



Optimización de un proceso de bioestimulación en un suelo de Río Gallegos, Argentina, para su utilización en biorremediación de hidrocarburos

Luciana Cambarieri¹ , Graciela N. Pucci² , Adrián J. Acuña^{1,*}

(1) Grupo de Estudios Ambientales (GEA), Facultad Regional Santa Cruz, Universidad Tecnológica Nacional. Avenida de los Inmigrantes 555, Río Gallegos, Santa Cruz, Argentina.

(2) Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada (CEIMA), Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Ciudad Universitaria, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

* Autor de Correspondencia: Adrián J. Acuña [adrianjacuna@yahoo.com.ar]

> Recibido el 22 de septiembre de 2020 - Aceptado el 11 de marzo de 2021

Como citar: Cambarieri, L., Pucci, G.N., Acuña, A.J. 2021. Optimización de un proceso de bioestimulación en un suelo de Río Gallegos, Argentina, para su utilización en biorremediación de hidrocarburos. *Ecosistemas* 30(1): 2084. <https://doi.org/10.7818/ECOS.2084>

Optimización de un proceso de bioestimulación en un suelo de Río Gallegos, Argentina, para su utilización en biorremediación de hidrocarburos

Resumen: La bioestimulación es una metodología aceptada para promover la biorremediación de hidrocarburos en un suelo. El objetivo del presente trabajo fue optimizar la relación C:N:P, humedad y concentración y tipo de hidrocarburos para estudiar la viabilidad de un proceso de biodegradación de hidrocarburos en un suelo de la ciudad de Río Gallegos, Argentina. Se realizaron cuatro bioensayos utilizando microcosmos para determinar las condiciones de C:N:P (100:7.5:0.75, 100:5:0.5, 100:2.5:0.25 and 100:1:0.1), humedad (0% - 15 %), concentración de hidrocarburos (0% - 5 %) y tipo de contaminante para mejorar la eficiencia de la biorremediación. La monitorización de los experimentos incluyó la mineralización y cuantificación de hidrocarburos y de bacterias heterótrofas y degradadoras de hidrocarburos. Los resultados demostraron que la relación C:N:P óptima fue de 100:2.5:0.25, con un rango de incorporación de humedad de entre 10-15% para un suelo con 3% de hidrocarburos. Se observó que con la aplicación de una adecuada bioestimulación, la biorremediación puede ser efectiva, estimándose que los hidrocarburos de la nafta podrán volatilizarse generando una inhibición de la actividad bacteriana. Los resultados también mostraron que cuando los hidrocarburos de la nafta son eliminados del suelo en un 100%, la actividad bacteriana puede recuperarse y desarrollar la biodegradación del gasoil, y en menor medida los del aceite, brindando esto un panorama auspicioso para la aplicación de esta tecnología a gran escala en la región.

Palabras clave: contaminación; Patagonia; petróleo; remediación

Optimizing a biostimulation process in a soil of Río Gallegos, Argentina, for use in bioremediation of hydrocarbons

Abstract: Biostimulation is an accepted methodology to promote the bioremediation of hydrocarbons in a soil. The objective of this work was to optimize the C: N: P ratio, humidity and concentration and type of hydrocarbons to study the viability of a hydrocarbon biodegradation process in a soil in the city of Río Gallegos, Argentina. Four experiences were developed in microcosms, testing different C:N:P ratios (100:7.5:0.75, 100:5:0.5, 100:2.5:0.25 and 100:1:0.1), relative humidity (0% - 15 %), hydrocarbon concentrations (0% - 5%), and contaminants (gasoline, diesel, lubricating oil and mixtures of them). Monitoring included the mineralization and quantification of hydrocarbons and of heterotrophic and hydrocarbon degrading bacteria. The results showed that the optimal C:N:P ratio was 100:2.5:0.25, with a moisture incorporation range of 10-15% for a soil with 3% hydrocarbons. It was observed that with the application of adequate biostimulation, bioremediation can be effective, estimating that the hydrocarbons in the gasoline may volatilize, generating an inhibition of bacterial activity. The results also showed that when the hydrocarbons of the gasoline are eliminated from the soil 100%, the bacterial activity can recover and develop the biodegradation of the diesel oil, and to a lesser extent those of the oil, providing an auspicious panorama for the application of this large-scale technology in the region.

Keywords: pollution; Patagonia; oil; remediation

Introducción

La utilización de hidrocarburos es algo indispensable en nuestra vida cotidiana, teniendo como consecuencia negativa derivada de su uso, los problemas de contaminación que se generan por diversas causas (Vandecasteele 2008). Esto ocasiona una preocupación importante por las posibles consecuencias para el ecosistema y la salud humana (Khan et al. 2018). A lo largo de las décadas, los mé-

todos biológicos de restauración de ambientes contaminados con hidrocarburos han recibido mucha atención, por ser poco agresivos dado a su potencial para reducir, desintoxicar y mineralizar este tipo de contaminantes restaurando el equilibrio ambiental a bajo costo (Tang et al. 2009; Ahmad et al. 2020). La biorremediación se define como el uso de microorganismos vivos, principalmente bacterias, para descomponer o degradar hidrocarburos del petróleo en productos inocuos como el dióxido de carbono y el agua (Lawnic-

zak et al. 2020). La biorremediación se caracteriza por poseer muchas ventajas, dentro de las que se destacan su rentabilidad, simplicidad en la aplicación de la tecnología, conservación de la textura y propiedades del suelo y su capacidad para producir productos finales inocuos (Iman et al. 2019). Se ha demostrado que la bioestimulación es una técnica de biorremediación eficiente para el tratamiento de suelos contaminados (Wu et al. 2016).

La bioestimulación, que implica la adición de macronutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, se considera el proceso de biorremediación más simple y económico (Nwankwegu y Onwosi 2017). Los nutrientes que se incorporan son esenciales para que se lleve a cabo el metabolismo bacteriano, y así estos microorganismos puedan llevar adelante la incorporación de los hidrocarburos como fuente de carbono y energía (Acuña et al. 2012). De forma complementaria, también hay que adicionar agua en cantidad óptima, la cual suele ser en concentraciones que rondan el 50% de la capacidad de retención de agua del suelo donde se lleva adelante el proceso de biorremediación, siendo en muchas ocasiones necesario realizar una adecuada aireación de estos suelos (Azubuike et al. 2016).

