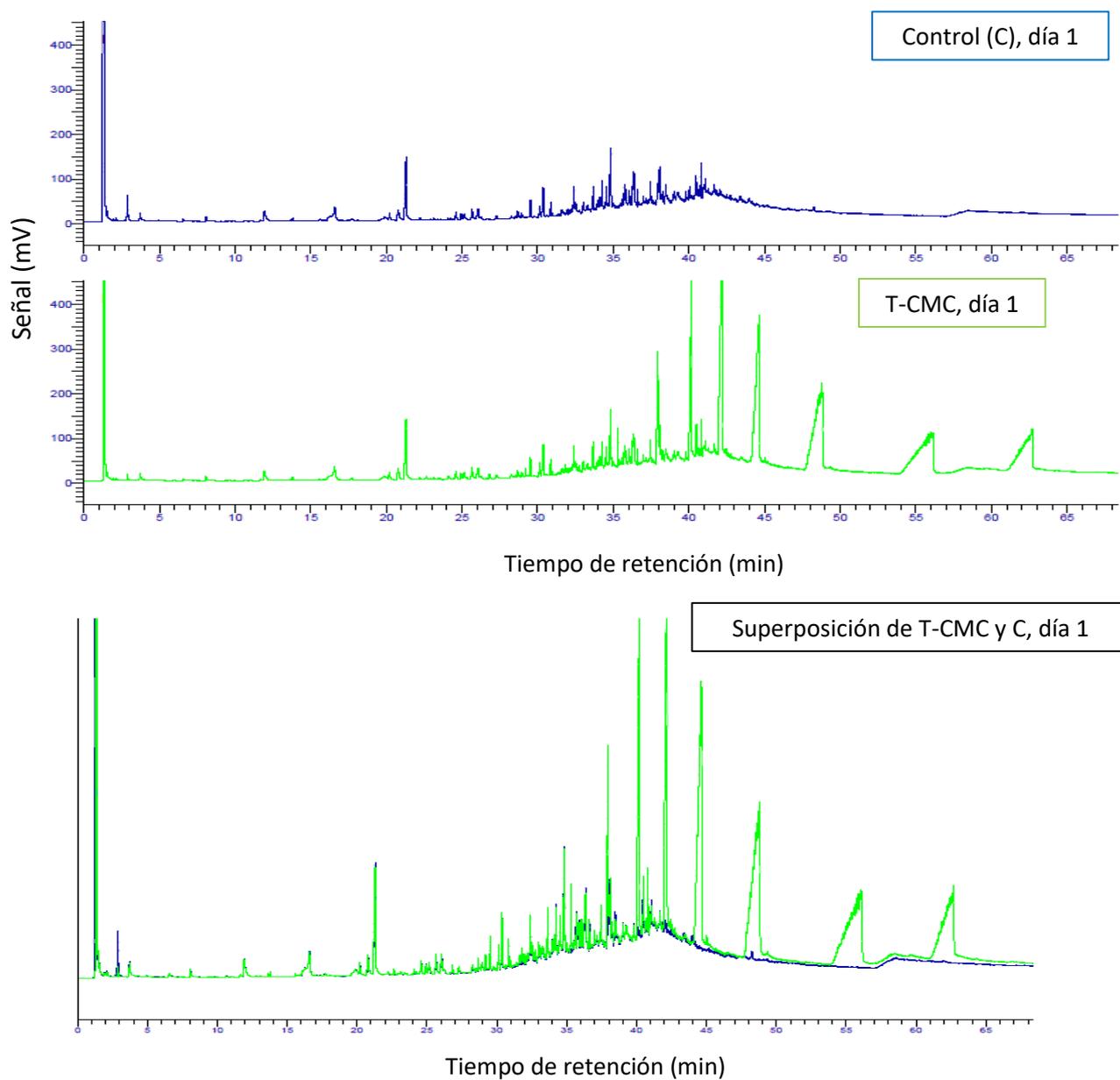


Figura S2. Cromatogramas del extracto de hidrocarburos de las muestras C y T-CMC al día 1 (GC-FID).

Tabla S1. Abundancia relativa de filos bacterianos en cada microcosmos en el día 1, 14 y 63 de tratamiento.

Filo	Día 1			
	C	T-A	T-B	T-CMC
Gemmatimonadetes	0,25	0,34	1,18	0,48
Candidatus Saccharibacteria	0,00	0,00	0,00	0,00
Planctomycetes	0,00	0,26	0,07	0,00
Cyanobacteria	0,00	0,09	0,07	0,48
Deinococcus_Thermus	0,00	0,00	0,00	0,00
Nitrospirae	0,00	0,00	0,00	0,00
Firmicutes	8,84	2,23	1,80	10,45
Bacteroidetes	0,67	2,48	5,20	0,86
Thaumarchaeota	0,00	0,00	0,00	0,00
Acidobacteria	0,14	1,97	2,63	0,86
Actinobacteria	5,16	25,34	22,52	31,16
Ascomycota	0,04	0,00	0,00	0,19
Chloroflexi	0,95	5,48	4,50	6,04
Proteobacteria	83,48	61,13	61,54	48,13
Verrucomicrobia	0,49	0,68	0,49	1,34

Filo	Día 14			
	C	T-A	T-B	T-CMC
Gemmatimonadetes	0.39	1.15	0.73	0.40
Candidatus Saccharibacteria	0.02	0.07	0.00	0.03
Planctomycetes	0.10	0.08	0.38	0.18
Cyanobacteria	0.07	0.00	0.00	0.00
Deinococcus_Thermus	0.00	0.00	0.00	0.00
Nitrospirae	0.00	0.00	0.00	0.01
Firmicutes	0.81	0.90	0.70	0.79
Bacteroidetes	6.39	3.07	2.98	2.72
Thaumarchaeota	0.00	0.00	0.00	0.00
Acidobacteria	2.60	2.07	2.43	1.51
Actinobacteria	28.13	30.57	29.08	30.61
Ascomycota	0.00	0.00	0.00	0.00
Chloroflexi	8.91	8.96	7.60	12.01
Proteobacteria	40.92	49.71	50.28	46.46
Verrucomicrobia	11.66	3.44	5.82	5.27

Filo	Día 63			
	C	T-A	T-B	T-CMC
Gemmatimonadetes	0.00	4.60	4.97	1.13
Candidatus Saccharibacteria	0.00	0.03	0.05	0.05
Planctomycetes	0.00	0.34	0.14	0.10
Cyanobacteria	0.00	0.03	0.00	0.00
Deinococcus_Thermus	0.00	0.11	0.00	0.00
Nitrospirae	0.00	0.00	0.00	0.00
Firmicutes	9.02	0.85	0.57	1.38
Bacteroidetes	0.73	1.16	3.03	3.13
Thaumarchaeota	0.00	0.00	0.00	0.00
Acidobacteria	0.00	5.85	3.17	1.49
Actinobacteria	0.97	7.09	6.58	3.08
Ascomycota	0.24	0.00	0.00	0.00
Chloroflexi	0.36	8.81	2.13	1.44
Proteobacteria	88.56	66.41	76.63	87.39
Verrucomicrobia	0.12	4.72	2.74	0.82

Tabla S2. Abundancia relativa de órdenes bacterianos en cada microcosmos al día 1, 14 y 63 de tratamiento.

Orden	Día 1			
	C	T-A	T-B	T-CMC
Acidobacteriales	0.11	1.38	2.09	0.87
Solibacterales	0.04	0.26	0.56	0.00
Holophagales	0.00	0.09	0.00	0.00
Solirubrobacterales	0.11	1.03	1.40	0.97
Thermoleophilales	0.04	0.09	0.00	0.00
Acidimicrobiales	2.21	7.75	6.98	9.07
Actinomycetales	2.77	16.61	14.18	21.33
Gaiellales	0.04	0.00	0.14	0.00
Rubrobacterales	0.00	0.00	0.00	0.00
Sphingobacteriales	0.21	0.43	0.35	0.00
Bacteroidales	0.11	0.09	0.07	0.19
Cytophagales	0.18	1.81	3.98	0.58
Flavobacteriales	0.18	0.17	0.84	0.10
Anaerolineales	0.00	0.43	0.49	0.48
Caldilineales	0.60	1.55	1.47	2.22
Kallotenuales	0.00	0.00	0.00	0.00
Chloroflexales	0.00	0.17	0.07	0.00
Dehalococcoidales	0.00	0.43	0.21	0.10
Sphaerobacterales	0.35	2.84	2.23	3.28
Thermomicrobiales	0.00	0.00	0.00	0.00
Nostocales	0.00	0.09	0.07	0.48

Oscillatoriales	0.00	0.00	0.00	0.00
Thermales	0.00	0.00	0.00	0.00
Bacillales	8.81	1.72	1.47	8.20
Clostridiales	0.04	0.52	0.35	2.32
Gemmatimonadales	0.25	0.34	1.19	0.48
Nitrospirales	0.00	0.00	0.00	0.00
Phycisphaerales	0.00	0.00	0.00	0.00
Planctomycetales	0.00	0.26	0.07	0.00
Parvularculales	0.07	0.17	0.14	0.29
Sphingomonadales	0.95	9.29	10.13	4.34
Rhodobacterales	0.07	0.43	0.42	0.77
Rhizobiales	1.37	10.84	11.66	9.17
Caulobacterales	1.37	7.83	12.36	6.76
Rickettsiales	0.00	0.00	0.00	0.00
Rhodospirillales	1.05	9.64	6.49	5.69
Burkholderiales	0.04	1.38	0.77	0.39
Nitrosomonadales	0.00	0.09	0.00	0.00
Hydrogenophilales	0.00	0.43	0.07	0.00
Rhodocyclales	0.00	0.26	0.56	0.10
Nitrosomonadales	0.00	0.09	0.00	0.00
Bdellovibrionales	0.00	0.00	0.00	0.00
Desulfuromonadales	0.07	1.29	0.07	0.10
Desulfovibrionales	0.04	0.00	0.00	0.00
Myxococcales	0.00	0.95	0.00	0.19
Syntrophobacterales	0.18	1.12	0.49	1.74
Desulfobacterales	0.35	1.29	0.14	0.00
Unclassified Deltaproteobacteria	0.04	0.52	0.35	0.29
Campylobacterales	0.00	0.00	0.00	0.00
Methylococcales	0.00	0.00	0.00	0.00
Xanthomonadales	0.74	3.96	4.40	1.54
Chromatiales	0.11	0.86	1.68	0.39
Alteromonadales	0.00	0.00	0.00	0.00
Oceanospirillales	0.00	0.00	0.00	0.00
Enterobacterales	0.00	0.09	0.00	0.00
Cardiobacterales	0.00	0.17	0.07	0.00
Legionellales	0.07	0.09	0.00	0.00
Pseudomonadales	77.02	10.41	11.52	16.22
Thiotrichales	0.00	0.09	0.00	0.00
Verrucomicrobiales	0.46	0.69	0.42	1.16
Opituales	0.04	0.00	0.07	0.00
Chthoniobacterales	0.00	0.00	0.00	0.19