Diferentes relaciones entre carbono, nitrógeno y fósforo (C:N:P) se han considerado como referencia para la adición de nutrientes en enfoques de bioestimulación a lo largo de los años (Dong et al. 2015; Acuña et al. 2020). Algunos autores informan que una relación C:N:P de 100:10:1 es la óptima (Liu et al. 2011; Ahmad et al. 2020), pero no todos los suelos se comportan de la misma forma respecto de la incorporación de este tipo de nutrientes (Acuña et al. 2007). Esto es porque para obtener resultados óptimos, esta proporción debe ajustarse en cada suelo en particular, ya que cada suelo tiene su propia biodiversidad microbiana, lo que le confiere necesidades biológicas particulares (Lawniczak et al. 2020). Estas consideraciones son claramente visibles cuando se proporciona una adición excesiva de nutrientes, lo que resulta en la inhibición de la actividad biológica con una menor degradación de hidrocarburos (Acuña et al. 2007; Liu et al. 2011). Por esta razón, la optimización de esta estrategia es un paso clave antes de la aplicación a gran escala de este tipo de tecnologías de saneamiento ambiental (Al-Hawash et al. 2018).

En trabajos anteriores se han discutido las posibilidades de aplicación de los métodos de biorremediación en suelos semiáridos de la Patagonia (Álvarez 2015; Álvaro et al. 2017; Acuña et al. 2018), llegándose a la conclusión de que es posible una buena biodegradación aún en climas y suelos con características extremas como los de la Patagonia central. De esta forma, Carrizo et al. (2015) demostraron que en suelos de la región norte de la provincia de Santa Cruz es posible la biodegradación de mezclas complejas de hidrocarburos a escala de campo mediante la utilización de biopilas. Encontraron un porcentaje de biodegradación de estos compuestos cercano al 50% con la realización de una adecuada bioestimulación. Sin embargo, poco se conoce respecto de la optimización de los parámetros fundamentales que regulan el proceso de biorremediación en suelos del extremo sur de la Patagonia Argentina, ya que la gran mayoría de los desarrollos de investigación en este sentido fueron focalizados en la zona central y norte de esta región. Recientemente Cambarieri et al. (2020) y Acuña et al. (2020) han demostrado que en los suelos de la ciudad de Río Gallegos, extremo sur de la Patagonia Argentina, es posible realizar procesos de biorremediación de hidrocarburos provenientes de residuos de estaciones de despacho de combustibles. No obstante, es escaso el conocimiento respecto de cuál será para estos suelos la relación óptima de C:N:P, la cantidad necesaria y óptima de humedad a incorporar, como la cantidad y tipo de hidrocarburos que pueden ser biodegradados por las comunidades bacterianas presentes.

El objetivo del presente trabajo fue optimizar los parámetros de relación C:N:P y humedad con diferentes concentraciones y tipos de hidrocarburos para estudiar la viabilidad de un proceso de biodegradación de hidrocarburos destilados de petróleo de un suelo de la ciudad de Río Gallegos, Santa Cruz, Argentina.

Materiales y Métodos

Caracterización de la muestra suelo

Se tomó una muestra de suelo patagónico de aproximadamente 8 kg en las inmediaciones de la ciudad de Río Gallegos, Santa Cruz, Argentina, a una profundidad comprendida entre los 10 y 30 cm. La misma se tamizó con una malla de 2 mm de poro y se almacenó hasta su posterior caracterización física, química y microbiológica.

Determinación de aniones y cationes

Se realizaron determinaciones de humedad, densidad real, densidad aparente, porosidad, capacidad de retención de agua y porcentaje de materia orgánica e inorgánica, según lo propuesto por García Trejo (1981). La determinación de pH, cationes y aniones se hizo sobre un extracto de muestra 1:2.5 en agua destilada. La medición de pH se realizó potenciométricamente con electrodo de vidrio. Se midieron el contenido de carbonato y bicarbonato por titulación con ácido clorhídrico 0.1 N utilizando fenolftaleína y heliantina como indicadores (Peressutti et al. 2003). El contenido de sulfatos, se efectuó a través del método turbidimétrico, basado en su precipitación en medio ácido. Las mediciones de calcio y magnesio se hicieron a través de complejometría con EDTA, a pH 12, para el primero de ellos utilizando murexida como indicador y a pH 10 con negro de ericromo T como indicador, para el segundo (Peressutti et al. 2003). Los cloruros fueron determinados por el método de Mohr, el ión amonio como azul de indofenol y el fosfato con azul de molibdeno (Acuña et al. 2008). El contenido de nitrito se midió por colorimetría con ácido sulfanílico y 1-naftilamina y el nitrato con brucina en presencia de ácido sulfúrico (Acuña et al. 2008). Para la cuantificación de metales pesados, 0.5 g de suelo fueron sometidos a una extracción con ácido nítrico según lo establecido en la norma EPA 3050B. Los metales Ag, As, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb, Zn, Ba y Se se cuantificaron por espectrometría de absorción atómica según las normas EPA 7000B, 7061A y 7741A.

Análisis microbiológico

El recuento de bacterias heterótrofas (BAT) y degradadoras de hidrocarburos (BDH) se realizó por el método de diseminación en superficie. Para ello se realizó una suspensión de 1 g de muestra en 9 mL de solución fisiológica estéril y se homogeneizó en un agitador orbital por 30 minutos a 80 r.p.m. El medio de cultivo utilizado para BAT fue R2A y para BDH fue MM-PGO de acuerdo a lo propuesto por Acuña et al. (2012). La incubación de las placas de recuento se realizó a 28°C por 20 días.

Análisis de hidrocarburos totales del petróleo

Para la evaluación de los hidrocarburos se siguieron los lineamientos propuestos para este tipo de análisis según la norma TNRCC 1005. A tal efecto, 10 gramos de suelo fueron colocados en un vial de 20 mL y 10 mL de pentano fueron agregados. Los viales fueron agitados en un agitador horizontal a 120 oscilaciones.min⁻¹ por una hora. Los extractos se dejaron decantar toda la noche para finalmente separar la fase orgánica. Para la identificación y cuantificación se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilen, modelo 7890B, con un detector tipo FID alimentado por hidrógeno y aire cromatográfico. El puerto de inyección fue Split/splitless y la inyección de las muestras se realizó con jeringa de 10 µL con una torre de inyección automática. La columna utilizada fue HP-5 de marca Agilen de 30m x 0.32mm x 0.25µm con gas nitrógeno como carrier a un flujo de 3mL.min⁻¹. Las condiciones de corrida que se utilizaron fueron: volumen de muestra inyectado fue de 1 µL en modo splitless con un flujo de inyección de 20 mL.min⁻¹ con una temperatura del inyector de 285°C. El programa del horno comenzó a 30°C por 3 minutos, seguido de una rampa de 15°C.min⁻¹ hasta alcanzar los 300°C de temperatura que luego se mantuvo 5 minutos. Luego se utilizó una rampa de 15°C.min⁻¹ hasta alcanzar los 325°C, temperatura que se mantuvo hasta al-

canzar los 30 minutos de corrida total. El detector FID se mantuvo a una temperatura de 325°C, con un flujo de hidrógeno de 30mL.min⁻¹ y de aire cromatográfico de 400mL.min⁻¹. La cuantificación se llevó a cabo utilizando los estándares propuestos por las normas EPA 8015 y TNRC 1005.

Ensayo de Biorremediación asistida

Optimización de la relación C:N:P y de la fuente de nitrógeno

Se diseñaron microcosmos con 200 g de suelo, por triplicado, a los que se les variaron las proporciones de C:N:P y la fuente de nitrógeno. Las relaciones de C:N:P estudiadas fueron: 100:7.5:0.75, 100:5:0.5, 100:2.5:0.25 y 100:1:0.1. Las fuentes de nitrógeno que se emplearon fueron nitrato de potasio y sulfato de amonio, y como fuente de fósforo se utilizó fosfato monopotásico. A todos los sistemas se les incorporó agua para lograr un valor de humedad en el suelo igual al 50% de su capacidad de retención de agua, y gasoil al 3%. En el interior de cada sistema, se colocó un recipiente con NaOH de concentración conocida con el objeto de fijar dióxido de carbono generado a partir de la mineralización de los hidrocarburos presentes, para luego titularlo con una solución valorada de HCl con heliantina y fenolftaleína como indicadores (Acuña et al. 2020). De esta manera se monitoreó la producción de dióxido de carbono con una frecuencia aproximada de 2 días. Los sistemas se incubaron a una temperatura de 28°C durante un total 60 días.

Optimización de humedad

Para la ejecución de esta experiencia fueron diseñados 7 microcosmos por triplicado con 200 g de suelo, con el fin de evaluar el rango de concentración de humedad más efectiva para el proceso de biodegradación. Para tal fin se empleó la relación C:N:P y fuente de nitrógeno a incorporar a los sistemas, que exhibiera los mejores resultados en las experiencias de optimización de estos parámetros. El contaminante incorporado fue gasoil con una concentración de 3%. Los porcentajes de humedad adicionados fueron: 0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 12.5% y 15%. Los sistemas se monitorearon con una frecuencia aproximada de dos días, con el objeto de medir la producción de dióxido de carbono generada por la mineralización de hidrocarburos, a través del método explicado anteriormente. Los sistemas se incubaron a una temperatura de 28°C, durante 60 días.

Rango de concentración de contaminante ensayado

Para la determinación del rango de concentración de hidrocarburos en el que el proceso de biodegradación se produce con mayor eficiencia, fueron confeccionados 10 microcosmos por triplicado con 200 g de suelo, con la relación C:N:P, fuente de nitrógeno a incorporar en los sistemas, y porcentaje de humedad, que mostraran los mejores resultados obtenidos a partir de las ensayos de optimización de estos parámetros. El contaminante empleado en la experiencia fue gasoil, y se aplicó en las siguientes concentraciones: 0%; 0.5%; 1%; 1.5%; 2%; 2.5%; 3%; 3.5%; 4% y 5%. Finalmente, los sistemas fueron incubados a una temperatura de 28°C durante 60 días. Los mismos se monitorearon por dosaje de dióxido de carbono generado por la mineralización de hidrocarburos, por el método explicado anteriormente, con una frecuencia aproximada de 2 días.

Los datos obtenidos de las experiencias mencionadas, fueron utilizados para calcular la tasa o velocidad de mineralización según la siguiente ecuación:

$$\mu_{CO_2} = \frac{\Delta CO_2}{\Delta t} \quad \text{ecuación (1)}$$

donde μ_{CO_2} es la velocidad de mineralización expresada en mgCO₂.kg⁻¹ de suelo por día, ΔCO_2 es el CO₂ producido en el microcosmo en un período de tiempo determinado expresado en mgCO₂.kg⁻¹ de suelo y Δt el tiempo en días del período estudiado.

Biodegradación de destilados del petróleo

Para estudiar la capacidad de los microorganismos del suelo de biodegradar los destilados de petróleo, se confeccionaron seis microcosmos por triplicado con la relación C:N:P, fuente de nitrógeno a incorporar en los sistemas, porcentaje de humedad y de hidrocarburos, que exhibieran los mejores resultados en las experiencias de optimización de estos parámetros (C:N:P: de 100:2.5:0.25 con KNO₃ como fuente de nitrógeno, 10% de humedad y 3% de hidrocarburos). El primer microcosmo (Blanco), fue el blanco de la experiencia, que se confeccionó de igual forma que el resto pero sin el agregado de ningún hidrocarburo. El segundo (Gasoil), al cual se le incorporó como contaminante gasoil, el tercero (Nafta) al cual se le incorporó nafta como contaminante y el cuarto (Aceite) al que se le incorporó aceite lubricante. El quinto sistema (GO/Ace) se contaminó con una mezcla 1:1 de gasoil y aceite lubricante y el sexto (GO/Naft/Ace) con una mezcla 1:1:1 de gasoil, aceite lubricante y nafta. Estos sistemas se incubaron a una temperatura de 28 °C durante 100 días.

Los microcosmos fueron monitoreados cada dos días, con el objeto de medir el dióxido de carbono producido a partir de la mineralización de los hidrocarburos. Las mediciones se realizaron por el método anteriormente mencionado y los datos obtenidos fueron utilizados para determinar la tasa o velocidad de mineralización según lo expresado en la ecuación (1). Por otro lado, se tomaron muestras de suelo en los diferentes sistemas a tiempo 0, 21, 41, 63, 80 y 100 días, con el fin de determinar contenido de hidrocarburos presentes por cromatografía gaseosa, conteo de BAT y BDH según las metodologías explicadas anteriormente. Todos los resultados expresados representan los promedios obtenidos en cada sistema con su respectiva desviación estándar, corregidos por los datos obtenidos en el microcosmo Blanco.

Análisis de datos

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una prueba Tukey con un nivel de significancia del 95% para determinar diferencias significativas entre los parámetros cuantificados en los diferentes tratamientos. Estos análisis se realizaron utilizando el programa PAST 4.02 (Hammer et al. 2001).