Orden	Día 14			
	C	T-A	T-B	T-CMC
Acidobacteriales	2.21	2.02	2.12	1.42
Solibacterales	0.12	0.03	0.30	0.07
Holophagales	0.27	0.02	0.03	0.01
Solirubrobacterales	2.70	2.76	4.94	4.83
Thermoleophilales	0.12	0.10	0.16	0.06
Acidimicrobiales	7.47	6.33	5.18	5.37
Actinomycetales	17.94	21.49	18.89	20.41
Gaiellales	0.00	0.06	0.00	0.04
Rubrobacterales	0.00	0.00	0.00	0.03
Sphingobacteriales	0.15	0.64	0.57	0.99
Bacteroidales	0.00	0.01	0.00	0.01
Cytophagales	6.27	2.40	2.36	1.69
Flavobacteriales	0.00	0.03	0.05	0.03
Anaerolineales	0.27	0.29	0.16	0.28
Caldilineales	0.61	0.67	0.49	0.82
Kallotenuales	0.00	0.00	0.00	0.00
Chloroflexales	3.88	3.43	3.88	4.68
Dehalococcoidales	1.06	0.70	0.62	0.93
Sphaerobacterales	2.90	3.84	2.44	5.29
Thermomicrobiales	0.00	0.03	0.03	0.01
Nostocales	0.00	0.00	0.00	0.00
Oscillatoriales	0.07	0.00	0.00	0.00
Thermales	0.00	0.00	0.00	0.00
Bacillales	0.17	0.32	0.24	0.28
Clostridiales	0.64	0.58	0.46	0.51
Gemmatimonadales	0.39	1.15	0.73	0.40
Nitrospirales	0.00	0.00	0.00	0.01
Phycisphaerales	0.07	0.00	0.00	0.00
Planctomycetales	0.02	0.08	0.38	0.18
Parvularculales	0.02	0.00	0.00	0.00
Sphingomonadales	6.68	10.75	10.66	9.28
Rhodobacterales	0.47	0.55	0.76	0.40
Rhizobiales	5.51	13.18	15.12	13.47
Caulobacterales	9.27	8.43	8.25	7.70
Rickettsiales	0.00	0.01	0.24	0.00
Rhodospirillales	2.80	3.41	3.34	3.01
Burkholderiales	0.74	1.73	1.63	1.53
Nitrosomonadales	0.05	0.07	0.03	0.01
Hydrogenophilales	0.05	0.13	0.14	0.13
Rhodocyclales	0.02	0.02	0.14	0.03
Nitrosomonadales	0.05	0.07	0.03	0.01
Bdellovibrionales	0.00	0.00	0.00	0.03

Desulfuromonadales	0.27	0.41	0.22	0.54
Desulfovibrionales	0.02	0.01	0.00	0.00
Myxococcales	0.71	0.29	0.35	0.24
Syntrophobacterales	0.10	0.25	0.27	0.25
Desulfobacterales	0.22	0.08	0.22	0.01
Unclassified Deltaproteobacteria	1.18	1.15	1.68	3.13
Campylobacterales	0.07	0.00	0.00	0.00
Methylococcales	0.00	0.03	0.00	0.00
Xanthomonadales	8.53	3.68	3.34	1.32
Chromatiales	3.17	1.78	1.66	1.98
Alteromonadales	0.00	0.02	0.05	0.03
Oceanospirillales	0.00	0.20	0.00	0.00
Enterobacterales	0.00	0.00	0.00	0.00
Cardiobacterales	0.00	0.00	0.03	0.00
Legionellales	0.44	0.47	0.11	0.33
Pseudomonadales	0.57	2.78	1.87	2.83
Thiotrichales	0.00	0.01	0.00	0.01
Verrucomicrobiales	8.70	2.82	4.50	5.02
Opitales	0.15	0.04	0.03	0.00
Chthoniobacterales	2.85	0.59	1.30	0.27

Orden	Día 63			
	C	T-A	T-B	T-CMC
Acidobacterales	0.00	5.73	2.98	1.44
Solibacterales	0.00	0.06	0.19	0.00
Holophagales	0.00	0.06	0.00	0.00
Solirubrobacterales	0.00	0.48	0.33	0.05
Thermoleophilales	0.00	0.03	0.00	0.00
Acidimicrobiales	0.00	1.61	0.90	0.77
Actinomycetales	0.97	4.94	5.35	2.26
Gaiellales	0.00	0.03	0.00	0.00
Rubrobacterales	0.00	0.00	0.00	0.00
Sphingobacterales	0.52	0.17	0.47	1.74
Bacteroidales	0.00	0.00	0.00	0.00
Cytophagales	0.20	0.99	2.51	1.38
Flavobacterales	0.00	0.00	0.05	0.00
Anaerolineales	0.00	0.45	0.00	0.05
Caldilineales	0.08	1.89	0.52	0.41
Kallotenuales	0.12	0.00	0.00	0.00
Chloroflexales	0.04	4.35	0.99	0.67
Dehalococcoidales	0.00	0.54	0.05	0.00
Sphaerobacterales	0.12	1.55	0.57	0.31
Thermomicrobiales	0.00	0.00	0.00	0.00

Nostocales	0.00	0.03	0.00	0.00
Oscillatoriales	0.00	0.00	0.00	0.00
Thermales	0.00	0.11	0.00	0.00
Bacillales	9.04	0.25	0.24	1.18
Clostridiales	0.00	0.59	0.33	0.21
Gemmatimonadales	0.00	4.60	4.97	1.13
Nitrospirales	0.00	0.00	0.00	0.00
Phycisphaerales	0.00	0.00	0.00	0.00
Planctomycetales	0.00	0.34	0.14	0.10
Parvularculales	0.00	0.00	0.00	0.00
Sphingomonadales	0.12	26.89	34.56	19.44
Rhodobacterales	0.00	0.48	0.33	0.15
Rhizobiales	0.08	11.80	15.72	5.49
Caulobacterales	0.00	6.30	5.78	2.72
Rickettsiales	0.00	0.00	0.00	0.00
Rhodospirillales	0.00	2.97	3.55	1.69
Burkholderiales	0.16	1.72	1.66	0.41
Nitrosomonadales	0.04	0.11	0.09	0.05
Hydrogenophilales	0.00	0.08	0.05	0.00
Rhodocyclales	0.04	0.08	0.14	0.00
Nitrosomonadales	0.04	0.11	0.09	0.05
Bdellovibrionales	0.00	0.00	0.00	0.00
Desulfuromonadales	0.00	0.93	0.19	0.10
Desulfovibrionales	0.00	0.00	0.00	0.00
Myxococcales	0.00	0.00	0.19	0.00
Syntrophobacterales	0.00	0.37	0.38	0.21
Desulfobacterales	0.00	0.28	0.24	0.05
Unclassified Deltaproteobacteria	0.00	0.51	0.76	0.21
Campylobacterales	0.00	0.00	0.00	0.00
Methylococcales	0.00	0.11	0.00	0.00
Xanthomonadales	0.08	5.37	4.31	36.62
Chromatiales	0.00	0.96	1.33	0.36
Alteromonadales	0.00	0.00	0.05	0.00
Oceanospirillales	0.00	0.79	1.52	0.41
Enterobacterales	0.08	0.00	0.05	0.00
Cardiobacterales	0.00	0.03	0.00	0.00
Legionellales	0.00	0.56	0.24	0.21
Pseudomonadales	88.13	5.96	5.45	19.13
Thiotrichales	0.00	0.06	0.00	0.21
Verrucomicrobiales	0.12	3.56	2.23	0.51
Opitutales	0.00	0.42	0.43	0.00
Chthoniobacterales	0.00	0.73	0.09	0.31

Tabla S3. Abundancia relativa de los principales géneros en cada microcosmos a los días 1, 14 y 63 de tratamiento; se muestran los géneros que se presentaron en un porcentaje de más del 1% en al menos uno de los microcosmos.