Resultados

El suelo presentó características físicas y químicas (Tabla 1) compatibles con un proceso de biorremediación asistida, evidenciándose principalmente en pH, conductividad y cantidad de nutrientes determinados. Los valores de capacidad de retención de agua, y porosidad cercana al 50% concuerdan con un favorable crecimiento microbiano. Las concentraciones de nutrientes (nitrato, nitrito, amonio y fosfato) resultaron bajas lo que es habitual para suelos patagónicos (Acuña et al. 2012). El valor de pH evidenciado fue cercano a la neutralidad, acorde con la actividad bacteriana. No se observó presencia de hidrocarburos, y el contenido de las sales estudiadas fue bajo. La materia orgánica, resultó menor al 1% con un conteo de BDH en el orden de 10³ UFC.g⁻¹. La determinación de metales pesados realizada demostró valores por debajo de lo expresado en la ley 24051 y su decreto reglamentario 831/93 de la República Argentina que regula este tipo de contaminantes en los suelos de la región.

Los valores de mineralización de hidrocarburos observados para las diferentes relaciones C:N:P (Fig. 1A) mostraron que el valor óptimo para este suelo fue el de la relación 100:2.5:0.25 para ambas fuentes de nitrógeno utilizadas, con tasas de mineralización de 52.2 ± 3.4 y 92.7 ± 10.5 mgCO₂.kg_{suelo}⁻¹.día⁻¹ para (NH₄)₂SO₄ y KNO₃ respectivamente, siendo el valor observado para (NH₄)₂SO₄ significativamente ($p < 0.05$) menor al observado para KNO₃. Los sistemas con relación C:N:P 100:7.5:0.75 y 100:5:0.5 exhibieron los valores significativamente ($p < 0.05$) más bajos de producción de CO₂, con tasas de mineralización inferiores a 30 y 25 mgCO₂.kg_{suelo}⁻¹.día⁻¹ para las fuentes de nitrógeno (NH₄)₂SO₄ y

KNO₃ respectivamente. Con respecto a la humedad que debe poseer el suelo para una correcta biorremediación, se pudo observar que el rango de agua a incorporar esta comprendido entre 5 y 15% (Fig. 1B), siendo los valores de 10 y 15% los que obtuvieron una significativamente ($p < 0.05$) mayor producción de CO₂, con tasas de mineralización de hidrocarburos que superaron los 250 mgCO₂ kg_{suelo}⁻¹día⁻¹. Finalmente, se observó que el rango óptimo de concentración de hidrocarburos para realizar el proceso de biorremediación en el suelo estudiado fue entre 2 y 5% (Fig. 1C), evidenciando que con una concentración del 3% se logró la mayor producción de CO₂ con una tasa de mineralización de 269.9 ± 13.2 mgCO₂ kg_{suelo}⁻¹día⁻¹, significativamente mayor ($p < 0.05$) a la observada en el resto de los microcosmos estudiados. Los valores porcentuales más bajos de concentración del contaminante produjeron significativamente ($p < 0.05$) menos CO₂ y a una velocidad más lenta respecto del sistema con 3%, encontrándose tasas de mineralización de 97.1 ± 12.4 y 111.2 ± 6.3 mgCO₂ kg_{suelo}⁻¹día⁻¹ para la concentración de 0.5 y 1% respectivamente.

De los tres sistemas contaminados con destilados individuales del petróleo, el contaminado con gasoil obtuvo los valores significativamente ($p < 0.05$) más elevados con una tasa de mineralización de 193.7 ± 9.4 mgCO₂ kg_{suelo}⁻¹día⁻¹ y un porcentaje de biodegradación de 83.7 ± 5.9 % (Fig. 2A), observándose que las fracciones más livianas de carbonos (< n-C₁₂) fueron las primeras en eliminarse casi totalmente durante los primeros 21 de la experiencia mostrando una disminución en su concentración desde 4433.5 ± 215.8 mg.kg⁻¹ a 1773.4 ± 95.4 mg.kg⁻¹ (Fig. 2D), representando aproximadamente un 60% de biodegradación. Por otro lado, las fracciones de carbono mayores a n-C₁₂ fueron eliminadas en gran medida en aproximadamente 60 días, disminuyendo desde 23976.7 ± 628.4 mg.kg⁻¹ a 5678.2 ± 621.1 mg.kg⁻¹ (Fig. 2D) representando esta disminución aproximadamente un 64% de biodegradación. En segundo lugar, le siguió el sistema compuesto por aceite con una tasa de mineralización de 105.9 ± 14.9 mgCO₂ kg_{suelo}⁻¹día⁻¹ y un porcentaje de biodegradación de 63.5 ± 3.5 % (Fig. 2C), observándose que las fracciones de n-C₂₅ a n-C₃₀ sufrieron un proceso de eliminación lento (Fig. 2F). Finalmente, el sistema con nafta como fuente de carbono no evidenció producción de CO₂ pero mostró un porcentaje de eliminación de hidrocarburos del 100% (Fig. 2B) de todas las fracciones de hidrocarburos que la componen en los primeros días de experiencia (Fig. 2E). Respecto de los

porcentajes de biodegradación y tasas de mineralización de hidrocarburos, los tres sistemas presentaron resultados significativamente ($p < 0.05$) diferentes entre sí.

Con respecto a los microcosmos integrados por las mezclas de destilados de petróleo, el sistema GO/Ace obtuvo una tasa de mineralización de 144.9 ± 23.1 mgCO₂ kg_{suelo}⁻¹día⁻¹ con un porcentaje de biodegradación de 75.1 ± 6.6 % (Fig. 3A), encontrándose que las fracciones de hidrocarburos menores a n-C₂₂ fueron biodegradadas más eficientemente que las mayores a este número de carbonos (Fig. 3C). Por otro lado, el sistema GO/Naf/Ace mostró una tasa de mineralización de 74.5 ± 2.6 mgCO₂ kg_{suelo}⁻¹día⁻¹ y un porcentaje de biodegradación de 75.6 ± 7.3 % (Fig. 3B). Las fracciones más livianas de carbono (< n-C₁₂) presentaron un comportamiento similar a los sistemas GO/Ace, ya que desaparecieron totalmente a los 41 días del ensayo (Fig. 3D), observándose que al finalizar la experiencia las fracciones intermedias de carbono pudieron degradarse casi por completo, mientras que las fracciones más pesadas no presentaron un aumento considerable de los porcentajes de degradación más allá de un 50%. Entre estos sistemas, se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las tasas de mineralización calculadas, encontrándose que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en los porcentajes de biodegradación de hidrocarburos obtenidos.

Los sistemas contaminados con gasoil fueron los que mostraron los mejores resultados respecto de los recuentos de bacterias, con valores máximos entre los días 21 y 40 del orden de 10¹¹ y 10¹⁰ UFC g⁻¹_{suelo} para BAT y BDH respectivamente (Fig. 4). Seguidamente, las mezclas de destilados de petróleo en los sistemas GO/Ace y GO/Naf/Ace, presentaron un buen número de crecimiento bacteriano durante el desarrollo de la experiencia del orden de 10⁸ UFC g⁻¹_{suelo} para ambos grupos bacterianos, no siendo el mismo caso para los sistemas contaminados con aceite que evidenciaron los valores en el orden de 10⁷ UFC g⁻¹_{suelo} para BAT y BDH en el día 21. Por último, cabe resaltar que los microcosmos con nafta registraron el número significativamente ($p < 0.05$) más bajo de BAT con respecto a los demás sistemas. Según lo observado en la Figura 4A, en los comienzos de la experiencia la nafta produjo una inhibición en la comunidad bacteriana, el cual logró recuperarse muy lentamente luego del día 41, observándose una situación similar para BDH (Fig. 4B).

Tabla 1. Características físicas, químicas y microbiológicas del suelo estudiado.

Table 1. Physical, chemical and microbiological characteristics of the studied soil.

Parámetro	Concentración	Parámetro	Concentración
pH	7.6	Arsénico (mg.kg ⁻¹)	1.33
Conductividad (μS.cm ⁻¹)	84	Bario (mg.kg ⁻¹)	382
Humedad (%)	1.1	Cadmio (mg.kg ⁻¹)	< 1.0
Materia orgánica (%)	0.98	Cinc (mg.kg ⁻¹)	60
Materia inorgánica (%)	99.02	Cobre (mg.kg ⁻¹)	9
Densidad aparente (g.mL ⁻¹)	1.31	Cromo (mg.kg ⁻¹)	< 10.0
Densidad real (g.mL ⁻¹)	2.46	Mercurio (mg.kg ⁻¹)	< 0.2
Porosidad (%)	46	Níquel (mg.kg ⁻¹)	10
Cap. Retención de agua (%)	34	Plata (mg.kg ⁻¹)	< 2.0
Cloruro (mg.kg ⁻¹)	37	Plomo (mg.kg ⁻¹)	< 10.0
Sulfato (mg.kg ⁻¹)	48	Selenio (mg.kg ⁻¹)	< 0.8
Carbonato (mg.kg ⁻¹)	< 1		
Bicarbonato (mg.kg ⁻¹)	45		
Calcio (mg.kg ⁻¹)	40	HTP (mg.kg ⁻¹)	< 1
Magnesio (mg.kg ⁻¹)	12		
Nitrito (mg.kg ⁻¹)	0.52	BAT (UFC.g ⁻¹)	5.3E+05
Nitrato (mg.kg ⁻¹)	18	BDH (UFC.g ⁻¹)	8.9E+03
Amonio (mg.kg ⁻¹)	0.05		
Fosfato (mg.kg ⁻¹)	< 1		

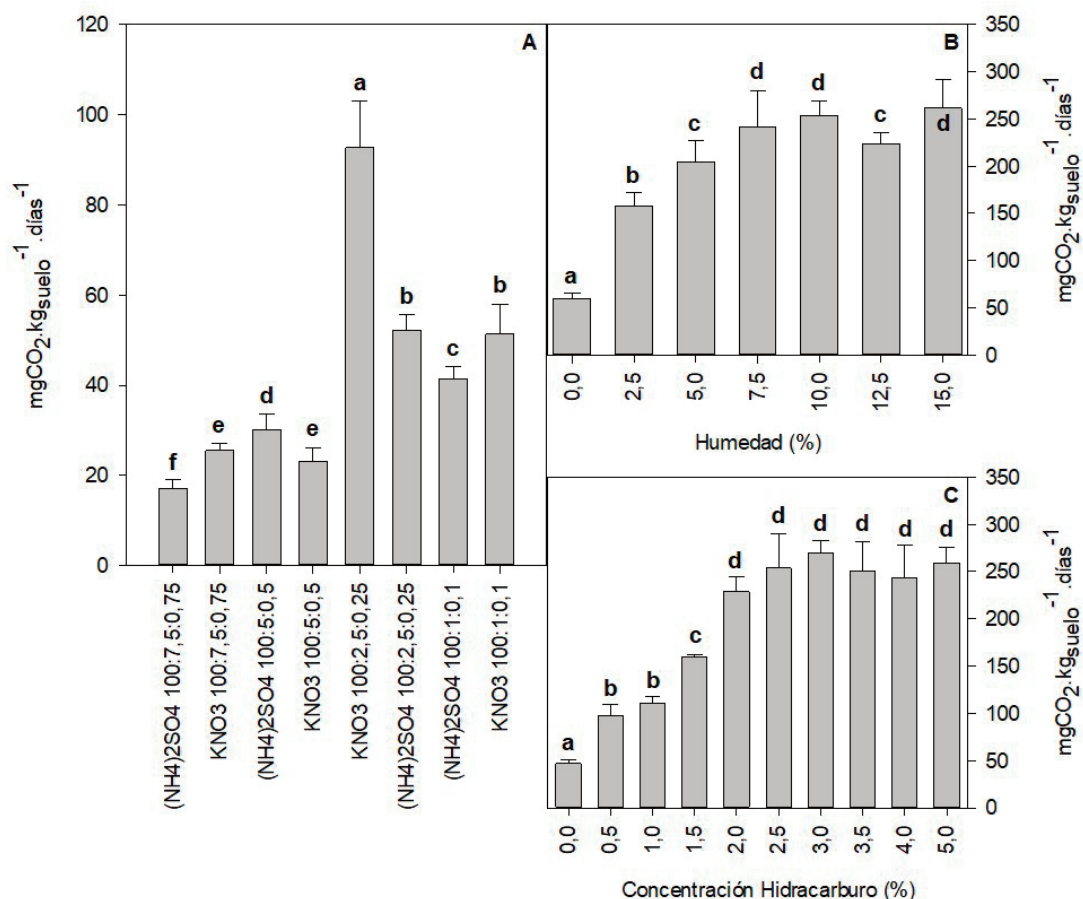


Figura 1. Tasas de la mineralización de hidrocarburos de las experiencias de optimización del proceso de biorremediación expresadas en mgCO₂.kg_{suelo}⁻¹.día⁻¹. **A)** relaciones C:N:P estudiadas, **B)** optimización del rango de humedad a incorporar, **C)** concentraciones de hidrocarburos incorporadas. Las letras en minúsculas sirven de guía para la interpretación de los análisis estadísticos realizados. Los grupos de datos que presentan letras diferentes poseen diferencia significativa entre sus medias calculadas ($p < 0.05$), mientras que los grupos de datos que presentan la misma letra no presentan diferencia significativa entre sus medias calculadas ($p > 0.05$).