Género	Día 1			
	C	T-A	T-B	T-CMC
<i>Acidobacterium</i>	0.11	1.37	2.01	0.85
<i>Ilumatobacter</i>	0.11	1.88	0.21	0.28
<i>Agrococcus</i>	0.07	0.17	0.49	0.85
<i>Paenibacillus</i>	0.00	0.00	0.00	0.95
<i>Gemmatimonas</i>	0.25	0.34	1.18	0.47
<i>Sinorhizobium</i>	0.04	0.43	0.49	0.19
<i>Kaistobacter</i>	0.35	1.88	2.49	1.23
<i>Anaeromyxobacter</i>	0.00	0.94	0.00	0.09
<i>Desulfocaldus</i>	0.04	0.51	0.35	0.28
<i>Pseudomonas</i>	0.28	0.60	1.94	1.70
<i>Lysobacter</i>	0.00	0.26	0.35	0.09
<i>Dongia</i>	0.11	0.86	0.07	0.09
<i>Cupriavidus</i>	0.00	0.77	0.49	0.09
<i>Actinomadura</i>	0.04	0.86	0.62	0.38
<i>Rhodoligotrophos</i>	0.04	0.00	0.76	0.00
<i>Pseudonocardia</i>	0.14	1.28	0.90	1.04
<i>Geobacillus</i>	1.37	0.09	0.07	0.00
<i>Cryptanaerobacter</i>	0.00	0.00	0.00	1.04
<i>Methyloligella</i>	0.00	0.51	0.55	0.57
<i>Stenotrophomonas</i>	0.04	0.00	0.00	0.00
<i>Rhodopseudomonas</i>	0.00	0.00	0.21	0.00
<i>Novosphingobium</i>	0.11	1.46	0.55	0.28
<i>Luteolibacter</i>	0.32	0.60	0.35	0.85
<i>Oceanibaculum</i>	0.28	4.11	2.70	1.51
<i>Salinibacillus</i>	0.00	0.00	0.00	1.42
<i>Tistlia</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Nitrobacter</i>	0.00	0.00	0.49	0.00
<i>Olivibacter</i>	0.00	0.00	0.28	0.00
<i>Desulfomonile</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Chloroflexus</i>	0.00	0.17	0.07	0.00
<i>Brevundimonas</i>	1.26	7.62	11.85	6.34
<i>Rhodoplanes</i>	0.14	1.28	0.76	1.32

<i>Shimazuella</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Bradyrhizobium</i>	0.00	0.77	1.46	0.28
<i>Vasilyevaea</i>	0.00	0.00	0.14	0.00
<i>Sphingomonas</i>	0.25	4.28	3.81	1.32
<i>Sphingobium</i>	0.14	0.09	0.21	0.47
<i>Porphyrobacter</i>	0.00	0.17	0.83	0.38
<i>Marmoricola</i>	0.04	0.51	0.97	0.76
<i>Thauera</i>	0.00	0.26	0.49	0.09
<i>Orientia</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Sphingopyxis</i>	0.04	0.09	1.87	0.28
<i>Ohtaekwangia</i>	0.18	1.80	3.95	0.57
<i>Flavobacterium</i>	0.18	0.09	0.76	0.09
<i>Streptoalloteichus</i>	0.00	0.09	0.00	0.00
<i>Roseimicrobium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Opitutus</i>	0.04	0.00	0.07	0.00
<i>Myceligenans</i>	0.07	0.68	0.42	0.19
<i>Thioalkalivibrio</i>	0.00	0.00	0.62	0.00
<i>Arcobacter</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Acinetobacter</i>	76.74	9.76	9.49	14.10
<i>Blastococcus</i>	0.21	0.51	0.35	1.04
<i>Caryophanon</i>	0.00	0.00	0.00	1.61
<i>Microlunatus</i>	0.04	0.17	0.00	0.66
<i>Candidatus Microthrix</i>	0.70	3.08	2.01	3.50
<i>Sphingosinicella</i>	0.04	0.60	0.00	0.19
<i>Conexibacter</i>	0.11	0.94	1.39	0.95
<i>Mycobacterium</i>	0.11	0.43	0.21	0.19
<i>Steroidobacter</i>	0.07	0.51	1.11	0.57
<i>Erythrobacter</i>	0.04	0.68	0.07	0.00
<i>Desulfococcus</i>	0.35	0.17	0.14	0.00
<i>Azospirillum</i>	0.49	2.31	1.80	2.55
<i>Syntrophobacter</i>	0.11	0.60	0.49	1.70
<i>Rhodomicrobium</i>	0.00	0.09	1.46	0.00
<i>Bacillus</i>	7.44	1.28	1.39	5.58
<i>Alcanivorax</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Thiohalophilus</i>	0.07	0.77	0.42	0.19
<i>Chthoniobacter</i>	0.00	0.00	0.00	0.19
<i>Geobacter</i>	0.07	1.28	0.07	0.09
<i>Nitrosovibrio</i>	0.00	0.00	0.00	0.00

<i>Sphaerobacter</i>	0.35	2.83	2.22	3.22
<i>Skermanella</i>	0.00	1.03	0.28	0.38
<i>Georgenia</i>	0.14	0.77	1.11	1.14
<i>Verrucomicrobium</i>	0.14	0.09	0.07	0.19
<i>Nocardioides</i>	1.30	7.19	7.21	9.93
<i>Desulfobulbus</i>	0.00	1.11	0.00	0.00
<i>Fulvimonas</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Mesorhizobium</i>	0.25	2.57	1.18	2.37
<i>Ardenticatena</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Rhizobium</i>	0.60	2.65	2.29	2.27
<i>Thermoflavimicrobium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Caldilinea</i>	0.60	1.54	1.46	2.18
<i>Pelagibius</i>	0.00	0.09	0.14	0.00
<i>Ferrithrix</i>	0.18	0.94	1.11	1.14
<i>Iamia</i>	1.16	1.63	3.60	3.97
<i>Wolinella</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Xanthomonas</i>	0.49	2.74	2.77	0.66
Otros	2.28	14.81	10.40	13.06

Género	Día 14			
	C	T-A	T-B	T-CMC
<i>Acidobacterium</i>	2.18	1.96	2.11	1.40
<i>Ilumatobacter</i>	0.44	0.33	0.65	0.15
<i>Agrococcus</i>	0.59	0.48	0.54	0.46
<i>Paenibacillus</i>	0.02	0.03	0.00	0.00
<i>Gemmatimonas</i>	0.39	1.15	0.73	0.40
<i>Sinorhizobium</i>	0.10	0.21	0.03	0.07
<i>Kaistobacter</i>	1.91	3.09	2.30	3.37
<i>Anaeromyxobacter</i>	0.02	0.12	0.19	0.09
<i>Desulfocaldus</i>	1.15	1.11	1.65	3.12
<i>Pseudomonas</i>	0.51	2.57	1.84	2.21
<i>Lysobacter</i>	0.51	0.31	0.30	0.18
<i>Dongia</i>	0.15	0.04	0.16	0.03
<i>Cupriavidus</i>	0.02	0.04	0.03	0.04
<i>Actinomadura</i>	1.44	1.68	0.97	1.55
<i>Rhodoligotrophos</i>	0.12	0.07	0.22	0.13
<i>Pseudonocardia</i>	0.71	0.83	0.70	0.81
<i>Geobacillus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Cryptanaerobacter</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Methyloligella</i>	0.10	0.19	0.14	0.12
<i>Stenotrophomonas</i>	0.00	0.00	0.00	0.06

<i>Rhodopseudomonas</i>	0.02	1.09	2.84	1.00
<i>Novosphingobium</i>	0.34	0.56	0.43	0.39
<i>Luteolibacter</i>	4.06	1.27	1.97	3.88
<i>Oceanibaculum</i>	1.10	1.40	1.00	0.85
<i>Salinibacillus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Tistlia</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Nitrobacter</i>	0.00	3.90	3.98	3.36
<i>Olivibacter</i>	0.00	0.53	0.41	0.94
<i>Desulfomonile</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Chloroflexus</i>	3.87	3.41	3.87	4.66
<i>Brevundimonas</i>	8.96	7.52	7.71	7.34
<i>Rhodoplanes</i>	0.95	1.43	1.41	1.28
<i>Shimazuella</i>	0.00	0.01	0.00	0.00
<i>Bradyrhizobium</i>	0.05	0.64	1.81	1.00
<i>Vasilyevaea</i>	0.22	0.07	0.08	0.07
<i>Sphingomonas</i>	3.92	3.20	4.79	3.25
<i>Sphingobium</i>	0.07	0.06	0.00	0.07
<i>Porphyrobacter</i>	0.20	0.23	0.11	0.10
<i>Marmoricola</i>	0.02	0.03	0.05	0.01
<i>Thauera</i>	0.02	0.00	0.00	0.00
<i>Orientia</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Sphingopyxis</i>	0.02	3.28	2.73	1.69
<i>Ohtaekwangia</i>	5.56	2.25	2.30	1.58
<i>Flavobacterium</i>	0.00	0.03	0.05	0.01
<i>Streptoalloteichus</i>	0.00	0.00	0.00	0.01
<i>Roseimicrobium</i>	1.74	0.87	1.43	0.81
<i>Opitutus</i>	0.15	0.04	0.03	0.00
<i>Myceligenans</i>	2.20	3.52	3.16	1.85
<i>Thioalkalivibrio</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Arcobacter</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Acinetobacter</i>	0.00	0.13	0.00	0.52
<i>Blastococcus</i>	0.95	1.41	0.92	1.27
<i>Caryophanon</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Microlunatus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Candidatus Microthrix</i>	3.84	3.09	2.22	1.76
<i>Sphingosinicella</i>	0.17	0.26	0.24	0.36
<i>Conexibacter</i>	2.67	2.70	4.84	4.76
<i>Mycobacterium</i>	1.52	1.67	1.87	3.25
<i>Steroidobacter</i>	0.34	0.23	0.19	0.13
<i>Erythrobacter</i>	0.00	0.00	0.03	0.00
<i>Desulfococcus</i>	0.12	0.07	0.22	0.01
<i>Azospirillum</i>	0.73	1.18	1.49	1.36
<i>Syntrophobacter</i>	0.07	0.18	0.27	0.22
<i>Rhodomicrobium</i>	0.00	0.03	0.05	0.03
<i>Bacillus</i>	0.12	0.22	0.16	0.21
<i>Alcanivorax</i>	0.00	0.18	0.00	0.00

<i>Thiohalophilus</i>	2.94	1.65	1.46	1.87
<i>Chthoniobacter</i>	2.84	0.59	1.30	0.27
<i>Geobacter</i>	0.15	0.31	0.11	0.51
<i>Nitrosovibrio</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Sphaerobacter</i>	2.89	3.81	2.43	5.27
<i>Skermanella</i>	0.02	0.11	0.14	0.33
<i>Georgenia</i>	2.33	3.39	2.60	3.51
<i>Verrucomicrobium</i>	2.69	0.57	0.92	0.28
<i>Nocardioides</i>	5.38	4.43	4.16	3.48
<i>Desulfobulbus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Fulvimonas</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Mesorhizobium</i>	0.95	1.37	1.62	2.27
<i>Ardenticatena</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Rhizobium</i>	1.52	2.41	1.16	1.45
<i>Thermoflavimicrobium</i>	0.05	0.01	0.00	0.00
<i>Caldilinea</i>	0.61	0.67	0.49	0.82
<i>Pelagibius</i>	0.02	0.08	0.08	0.03
<i>Ferrithrix</i>	0.07	0.13	0.08	0.18
<i>Iamia</i>	2.81	2.59	2.06	3.13
<i>Wolinella</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Xanthomonas</i>	7.46	2.90	2.81	0.75
Otros	12.85	14.04	13.39	13.59

Género	Día 63			
	C	T-A	T-B	T-CMC
<i>Acidobacterium</i>	0.00	5.72	2.93	1.44
<i>Ilumatobacter</i>	0.00	0.06	0.09	0.10
<i>Agrococcus</i>	0.00	0.17	0.47	0.15
<i>Paenibacillus</i>	0.08	0.00	0.00	0.00
<i>Gemmatimonas</i>	0.00	4.62	4.97	1.13
<i>Sinorhizobium</i>	0.00	0.11	1.32	0.10
<i>Kaistobacter</i>	0.00	3.68	2.65	3.02
<i>Anaeromyxobacter</i>	0.00	0.00	0.05	0.00
<i>Desulfocaldus</i>	0.00	0.51	0.76	0.21
<i>Pseudomonas</i>	0.00	2.32	1.99	1.33
<i>Lysobacter</i>	0.00	0.65	0.38	0.26
<i>Dongia</i>	0.00	0.17	0.47	0.00
<i>Cupriavidus</i>	0.00	0.20	0.38	0.05
<i>Actinomadura</i>	0.00	0.14	0.38	0.15
<i>Rhodoligotrophos</i>	0.00	0.14	0.47	0.05
<i>Pseudonocardia</i>	0.00	0.00	0.47	0.21

<i>Geobacillus</i>	1.49	0.06	0.05	0.21
<i>Cryptanaerobacter</i>	0.00	0.20	0.00	0.00
<i>Methyloligella</i>	0.00	0.03	0.14	0.10
<i>Stenotrophomonas</i>	0.04	0.25	0.00	35.32
<i>Rhodopseudomonas</i>	0.00	0.57	0.47	0.26
<i>Novosphingobium</i>	0.00	7.39	13.67	6.87
<i>Luteolibacter</i>	0.00	0.99	0.66	0.15
<i>Oceanibaculum</i>	0.00	0.88	0.76	0.31
<i>Salinibacillus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Tistlia</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Nitrobacter</i>	0.04	2.95	2.98	1.44
<i>Olivibacter</i>	0.00	0.08	0.38	1.69
<i>Desulfomonile</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Chloroflexus</i>	0.04	4.36	0.99	0.67
<i>Brevundimonas</i>	0.00	5.04	4.78	2.26
<i>Rhodoplanes</i>	0.00	0.23	0.33	0.05
<i>Shimazuella</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Bradyrhizobium</i>	0.00	1.56	3.36	1.79
<i>Vasilyevaea</i>	0.00	0.00	0.09	0.00
<i>Sphingomonas</i>	0.12	9.83	10.79	4.36
<i>Sphingobium</i>	0.00	0.74	0.43	0.26
<i>Porphyrobacter</i>	0.00	0.42	0.71	0.62
<i>Marmoricola</i>	0.00	0.06	0.00	0.00
<i>Thauera</i>	0.00	0.00	0.09	0.00
<i>Orientia</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Sphingopyxis</i>	0.00	4.84	6.15	4.15
<i>Ohtaekwangia</i>	0.20	0.96	2.32	1.38
<i>Flavobacterium</i>	0.00	0.00	0.05	0.00
<i>Streptoalloteichus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Roseimicrobium</i>	0.00	1.56	0.90	0.15
<i>Opitutus</i>	0.00	0.42	0.43	0.00
<i>Myceligenerans</i>	0.00	0.88	0.57	0.31
<i>Thioalkalivibrio</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Arcobacter</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Acinetobacter</i>	88.17	3.46	3.41	17.79
<i>Blastococcus</i>	0.85	0.28	0.28	0.10
<i>Caryophanon</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Microlunatus</i>	0.00	0.11	0.00	0.00

<i>Candidatus Microthrix</i>	0.00	0.59	0.43	0.36
<i>Sphingosinicella</i>	0.00	0.00	0.09	0.10
<i>Conexibacter</i>	0.00	0.48	0.33	0.05
<i>Mycobacterium</i>	0.00	0.59	0.52	0.51
<i>Steroidobacter</i>	0.00	0.37	0.43	0.15
<i>Erythrobacter</i>	0.00	0.03	0.00	0.05
<i>Desulfococcus</i>	0.00	0.28	0.24	0.00
<i>Azospirillum</i>	0.00	1.08	0.95	0.97
<i>Syntrophobacter</i>	0.00	0.17	0.28	0.21
<i>Rhodomicrobium</i>	0.00	0.03	0.14	0.05
<i>Bacillus</i>	7.47	0.00	0.19	0.97
<i>Alcanivorax</i>	0.00	0.79	1.51	0.41
<i>Thiohalophilus</i>	0.00	0.76	0.99	0.31
<i>Chthoniobacter</i>	0.00	0.74	0.09	0.31
<i>Geobacter</i>	0.00	0.65	0.14	0.10
<i>Nitrosovibrio</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Sphaerobacter</i>	0.12	1.56	0.57	0.31
<i>Skermanella</i>	0.00	0.14	0.05	0.10
<i>Georgenia</i>	0.04	0.59	0.47	0.05
<i>Verrucomicrobium</i>	0.12	0.76	0.52	0.15
<i>Nocardioides</i>	0.04	0.74	0.76	0.36
<i>Desulfobulbus</i>	0.00	0.00	0.00	0.05
<i>Fulvimonas</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Mesorhizobium</i>	0.04	2.24	1.80	0.72
<i>Ardenticatena</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Rhizobium</i>	0.00	3.17	3.83	0.26
<i>Thermoflavimicrobium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Caldilinea</i>	0.08	1.90	0.52	0.41
<i>Pelagibius</i>	0.00	0.11	0.14	0.15
<i>Ferrithrix</i>	0.00	0.06	0.05	0.05
<i>Iamia</i>	0.00	0.88	0.28	0.26
<i>Wolinella</i>	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Xanthomonas</i>	0.04	3.99	3.22	0.72
Otros	1.01	10.65	8.89	3.43

VIII.2. Figuras y tablas suplementarias al Capítulo V.

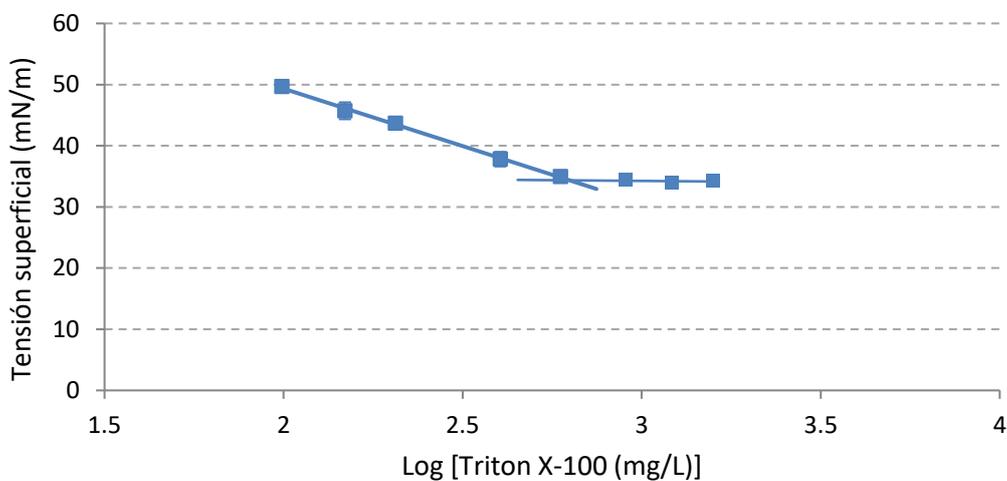


Figura S2. Determinación de la concentración micelar crítica en suelo MTC.

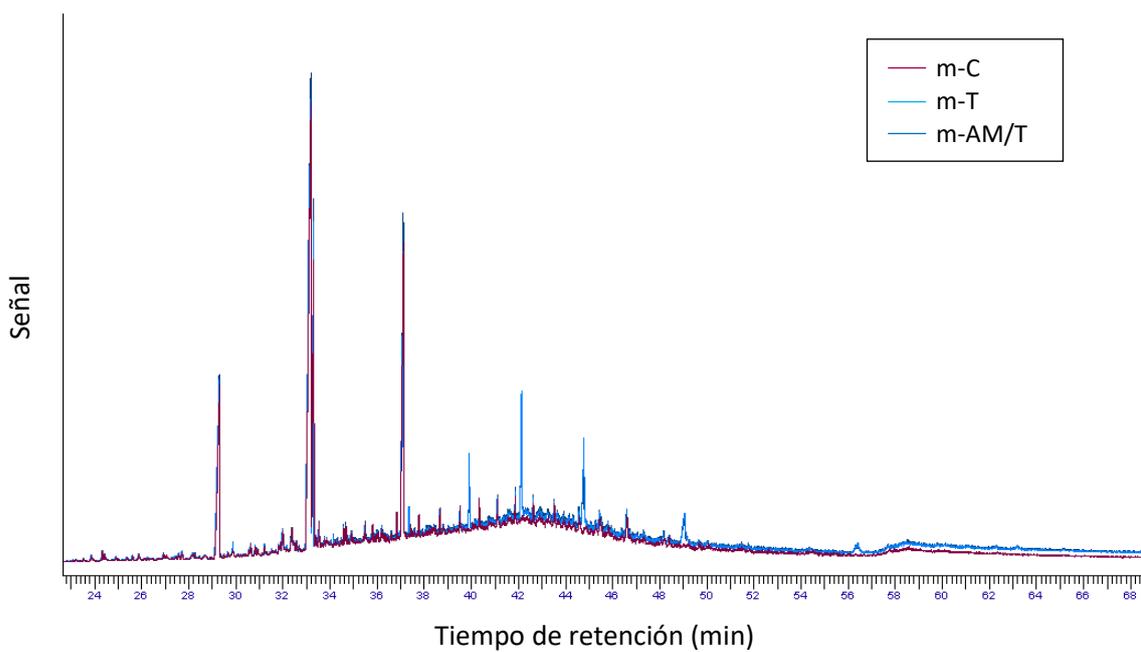


Figura S3. Cromatogramas del extracto de hidrocarburos de las muestras m-C, m-T y m-AM/T al día 1 (GC-FID).