Figure 1. Hydrocarbon mineralization rates from the bioremediation process optimization experiences expressed in mgCO₂.kg_{suelo}⁻¹.day⁻¹. **A)** C:N:P relationships studied, **B)** optimization of the humidity range to be incorporated, **C)** concentrations of incorporated hydrocarbons. Lowercase letters serve as a guide for interpreting the statistical analyzes performed. The data groups that present different letters have a significant difference between their calculated means ($p < 0.05$), while the data groups that present the same letter do not present a significant difference between their calculated means ($p > 0.05$).

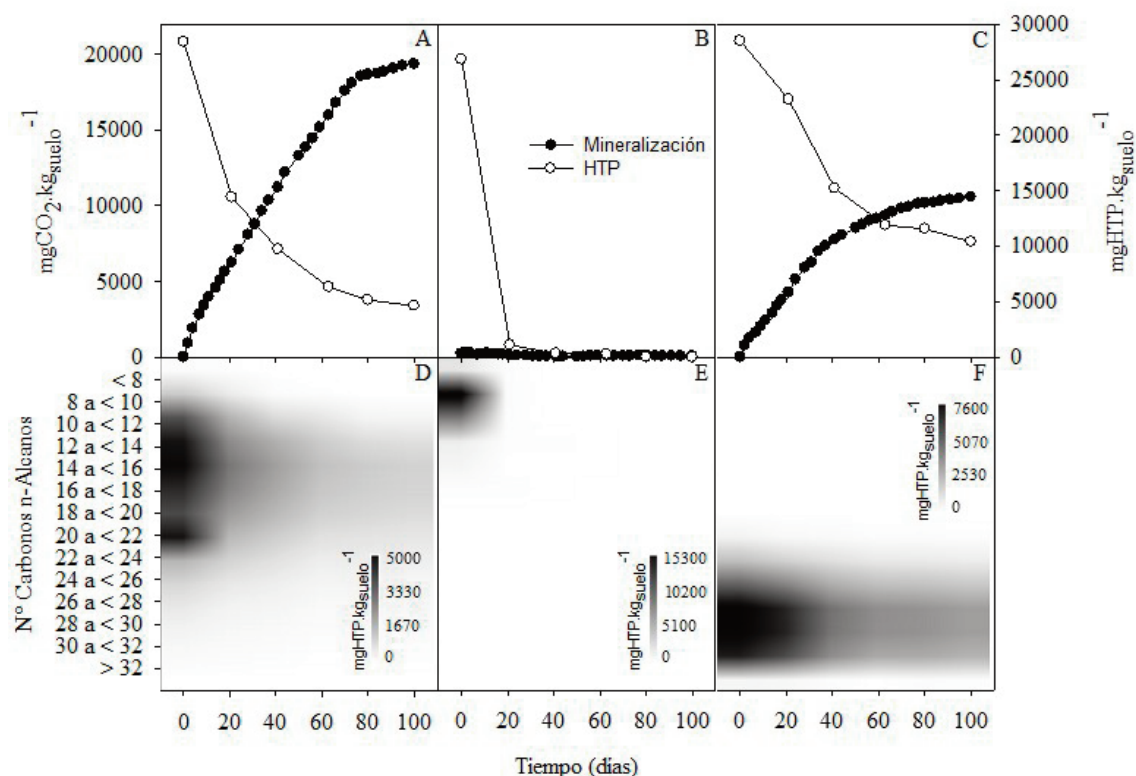


Figura 2. Ensayos de biorremediación de hidrocarburos de los microcosmos contaminados con destilados del petróleo puros. En las figuras **A, B, C** se muestra la evolución de la mineralización y de la concentración de hidrocarburos en los sistemas Gasoil, Nafta y Aceite, respectivamente. En las figuras **D** (Gasoil), **E** (Nafta) y **F** (Aceite) se presenta la evolución de los perfiles de hidrocarburos cuantificados por cromatografía gaseosa en función del tiempo.

Figure 2. Hydrocarbon bioremediation tests of microcosms contaminated with pure petroleum distillates. Figures **A, B, C** show the evolution of mineralization and hydrocarbon concentration in the Gasoil, gasoline and lubricant oil systems, respectively. Figures **D** (Gasoil), **E** (gasoline) and **F** (lubricant oil) show the evolution of the hydrocarbon profiles quantified by gas chromatography as a function of time.

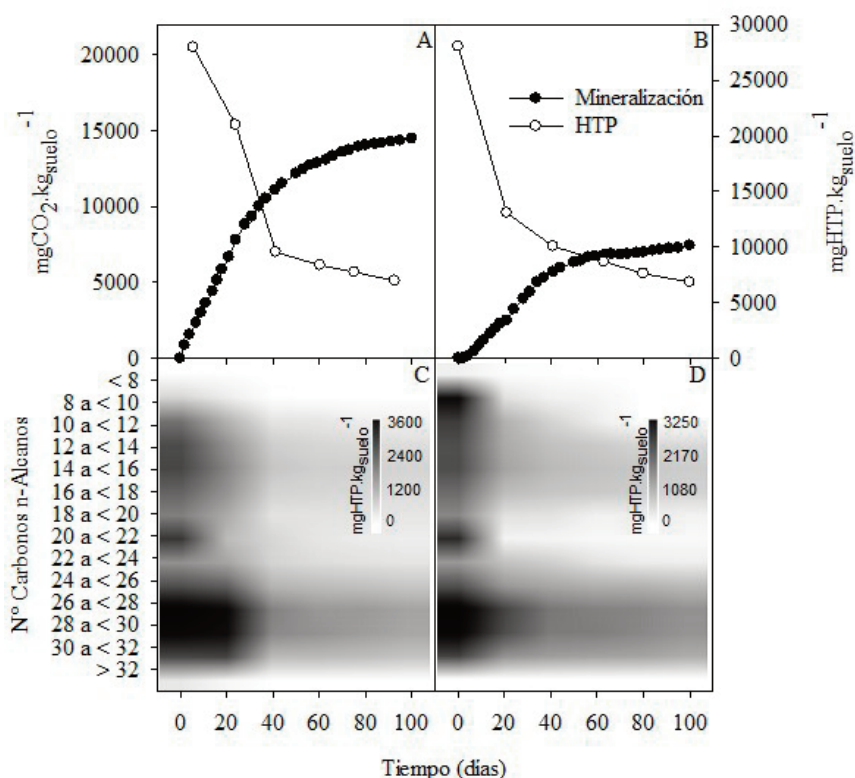


Figura 3. Ensayos de biorremediación de hidrocarburos de los microcosmos contaminados con mezclas de destilados del petróleo. En las figuras **A y B** se muestra la evolución de la mineralización y de la concentración de hidrocarburos totales en los sistemas GO/Ace y GO/Naf/Ace, respectivamente. En las figuras **C** (GO/Ace) y **D** (GO/Naf/Ace) se presenta la evolución de los perfiles de hidrocarburos cuantificados por cromatografía gaseosa en función del tiempo. GO: gasoil, Ace: aceite lubricante, Naf: nafta.

Figure 3. Hydrocarbon bioremediation tests of microcosms contaminated with petroleum distillate mixtures. Figures **A and B** show the evolution of mineralization and total hydrocarbon concentration in the GO/Ace and GO/Naf/Ace systems, respectively. Figures **C** (GO/Ace) and **D** (GO/Naf/Ace) show the evolution of the hydrocarbon profiles quantified by gas chromatography as a function of time. GO: diesel, Ace: lubricant oil, Naf: gasoline.

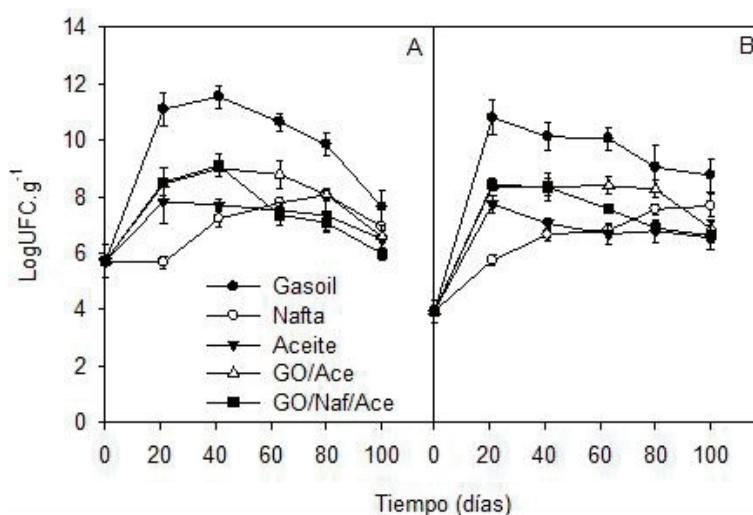


Figura 4. Evolución de los conteos de bacterias heterótrofas **A)** y de bacterias degradadoras de hidrocarburos **B)** en los diferentes microcosmos en función del tiempo. GO: gasoil, Ace: aceite lubricante, Naf: nafta.

Figure 4. Evolution of the counts of heterotrophic bacteria **A)** and hydrocarbon degrading bacteria **B)** in the different microcosms as a function of time. GO: diesel, Ace: lubricant oil, Naf: gasoline.

Discusión

Una importante limitación de la degradación microbiana de muchos contaminantes en suelos es la disponibilidad de nutrientes a base de nitrógeno y fósforo. La adición de este tipo de sales estimula a las poblaciones microbianas indígenas de los suelos contaminados (Taccari et al. 2012). La utilización de la comunidad bacteriana autóctona para la degradación de hidrocarburos mediante bioestimulación, agregado de nutrientes y humedad, es una de las tecnologías más frecuentemente utilizada para la eliminación de hidrocarburos (Pucci et al. 2011; Al-Hawash et al. 2018). Esto es porque utiliza el potencial de la comunidad principalmente bacteriana, que ya posee una adaptación al medio ambiente, que en las zonas del sur de Argentina suelen ser condiciones extremas (Lewin et al. 2013; Pucci et al. 2013). La entrada de grandes cantidades de fuentes de carbono tales como son los hidrocarburos (petróleo crudo, destilados del petróleo, etc.) al ambiente natural, tienden a producir un rápido agotamiento de las reservas disponibles de los principales nutrientes inorgánicos, como el nitrógeno y el fósforo (Reddi e Inyang 2000). Sin embargo, las concentraciones excesivas de este tipo de nutrientes pueden inhibir la actividad de biodegradación, y varios son los autores (Adams et al. 2015; Chichere et al. 2017) que han informado sobre el efecto negativo de los altos niveles de nitrógeno y fósforo en la biodegradación de hidrocarburos en suelos que originalmente son carentes de nutrientes. Los resultados de este estudio confirmaron los efectos positivos, en términos de mejora química, factores nutricionales y mineralización, de la adición de nutrientes para la biorremediación de hidrocarburos del suelo en cantidades relativamente bajas (100:2.5:0.25), el cual se caracterizó de ser pobre en nutrientes bio-disponibles, concordando con los resultados encontrados por otros autores en otros estudios similares (Tejada et al. 2008; Taccari et al. 2012).

La humedad del suelo juega un papel muy importante en el proceso de biodegradación de los suelos contaminados con hidrocarburos. El nivel del contenido de humedad del suelo afecta directamente sus propiedades físicas y químicas, así como la actividad metabólica de los microorganismos oxidantes de hidrocarburos involucrados en el proceso de biorremediación (Skoop et al. 1990). Por lo tanto, la cantidad y disponibilidad de agua determina la tasa de ocurrencia/aceleración del proceso de biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos (Bahmani et al. 2018). En el presente trabajo se observó que los mejores resultados de biorremediación de hidrocarburos se obtuvieron con valores de humedad entre 10 y 15%, encontrándose que a medida que el conte-

nido de agua en el suelo fue más escaso, también disminuyó la capacidad de mineralización de los hidrocarburos contaminantes. Estos datos son acordes a lo observado por Silva-Castro et al. (2016), cuando trabajaron con un suelo contaminado con gasoil y experimentaron diferentes cantidades de agregado de humedad. Colocaron 15, 25 y 30% de humedad en el suelo ensayado, observando que la eficacia de la biorremediación dependía directamente de la cantidad de humedad incorporada, encontrando que con un 15% de humedad se obtuvo un 68% de biodegradación, mientras que con 25 y 35% de humedad valores alrededor de 40% de biodegradación. El cambio en el contenido de agua influye en la disponibilidad de ésta para los microorganismos, así como en la concentración de nutrientes, oxígeno disuelto y contaminantes (Vandecasteele 2008).

Respecto de la concentración óptima de hidrocarburos en el que el proceso de biorremediación puede ser más eficiente, se encontró que esta fue entre 3 y 5 % para el suelo estudiado. La actividad microbiana generalmente aumenta en proporción a una fuente de carbono y energía accesible. Sin embargo, se ha demostrado que cuando la fuente de carbono y energía son hidrocarburos, altas concentraciones de estos inhiben su biodegradación (Ahmad et al. 2020). Por ello, la Environmental Protection Agency (USEPA 2004) sugiere como límite superior el de 5% de estos compuestos en suelos, ya que a mayores concentraciones pueden ser perjudiciales para los microorganismos presentes.