Tabla S4. Abundancia relativa de filos bacterianos en los microcosmos m-C, m-AM, m-B *srf+*, m-AM+B *srf+* y m-AM/T en el día 1, 28, 85, 180 y 203 (NPK) de tratamiento. (C: *Candidatus*).

Filo	Día 1				
	m-C	m-AM	m-B <i>srf+</i>	m-AM+B <i>srf+</i>	m-AM/T
Fibrobacteres	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Thermodesulfobacteria	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01
Gemmatimonadetes	0,31	0,35	0,35	0,31	0,23
C Saccharibacteria	0,04	0,06	0,05	0,05	0,03
Actinobacteria	35,23	34,61	27,95	32,33	29,63
Synergistetes	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
Deferribacteres	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Planctomycetes	1,39	2,15	2,16	1,40	0,95
Chlamydiae	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03
Deinococcus_Thermus	0,14	0,15	0,12	0,15	0,11
Tenericutes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Nitrospirae	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02
Cloacimonetes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Firmicutes	9,11	8,54	19,30	12,59	9,60
Bacteroidetes	4,62	3,82	5,23	4,81	5,09
Cyanobacteria	0,01	0,03	0,02	0,02	0,02
Chlorobi	0,18	0,28	0,22	0,21	0,20
Dictyoglomi	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acidobacteria	0,59	0,83	0,68	0,53	0,46
Ignavibacteriae	0,05	0,11	0,08	0,05	0,05
Aquificae	0,02	0,03	0,03	0,03	0,01
Fusobacteria	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Spirochaetes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Chloroflexi	2,45	2,83	2,39	2,27	1,73
Proteobacteria	45,28	45,51	40,65	44,61	51,49
Thermotogae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Verrucomicrobia	0,27	0,48	0,39	0,24	0,15
Caldiserica	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Euryarchaeota	0,15	0,09	0,24	0,27	0,14
Thaumarchaeota	0,04	0,04	0,06	0,05	0,04
Crenarchaeota	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Filo	Día 28				
	m-C	m-AM	m-B <i>srf+</i>	m-AM+B <i>srf+</i>	m-AM/T
Fibrobacteres	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Thermodesulfobacteria	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
Gemmatimonadetes	0,27	0,43	0,39	0,30	0,22
C Saccharibacteria	0,06	0,06	0,04	0,07	0,04
Actinobacteria	38,10	39,53	29,87	33,79	22,66
Synergistetes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Deferribacteres	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Planctomycetes	1,59	1,23	1,71	1,17	1,15
Chlamydiae	0,04	0,04	0,05	0,03	0,04
Deinococcus_Thermus	0,14	0,16	0,14	0,13	0,12
Tenericutes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Nitrospirae	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02
Cloacimonetes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Firmicutes	8,88	8,92	23,34	11,93	5,12
Bacteroidetes	4,51	3,27	3,77	4,89	3,22
Cyanobacteria	0,01	0,03	0,02	0,01	0,02
Chlorobi	0,14	0,17	0,20	0,13	0,18
Dictyoglomi	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acidobacteria	0,56	0,75	0,69	0,53	0,48
Ignavibacteriae	0,05	0,05	0,08	0,07	0,06
Aquificae	0,02	0,02	0,03	0,01	0,03
Fusobacteria	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01
Spirochaetes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Chloroflexi	2,74	2,93	2,37	2,55	1,77
Proteobacteria	42,25	41,53	36,64	43,63	64,54
Thermotogae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Verrucomicrobia	0,27	0,50	0,49	0,26	0,18
Caldiserica	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Euryarchaeota	0,29	0,26	0,07	0,43	0,11
Thaumarchaeota	0,03	0,07	0,05	0,04	0,03
Crenarchaeota	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Filo	Día 85				
	m-C	m-AM	m-B <i>srf+</i>	m-AM+B <i>srf+</i>	m-AM/T
Fibrobacteres	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Thermodesulfobacteria	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01
Gemmatimonadetes	0,35	0,34	0,36	0,20	0,24
C Saccharibacteria	0,05	0,03	0,04	0,04	0,06
Actinobacteria	39,51	42,05	30,40	37,98	40,79
Synergistetes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Deferribacteres	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Planctomycetes	1,10	1,32	1,91	0,83	1,76
Chlamydiae	0,04	0,04	0,03	0,03	0,10

Deinococcus_Thermus	0,14	0,15	0,12	0,11	0,08
Tenericutes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Nitrospirae	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01
Cloacimonetes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Firmicutes	9,68	9,72	24,66	10,58	4,71
Bacteroidetes	3,98	2,80	3,33	2,90	0,77
Cyanobacteria	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01
Chlorobi	0,15	0,14	0,16	0,10	0,14
Dictyoglomi	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acidobacteria	0,54	0,57	0,69	0,38	0,51
Ignavibacteriae	0,04	0,03	0,06	0,04	0,03
Aquificae	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03
Fusobacteria	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
Spirochaetes	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
Chloroflexi	2,94	2,88	2,45	1,69	2,26
Proteobacteria	40,64	39,20	35,02	44,70	48,24
Thermotogae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Verrucomicrobia	0,23	0,32	0,46	0,17	0,16
Caldiserica	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Euryarchaeota	0,48	0,29	0,20	0,16	0,06
Thaumarchaeota	0,04	0,05	0,05	0,03	0,03
Crenarchaeota	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Filo	Día 180				
	m-C	m-AM	m-B <i>srf+</i>	m-AM+B <i>srf+</i>	m-AM/T
Fibrobacteres	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Thermodesulfobacteria	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Gemmatimonadetes	0,31	0,31	0,29	0,22	0,09
C Saccharibacteria	0,03	0,05	0,03	0,03	0,03
Actinobacteria	43,41	44,76	41,03	39,86	39,84
Synergistetes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Deferribacteres	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Planctomycetes	1,33	0,49	1,01	0,76	1,06
Chlamydiae	0,04	0,02	0,03	0,04	0,15
Deinococcus_Thermus	0,13	0,09	0,08	0,10	0,02
Tenericutes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Nitrospirae	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02
Cloacimonetes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Firmicutes	8,97	7,93	15,32	10,94	3,36
Bacteroidetes	2,35	2,30	2,92	2,54	2,68
Cyanobacteria	0,01	0,02	0,02	0,01	0,00
Chlorobi	0,13	0,10	0,16	0,07	0,05
Dictyoglomi	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acidobacteria	0,61	0,49	0,62	0,36	0,17
Ignavibacteriae	0,05	0,03	0,06	0,03	0,00

Aquificae	0,01	0,01	0,01	0,01	0,06
Fusobacteria	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
Spirochaetes	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Chloroflexi	2,87	2,44	2,52	1,85	0,75
Proteobacteria	39,11	40,25	35,42	42,85	51,54
Thermotogae	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Verrucomicrobia	0,30	0,27	0,28	0,13	0,09
Caldiserica	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Euryarchaeota	0,26	0,38	0,09	0,14	0,05
Thaumarchaeota	0,03	0,05	0,05	0,04	0,01
Crenarchaeota	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Filo	Día 208 (NPK)		
	C	m-AM	m-AM/T
Fibrobacteres	0,00	0,00	0,00
Thermodesulfobacteria	0,00	0,00	0,00
Gemmatimonadetes	0,19	0,24	0,06
C Saccharibacteria	0,13	0,04	0,02
Actinobacteria	47,07	59,17	43,11
Synergistetes	0,00	0,00	0,00
Deferribacteres	0,00	0,00	0,00
Planctomycetes	0,74	0,66	0,56
Chlamydiae	0,04	0,03	0,09
Deinococcus_Thermus	0,08	0,09	0,00
Tenericutes	0,00	0,00	0,00
Nitrospirae	0,02	0,02	0,00
Cloacimonetes	0,00	0,00	0,00
Firmicutes	4,16	4,56	3,24
Bacteroidetes	1,63	0,86	10,10
Cyanobacteria	0,01	0,01	0,01
Chlorobi	0,11	0,05	0,01
Dictyoglomi	0,00	0,00	0,00
Acidobacteria	0,44	0,43	0,14
Ignavibacteriae	0,03	0,01	0,00
Aquificae	0,02	0,01	0,01
Fusobacteria	0,00	0,00	0,00
Spirochaetes	0,00	0,00	0,00
Chloroflexi	2,15	2,21	1,04
Proteobacteria	42,85	31,33	41,53
Thermotogae	0,00	0,00	0,00
Verrucomicrobia	0,14	0,15	0,04
Caldiserica	0,00	0,00	0,00
Euryarchaeota	0,14	0,09	0,03
Thaumarchaeota	0,03	0,03	0,01
Crenarchaeota	0,00	0,00	0,00

Tabla S5. Abundancia relativa de órdenes bacterianos en los microcosmos m-C, m-AM, m-B *srf+*, m-AM+B *srf+* y m-AM/T en el día 1, 28, 85, 180 y 203 (NPK) de tratamiento. Se muestran los órdenes que se presentaron en un porcentaje mayor al 0,3% en al menos uno de los microcosmos.

Orden	Día 1				
	m-C	m-AM	m-B <i>srf+</i>	m-AM+B <i>srf+</i>	m-AM/T
Acidobacteriales	0,49	0,70	0,57	0,45	0,39
Acidimicrobiales	1,08	1,15	1,12	1,03	0,65
Actinomycetales	32,59	31,56	25,41	30,08	28,05
Gaiellales	0,31	0,37	0,26	0,19	0,18
Solirubrobacterales	0,83	1,07	0,85	0,69	0,51
Bacteroidales	0,84	1,14	1,53	0,86	0,79
Flavobacteriales	2,64	1,54	2,69	2,82	2,97
Sphingobacteriales	0,90	0,90	0,80	0,89	1,06
Anaerolineales	0,62	0,76	0,70	0,51	0,42
Sphaerobacterales	1,41	1,51	1,25	1,36	1,04
Halobacteriales	0,10	0,07	0,16	0,21	0,11
Bacillales	6,76	6,14	16,48	10,46	7,83
Lactobacillales	0,38	0,23	0,29	0,32	0,35
Clostridiales	1,92	2,13	2,48	1,77	1,38
Gemmatimonadales	0,31	0,35	0,35	0,31	0,23
Phycisphaerales	0,24	0,38	0,43	0,27	0,17
Planctomycetales	1,15	1,77	1,73	1,13	0,78
Caulobacterales	0,70	0,70	0,73	0,65	0,72
Rhizobiales	5,88	7,29	7,46	5,81	4,23
Rhodobacterales	0,96	1,17	1,14	1,01	0,69
Rhodospirillales	2,43	3,36	3,31	2,40	1,78
Sphingomonadales	2,18	4,50	1,79	3,22	10,09
Burkholderiales	2,51	2,62	2,70	2,13	2,53
Desulfobacterales	0,25	0,45	0,42	0,34	0,30
Desulfovibrionales	0,67	1,17	1,03	0,71	0,60
Alteromonadales	1,17	1,11	0,97	0,94	1,09
Chromatiales	0,96	1,16	1,08	0,94	0,89
Gammaproteobacteria	0,96	1,65	1,27	1,00	0,55
Legionellales	0,33	0,83	0,65	0,41	0,24
Nevskiales	0,25	0,27	0,25	0,20	0,18
Oceanospirillales	20,86	13,92	12,90	20,04	22,93
Pseudomonadales	1,65	1,28	1,11	1,54	1,55
Salinisphaerales	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Xanthomonadales	2,21	2,33	2,25	1,91	2,00
Hydrogenophilales	0,31	0,35	0,30	0,25	0,21
Verrucomicrobiales	0,26	0,44	0,36	0,22	0,14
Otros	2,89	3,64	3,20	2,93	2,37

Orden	Día 28				
	m-C	m-AM	m-B <i>srf+</i>	m-AM+B <i>srf+</i>	m-AM/T
Acidobacteriales	0,47	0,60	0,58	0,43	0,39
Acidimicrobiales	1,13	1,27	0,95	0,98	0,76
Actinomycetales	35,55	36,19	27,17	31,49	20,87
Gaiellales	0,28	0,40	0,34	0,25	0,20
Solirubrobacterales	0,76	1,17	0,98	0,73	0,57
Bacteroidales	0,79	0,65	0,91	0,77	0,70
Flavobacteriales	2,72	1,42	1,80	2,99	1,78
Sphingobacteriales	0,78	0,95	0,84	0,88	0,57
Anaerolineales	0,62	0,58	0,62	0,55	0,52
Sphaerobacterales	1,64	1,79	1,32	1,53	0,85
Halobacteriales	0,23	0,21	0,05	0,33	0,05
Bacillales	6,94	7,07	21,29	9,96	3,61
Lactobacillales	0,31	0,29	0,21	0,30	0,31
Clostridiales	1,58	1,51	1,81	1,64	1,16
Gemmatimonadales	0,27	0,43	0,39	0,30	0,22
Phycisphaerales	0,25	0,20	0,30	0,21	0,23
Planctomycetales	1,34	1,03	1,40	0,96	0,92
Caulobacterales	0,78	0,82	0,66	0,64	0,59
Rhizobiales	5,79	5,70	5,96	5,18	3,96
Rhodobacterales	0,99	1,08	0,95	0,93	0,77
Rhodospirillales	2,38	2,25	2,41	1,86	1,81
Sphingomonadales	2,09	5,18	2,06	3,28	4,03
Burkholderiales	2,22	2,27	2,14	2,50	1,62
Desulfobacterales	0,28	0,26	0,33	0,25	0,27
Desulfovibrionales	0,63	0,58	0,71	0,59	0,62
Alteromonadales	1,04	1,36	1,01	0,80	0,54
Chromatiales	0,89	0,99	1,01	0,76	0,83
Gammaproteobacteria	0,73	0,72	1,04	0,78	0,79
Legionellales	0,32	0,28	0,46	0,28	0,28
Nevskiales	0,22	0,26	0,23	0,19	0,17
Oceanospirillales	19,03	14,79	13,02	21,01	44,57
Pseudomonadales	1,49	1,32	1,13	1,51	0,99
Salinisphaerales	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
Xanthomonadales	2,05	2,37	2,17	1,87	1,56
Hydrogenophilales	0,19	0,27	0,27	0,22	0,20
Verrucomicrobiales	0,25	0,48	0,46	0,24	0,17
Otros	2,95	3,25	3,02	2,80	2,51

Orden	Día 85				
	m-C	m-AM	m-B <i>srf</i> +	m-AM+B <i>srf</i> +	m-AM/T
Acidobacteriales	0,45	0,46	0,54	0,31	0,42
Acidimicrobiales	1,05	1,23	1,12	0,73	1,14
Actinomycetales	36,90	38,79	27,29	36,15	37,68
Gaiellales	0,29	0,40	0,41	0,18	0,46
Solirubrobacterales	0,84	1,14	1,16	0,60	1,20
Bacteroidales	0,60	0,54	0,88	0,41	0,26
Flavobacteriales	2,26	1,27	1,48	1,78	0,29
Sphingobacteriales	0,88	0,80	0,73	0,56	0,14
Anaerolineales	0,49	0,55	0,64	0,33	0,43
Sphaerobacterales	1,94	1,78	1,34	0,97	1,49
Halobacteriales	0,37	0,24	0,16	0,12	0,02
Bacillales	7,72	7,79	22,67	9,19	2,74
Lactobacillales	0,25	0,22	0,24	0,19	0,30
Clostridiales	1,67	1,67	1,70	1,19	1,62
Gemmatimonadales	0,35	0,34	0,36	0,20	0,24
Phycisphaerales	0,19	0,21	0,29	0,13	0,22
Planctomycetales	0,91	1,10	1,62	0,70	1,54
Caulobacterales	0,76	0,78	0,74	0,48	0,26
Rhizobiales	5,05	5,99	6,69	3,87	7,10
Rhodobacterales	0,89	0,99	0,94	0,66	0,45
Rhodospirillales	1,86	2,19	2,49	1,49	1,99
Sphingomonadales	2,13	4,93	2,00	2,66	1,06
Burkholderiales	1,95	2,23	2,15	1,34	0,91
Desulfobacterales	0,25	0,25	0,31	0,16	0,31
Desulfovibrionales	0,55	0,59	0,78	0,33	0,71
Alteromonadales	1,09	1,14	0,91	0,69	0,18
Chromatiales	0,87	0,73	0,94	0,63	1,17
Gammaproteobacteria	0,66	0,74	0,97	0,51	0,48
Legionellales	0,29	0,32	0,44	0,23	0,13
Nevskiales	0,20	0,24	0,32	0,17	0,13
Oceanospirillales	19,77	13,79	11,12	28,13	30,28
Pseudomonadales	1,23	0,94	0,91	1,05	0,70
Salinisphaerales	0,00	0,01	0,00	0,00	0,29
Xanthomonadales	1,93	2,20	2,12	1,51	1,24
Hydrogenophilales	0,22	0,24	0,29	0,14	0,09
Verrucomicrobiales	0,21	0,29	0,44	0,15	0,14
Otros	2,94	2,90	2,83	2,09	2,18

Orden	Día 180				
	m-C	m-AM	m-B <i>srf</i> +	m-AM+B <i>srf</i> +	m-AM/T
Acidobacteriales	0,50	0,37	0,51	0,30	0,14
Acidimicrobiales	1,18	1,07	1,17	0,85	0,57
Actinomycetales	40,15	41,82	37,96	37,81	38,05
Gaiellales	0,47	0,39	0,41	0,21	0,27
Solirubrobacterales	1,19	1,06	1,07	0,64	0,75
Bacteroidales	0,47	0,36	0,76	0,28	0,16
Flavobacteriales	1,11	1,20	1,40	1,68	1,52
Sphingobacteriales	0,61	0,56	0,58	0,46	0,99
Anaerolineales	0,58	0,47	0,55	0,33	0,11
Sphaerobacterales	1,76	1,48	1,47	1,15	0,50
Halobacteriales	0,22	0,34	0,07	0,12	0,01
Bacillales	6,98	6,19	12,91	9,36	2,20
Lactobacillales	0,24	0,24	0,38	0,27	0,18
Clostridiales	1,71	1,48	1,98	1,28	0,96
Gemmatimonadales	0,31	0,31	0,29	0,22	0,09
Phycisphaerales	0,21	0,10	0,14	0,13	0,05
Planctomycetales	1,11	0,39	0,87	0,63	1,01
Caulobacterales	0,61	0,65	0,58	0,40	0,06
Rhizobiales	5,27	4,42	5,46	3,74	4,81
Rhodobacterales	0,84	0,77	0,86	0,62	0,37
Rhodospirillales	2,01	1,53	2,22	1,34	3,42
Sphingomonadales	2,22	3,55	1,82	2,01	18,06
Burkholderiales	1,72	1,52	1,60	1,37	7,45
Desulfobacterales	0,21	0,15	0,26	0,16	0,17
Desulfovibrionales	0,54	0,32	0,51	0,33	0,25
Alteromonadales	0,79	0,72	0,78	0,69	1,23
Chromatiales	0,98	0,72	1,01	0,65	0,64
Gammaproteobacteria	0,65	0,36	0,77	0,44	0,03
Legionellales	0,31	0,16	0,42	0,20	0,03
Nevskiales	0,22	0,17	0,24	0,15	0,05
Oceanospirillales	18,64	21,92	14,73	27,65	13,53
Pseudomonadales	1,00	0,68	1,06	0,88	0,19
Salinisphaerales	0,00	0,01	0,00	0,01	0,39
Xanthomonadales	1,91	1,68	1,88	1,42	0,46
Hydrogenophilales	0,17	0,15	0,20	0,13	0,02
Verrucomicrobiales	0,28	0,24	0,26	0,11	0,09
Otros	2,80	2,46	2,80	2,02	1,19

Orden	Día 208(NPK)		
	m-C	m-AM	m-AM/T
Acidobacteriales	0,36	0,34	0,12
Acidimicrobiales	0,95	0,97	0,66
Actinomycetales	44,81	56,61	41,08
Gaiellales	0,27	0,35	0,27
Solirubrobacterales	0,77	0,96	0,85
Bacteroidales	0,29	0,15	0,03
Flavobacteriales	1,01	0,45	9,93
Sphingobacteriales	0,21	0,17	0,13
Anaerolineales	0,44	0,41	0,07
Sphaerobacterales	1,30	1,38	0,88
Halobacteriales	0,09	0,06	0,01
Bacillales	2,53	3,24	2,22
Lactobacillales	0,16	0,15	0,20
Clostridiales	1,45	1,14	0,78
Gemmatimonadales	0,19	0,24	0,06
Phycisphaerales	0,14	0,09	0,01
Planctomycetales	0,61	0,57	0,55
Caulobacterales	0,38	0,32	0,04
Rhizobiales	5,07	4,16	6,64
Rhodobacterales	0,70	0,58	0,26
Rhodospirillales	1,95	1,37	2,92
Sphingomonadales	1,35	1,91	2,30
Burkholderiales	0,69	0,58	6,50
Desulfobacterales	0,22	0,13	0,16
Desulfovibrionales	0,52	0,23	0,13
Alteromonadales	0,32	0,35	8,72
Chromatiales	0,70	0,59	0,43
Gammaproteobacteria	0,50	0,25	0,01
Legionellales	0,17	0,13	0,02
Nevskiales	0,14	0,10	0,02
Oceanospirillales	25,02	17,49	10,10
Pseudomonadales	3,25	1,50	1,82
Salinisphaerales	0,07	0,03	0,71
Xanthomonadales	1,06	0,91	0,38
Hydrogenophilales	0,13	0,09	0,01
Verrucomicrobiales	0,13	0,14	0,04
Otros	2,06	1,86	0,94

Tabla S6. Abundancia relativa de géneros bacterianos en los microcosmos m-C, m-AM, m-B *srf+*, m-AM+B *srf+* y m-AM/T en el día 1, 28, 85, 180 y 203 (NPK) de tratamiento. (C: Candidatus). Se muestran los órdenes que se presentaron en un porcentaje mayor al 1% en al menos uno de los microcosmos.

Género	Día 1				
	m-C	m-AM	m-B <i>srf+</i>	m-AM+B <i>srf+</i>	m-AM/T
<i>Dietzia</i>	1,26	0,70	0,60	1,35	1,00
<i>Gordonia</i>	1,68	1,51	1,26	1,29	0,83
<i>Mycobacterium</i>	2,36	2,27	2,04	2,04	1,81
<i>Rhodococcus</i>	0,89	1,07	0,89	0,73	0,73
<i>Arthrobacter</i>	2,47	2,31	2,06	2,73	2,40
<i>Brachybacterium</i>	1,17	0,84	0,68	1,38	1,17
<i>Brevibacterium</i>	0,06	0,06	0,04	0,09	0,07
<i>Cellulomonas</i>	1,30	1,21	1,01	1,30	1,15
<i>Frigoribacterium</i>	1,53	1,56	1,13	1,20	1,24
<i>Georgenia</i>	1,20	1,13	0,93	1,34	1,10
<i>Janibacter</i>	1,10	0,80	0,62	1,23	1,26
<i>Microbacterium</i>	0,78	0,83	0,63	0,75	0,67
<i>Oryzihumus</i>	0,32	0,23	0,18	0,30	0,29
<i>Promicromonospora</i>	5,68	5,74	4,26	4,94	6,04
<i>Nocardioides</i>	3,73	3,67	2,79	3,26	2,67
<i>Pseudonocardia</i>	0,22	0,29	0,23	0,16	0,23
<i>Streptomyces</i>	1,61	1,84	1,59	1,49	1,57
<i>Galbibacter</i>	0,04	0,06	0,02	0,05	0,06
<i>Salinimicrobium</i>	1,78	0,59	0,70	1,86	1,92
<i>Sphaerobacter</i>	1,41	1,51	1,25	1,36	1,04
<i>Bacillus</i>	4,03	3,82	14,53	7,81	4,54
<i>Planomicrobium</i>	0,89	0,58	0,41	0,80	1,07
<i>Thalassobacillus</i>	0,84	0,81	0,57	0,83	1,08
<i>Clostridium</i>	1,44	1,61	1,93	1,35	1,01
<i>Hyphomicrobium</i>	1,92	2,55	2,68	1,99	1,34
<i>Parvibaculum</i>	0,05	0,05	0,04	0,03	0,04
<i>Inquilinus</i>	0,07	0,08	0,06	0,05	0,06
<i>Defluviococcus</i>	1,08	1,70	1,93	1,12	0,75
<i>Altererythrobacter</i>	0,05	0,03	0,03	0,05	0,03
<i>Erythrobacter</i>	0,59	0,60	0,47	0,49	0,63
<i>Sphingobium</i>	0,52	2,73	0,38	1,77	8,48
<i>Alcaligenes</i>	0,75	0,72	0,65	0,60	0,86
<i>Bordetella</i>	0,40	0,44	0,34	0,36	0,39
<i>Pusillimonas</i>	0,27	0,30	0,27	0,28	0,31
<i>Idiomarina</i>	0,03	0,01	0,01	0,03	0,02
<i>Marinobacter</i>	1,05	1,05	0,89	0,84	1,01
<i>C Competibacter</i>	0,94	1,62	1,25	0,99	0,53
<i>Alcanivorax</i>	18,50	11,74	11,17	17,96	19,81

<i>Halomonas</i>	0,38	0,32	0,30	0,35	0,37
<i>Salinicola</i>	1,57	1,42	1,14	1,42	2,32
<i>Pseudomonas</i>	1,13	0,92	0,75	1,07	1,07
Otros	32,90	38,71	37,28	30,97	27,07

Género	Día 28				
	m-C	m-AM	m-B <i>srf+</i>	m-AM+B <i>srf+</i>	m-AM/T
<i>Dietzia</i>	1,60	0,87	0,74	1,42	0,91
<i>Gordonia</i>	1,60	1,53	1,20	1,31	1,18
<i>Mycobacterium</i>	2,26	2,17	1,92	1,90	2,12
<i>Rhodococcus</i>	0,88	0,98	0,84	0,82	0,60
<i>Arthrobacter</i>	2,87	2,44	1,98	2,94	1,18
<i>Brachybacterium</i>	2,22	1,25	0,98	1,74	0,80
<i>Brevibacterium</i>	0,14	0,08	0,05	0,09	0,18
<i>Cellulomonas</i>	1,56	1,61	1,13	1,45	0,95
<i>Frigoribacterium</i>	1,37	1,48	1,19	1,25	0,94
<i>Georgenia</i>	1,57	1,77	1,11	1,52	1,01
<i>Janibacter</i>	1,81	1,31	0,86	1,46	1,07
<i>Microbacterium</i>	0,83	0,89	0,66	0,91	0,58
<i>Oryzihumus</i>	0,45	0,35	0,24	0,31	0,25
<i>Promicromonospora</i>	5,49	6,79	4,63	4,74	2,54
<i>Nocardioides</i>	3,71	4,18	3,06	3,32	2,18
<i>Pseudonocardia</i>	0,19	0,35	0,28	0,19	0,16
<i>Streptomyces</i>	1,82	2,16	1,64	1,47	0,53
<i>Galbibacter</i>	0,05	0,05	0,03	0,06	0,02
<i>Salinimicrobium</i>	1,87	0,61	0,74	1,99	1,08
<i>Sphaerobacter</i>	1,64	1,78	1,31	1,52	0,85
<i>Bacillus</i>	3,91	4,37	19,05	7,22	2,14
<i>Planomicrobium</i>	1,09	0,72	0,39	0,92	0,75
<i>Thalassobacillus</i>	0,99	0,93	0,69	0,85	0,26
<i>Clostridium</i>	1,17	1,12	1,38	1,21	0,80
<i>Hyphomicrobium</i>	1,93	1,59	1,93	1,70	1,34
<i>Parvibaculum</i>	0,05	0,05	0,03	0,03	0,03
<i>Inquilinus</i>	0,07	0,09	0,07	0,07	0,05
<i>Defluviococcus</i>	0,97	0,63	1,10	0,73	0,80
<i>Altererythrobacter</i>	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03
<i>Erythrobacter</i>	0,53	0,76	0,49	0,50	0,45
<i>Sphingobium</i>	0,51	3,12	0,56	1,67	2,74
<i>Alcaligenes</i>	0,60	0,67	0,53	0,72	0,45
<i>Bordetella</i>	0,39	0,45	0,36	0,41	0,27
<i>Pusillimonas</i>	0,27	0,27	0,25	0,35	0,17
<i>Idiomarina</i>	0,02	0,01	0,01	0,03	0,01
<i>Marinobacter</i>	0,94	1,29	0,94	0,71	0,49
<i>C Competibacter</i>	0,72	0,71	1,01	0,76	0,78
<i>Alcanivorax</i>	16,64	12,62	11,14	18,80	35,54

<i>Halomonas</i>	0,37	0,36	0,33	0,36	0,79
<i>Salinicola</i>	1,66	1,38	1,19	1,48	7,89
<i>Pseudomonas</i>	1,05	1,00	0,84	0,94	0,74
Otros	32,15	35,16	33,12	30,08	24,32

Género	Día 85				
	m-C	m-AM	m-B <i>srf</i> +	m-AM+B <i>srf</i> +	m-AM/T
<i>Dietzia</i>	1,47	0,99	0,67	2,67	0,52
<i>Gordonia</i>	1,35	1,65	1,28	1,35	2,14
<i>Mycobacterium</i>	2,07	2,19	1,89	1,76	2,13
<i>Rhodococcus</i>	0,75	0,91	0,65	0,74	0,58
<i>Arthrobacter</i>	2,61	2,58	2,00	2,10	0,76
<i>Brachybacterium</i>	2,89	2,32	1,37	2,53	0,81
<i>Brevibacterium</i>	0,17	0,10	0,05	2,43	17,82
<i>Cellulomonas</i>	1,81	1,84	1,08	1,80	1,88
<i>Frigoribacterium</i>	1,39	1,56	1,16	1,08	0,35
<i>Georgenia</i>	1,89	1,87	1,17	1,69	0,89
<i>Janibacter</i>	2,46	2,12	1,09	2,96	1,28
<i>Microbacterium</i>	0,96	1,00	0,82	0,77	0,33
<i>Oryzihumus</i>	0,56	0,48	0,27	0,66	0,30
<i>Promicromonospora</i>	5,70	6,39	3,95	4,71	0,67
<i>Nocardioides</i>	4,08	4,75	3,29	3,45	1,88
<i>Pseudonocardia</i>	0,18	0,35	0,23	0,12	0,59
<i>Streptomyces</i>	1,40	1,70	1,37	0,87	0,66
<i>Galbibacter</i>	0,05	0,04	0,03	0,03	0,00
<i>Salinimicrobium</i>	1,45	0,55	0,79	1,31	0,15
<i>Sphaerobacter</i>	1,93	1,77	1,34	0,97	1,49
<i>Bacillus</i>	4,28	4,72	20,52	7,23	1,83
<i>Planomicrobium</i>	1,15	0,93	0,48	0,74	0,10
<i>Thalassobacillus</i>	1,23	1,15	0,69	0,59	0,20
<i>Clostridium</i>	1,21	1,24	1,25	0,89	1,05
<i>Hyphomicrobium</i>	1,52	1,96	2,40	1,23	3,72
<i>Parvibaculum</i>	0,05	0,06	0,03	0,05	0,04
<i>Inquilinus</i>	0,05	0,07	0,05	0,05	0,14
<i>Defluviococcus</i>	0,65	0,84	1,14	0,50	0,97
<i>Altererythrobacter</i>	0,04	0,04	0,04	0,03	0,05
<i>Erythrobacter</i>	0,59	0,73	0,47	0,48	0,15
<i>Sphingobium</i>	0,55	3,03	0,53	1,42	0,27
<i>Alcaligenes</i>	0,56	0,66	0,65	0,39	0,09
<i>Bordetella</i>	0,36	0,43	0,34	0,22	0,42
<i>Pusillimonas</i>	0,27	0,24	0,24	0,16	0,05
<i>Idiomarina</i>	0,03	0,02	0,02	0,00	0,00
<i>Marinobacter</i>	0,99	1,07	0,83	0,62	0,16
<i>C Competibacter</i>	0,65	0,73	0,95	0,50	0,47
<i>Alcanivorax</i>	17,21	11,52	9,42	25,43	18,84

<i>Halomonas</i>	0,36	0,36	0,29	0,37	2,66
<i>Salinicola</i>	1,79	1,51	1,11	1,98	8,26
<i>Pseudomonas</i>	0,86	0,68	0,66	0,77	0,47
Otros	30,43	32,90	33,36	22,37	24,84

Género	Día 180				
	m-C	m-AM	m-B <i>srf+</i>	m-AM+B <i>srf+</i>	m-AM/T
<i>Dietzia</i>	1,11	1,13	1,30	2,92	0,18
<i>Gordonia</i>	1,53	1,46	1,46	1,29	1,63
<i>Mycobacterium</i>	2,07	1,90	2,14	1,52	1,24
<i>Rhodococcus</i>	0,85	0,90	0,89	0,75	0,32
<i>Arthrobacter</i>	2,22	2,21	2,38	2,20	0,60
<i>Brachybacterium</i>	2,07	2,07	2,60	2,87	0,99
<i>Brevibacterium</i>	1,27	1,55	0,79	3,47	23,75
<i>Cellulomonas</i>	1,98	2,13	1,64	1,86	1,09
<i>Frigoribacterium</i>	1,31	1,22	1,31	1,11	0,15
<i>Georgenia</i>	2,22	2,39	2,14	1,87	0,65
<i>Janibacter</i>	4,41	5,25	3,84	3,05	2,36
<i>Microbacterium</i>	0,85	0,86	0,88	0,81	0,14
<i>Oryzihumus</i>	1,02	1,15	0,77	0,72	0,40
<i>Promicromonospora</i>	5,11	5,47	4,39	4,81	0,16
<i>Nocardioides</i>	4,02	4,20	3,94	2,99	0,66
<i>Pseudonocardia</i>	0,62	0,52	0,30	0,16	1,03
<i>Streptomyces</i>	0,96	0,89	1,11	0,82	0,46
<i>Galbibacter</i>	0,04	0,03	0,03	0,03	1,39
<i>Salinimicrobium</i>	0,66	0,68	0,76	1,28	0,04
<i>Sphaerobacter</i>	1,76	1,48	1,47	1,14	0,50
<i>Bacillus</i>	4,12	3,59	9,09	6,62	1,48
<i>Planomicrobium</i>	1,14	1,00	1,41	1,09	0,02
<i>Thalassobacillus</i>	0,90	0,85	1,31	0,76	0,16
<i>Clostridium</i>	1,27	1,07	1,41	0,94	0,55
<i>Hyphomicrobium</i>	1,78	1,31	1,84	1,18	2,76
<i>Parvibaculum</i>	0,04	0,05	0,04	0,03	0,01
<i>Inquilinus</i>	0,08	0,06	0,05	0,03	2,76
<i>Defluviococcus</i>	0,78	0,51	0,92	0,50	0,29
<i>Altererythrobacter</i>	0,03	0,05	0,04	0,03	1,38
<i>Erythrobacter</i>	0,64	0,67	0,53	0,46	16,12
<i>Sphingobium</i>	0,66	1,98	0,41	0,90	0,10
<i>Alcaligenes</i>	0,47	0,43	0,47	0,36	0,88
<i>Bordetella</i>	0,31	0,29	0,26	0,25	1,72
<i>Pusillimonas</i>	0,20	0,17	0,19	0,16	4,50
<i>Idiomarina</i>	0,01	0,01	0,01	0,02	1,19
<i>Marinobacter</i>	0,72	0,68	0,71	0,60	0,02
<i>C Competibacter</i>	0,63	0,35	0,76	0,43	0,03
<i>Alcanivorax</i>	16,04	19,62	12,53	25,04	4,31

<i>Halomonas</i>	0,35	0,37	0,33	0,44	5,68
<i>Salinicola</i>	1,91	1,59	1,56	1,87	3,28
<i>Pseudomonas</i>	0,68	0,50	0,79	0,65	0,12
Otros	31,15	27,39	31,22	21,94	14,91

Género	Día 208(NPK)		
	m-C	m-AM	m-AM/T
<i>Dietzia</i>	0,62	0,56	0,14
<i>Gordonia</i>	1,28	1,49	2,27
<i>Mycobacterium</i>	1,64	1,46	1,34
<i>Rhodococcus</i>	0,58	0,53	0,30
<i>Arthrobacter</i>	1,15	1,07	0,21
<i>Brachybacterium</i>	1,53	1,34	0,89
<i>Brevibacterium</i>	16,60	19,23	25,30
<i>Cellulomonas</i>	1,21	1,41	0,61
<i>Frigoribacterium</i>	0,66	0,55	0,14
<i>Georgenia</i>	1,45	1,61	0,57
<i>Janibacter</i>	7,56	13,57	4,17
<i>Microbacterium</i>	0,47	0,39	0,16
<i>Oryzihumus</i>	1,70	3,08	0,74
<i>Promicromonospora</i>	1,17	1,53	0,14
<i>Nocardioides</i>	2,16	2,75	0,77
<i>Pseudonocardia</i>	0,23	0,41	0,68
<i>Streptomyces</i>	0,45	0,52	0,39
<i>Galbibacter</i>	0,02	0,01	9,77
<i>Salinimicrobium</i>	0,70	0,30	0,05
<i>Sphaerobacter</i>	1,30	1,37	0,88
<i>Bacillus</i>	1,46	1,88	1,52
<i>Planomicrobium</i>	0,53	0,62	0,01
<i>Thalassobacillus</i>	0,15	0,19	0,21
<i>Clostridium</i>	1,09	0,79	0,42
<i>Hyphomicrobium</i>	2,17	1,54	3,52
<i>Parvibaculum</i>	0,02	0,02	1,02
<i>Inquilingus</i>	0,05	0,04	2,38
<i>Defluviicoccus</i>	0,93	0,45	0,10
<i>Altererythrobacter</i>	0,02	0,03	0,20
<i>Erythrobacter</i>	0,43	0,44	1,67
<i>Sphingobium</i>	0,22	0,64	0,15
<i>Alcaligenes</i>	0,15	0,12	1,00
<i>Bordetella</i>	0,09	0,09	1,19
<i>Pusillimonas</i>	0,07	0,06	4,15
<i>Idiomarina</i>	0,01	0,01	8,69
<i>Marinobacter</i>	0,27	0,31	0,02
<i>C Competibacter</i>	0,49	0,25	0,01
<i>Alcanivorax</i>	22,95	16,20	4,58

<i>Halomonas</i>	0,52	0,36	4,02
<i>Salinicola</i>	1,39	0,78	1,27
<i>Pseudomonas</i>	3,18	1,42	1,77
Otros	21,31	20,56	12,57