La biodegradación en los sistemas con gasoil se caracterizó por tener los valores más elevados en relación a las tasas de mineralización y degradación de hidrocarburos, a diferencia de los demás sistemas contaminados con destilados puros del petróleo. La eficacia en la eliminación, pudo deberse a que el gasoil es una fuente de carbono menos tóxica para las comunidades microbianas, ya que presenta una composición mayoritaria en n-alcenos en el rango de n-C₁₂ a n-C₂₅, los cuales exhiben una elevada biodegradabilidad (Ahmed y Fakhruddin 2018; Nozari et al. 2018). Durante la biodegradación del gasoil, se ha evidenciado a partir de los análisis por cromatografía gaseosa, que las fracciones más livianas (< n-C₁₂), fueron eliminadas casi totalmente durante los primeros 20 días, mientras que las fracciones de carbono de mayor tamaño, demoraron mayor tiempo en desaparecer. Lin et al. (2010) observaron que durante los eventos de biodegradación del gasoil, las fracciones de bajo peso molecular son las más fácilmente degradables, mientras que las más pesadas y difícil de degradar, requieren de más tiempo. En el presente trabajo, también se registró los valores de BAT y BDH más elevados en relación a los demás destilados en los primeros 20 días de la experiencia. Asimismo, estos resulta-

dos concuerdan con un aumento en la mineralización y degradación de hidrocarburos que componen el gasoil. Según lo observado por Bento et al. (2005), cuando hay un aumento en la velocidad de crecimiento en las comunidades microbianas, ello sugiere una rápida degradación de los contaminantes. Por otro lado, Lin et al. (2010) comprobaron a través de experiencias con biopilas contaminadas con gasoil, un aumento significativo en las poblaciones bacterianas durante las etapas iniciales del tratamiento. En general las tasas de respiración están influenciadas por las actividades metabólicas de los organismos, y se refleja directamente en la densidad poblacional microbiana e indirectamente en la biodegradación de los hidrocarburos. La eliminación de los hidrocarburos, implica su oxidación por acción de las oxigenasas (Al-Hawash et al. 2018), por lo tanto, la degradación de este tipo de contaminantes se encuentra directamente relacionada con la respiración de las poblaciones microbianas en el suelo.

Los microcosmos contaminados solo con aceite como fuente de carbono, se caracterizaron por presentar una lenta e incompleta degradación durante los ensayos de biodegradación. Los valores de las tasas de mineralización registradas fueron bajos en comparación a los sistemas contaminados con gasoil, evidenciando un pico máximo en los días iniciales de $400 \text{ mgCO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$, y disminuyendo posteriormente, hasta mantenerse en un rango aproximado de valores entre 150 y $300 \text{ mgCO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo día}^{-1}$, por un periodo de 40 días. La eficacia en la correcta eliminación de los hidrocarburos depende, entre otros parámetros, en su composición química (Pucci et al. 2013). Los aceites lubricantes están constituidos por largas cadenas ($n\text{-C}_{25}$ a $n\text{-C}_{35}$) de hidrocarburos saturados, y un 75% de ciclo-alcanos (Koma et al. 2003; Raju et al. 2017). Esta última fracción se la conoce como recalcitrante para degradación microbiana. Por lo general, la fracción alifática compuesta por n -alcanos, es fácilmente metabolizada por los microorganismos (Ríos y Nudelman 2008; Minai-Tehrani et al. 2015). Sin embargo, cuando se incluyen como sustituyentes alcanos de cadena larga, se forman estructuras ramificadas estéricamente más pesadas, la cuales son metabolizadas de manera más lenta, dado a que son casi inaccesibles para la degradación (Ercoli et al. 2000). La mayoría de los compuestos hidrocarbonados del aceite no pudieron eliminarse de manera completa, en especial aquellas fracciones de carbonos más pesadas, dado a que solo han logrado reducirse aproximadamente a la mitad a los 41 días de la experiencia. Pucci et al. (2013) observaron que los aceites lubricantes presentan dificultades en la biodegradación debido a su composición química. Sin embargo, comprobaron que la cepa *Rhodococcus erythropolis ohp-al-gp*, tiene una elevada capacidad para eliminar estos aceites lubricantes en suelos contaminados.

En cuanto a los recuentos bacterianos de BAT y BDH, los sistemas contaminados con aceite, evidenciaron valores máximos en el día 20 de la experiencia, obteniéndose 6.70×10^{07} y 5.50×10^{07} UFC.g⁻¹, respectivamente. Sin embargo, dichos valores fueron más bajos a diferencia de lo observado para el gasoil como contaminante. La dificultad en la degradación en los aceites lubricantes por parte de los microorganismos, también fue evidenciada por Bhattacharya et al. (2015) a partir de experiencias con la cepa de *Ochrobactrum sp. C1*. En dicha experiencia comprobaron que los alcanos lineales comprendidos entre $n\text{-C}_{12}$ a $n\text{-C}_{28}$ fueron metabolizados de manera efectiva. Sin embargo, a medida que la longitud de la cadena de los alcanos aumentaba, dicha eficiencia se veía disminuida, situación también reportada por otros investigadores (Wang et al. 2011; Zhang et al. 2011).

Por lo general, el crecimiento bacteriano es más lento en sustratos más insolubles debido a una menor biodisponibilidad, y es una de las principales limitaciones en los experimentos de biorremediación (Bhattacharya et al. 2015). Para una correcta eliminación los contaminantes deben encontrarse biodisponibles según el grado de solubilidad que presentan en el agua. En general, los alcanos tienen una solubilidad acuosa baja, pero a medida que el número de carbonos aumenta, se hace aún menor. Por ejemplo, la solubilidad del $n\text{-C}_{10}$ (0.052 mg.L^{-1}) es 8.7 veces mayor que la de

$n\text{-C}_{18}$ (0.006 mg.L^{-1}) (Maier y Gentry 2015), por lo cual la biodegradación de $n\text{-C}_{10}$ es mayor que en $n\text{-C}_{18}$. A partir de ensayos realizados con *Bacillus methylotrophicus* y *Pseudomonas sihuiensis*, Pereira et al. (2019) demostraron que el mayor porcentaje de eliminación se produjo sobre los alcanos de tamaño mediano ($n\text{-C}_8$ a $n\text{-C}_{18}$) en comparación a los de mayor tamaño ($n\text{-C}_{20}$ a $n\text{-C}_{33}$). Estas diferencias de solubilidades de los hidrocarburos, pueden ser responsables en la dinámica de biodegradación observada en los sistemas GO/Ace que presentaron valores máximos de producción de CO_2 de aproximadamente $14\,000 \text{ mgCO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ suelo}$ y un porcentaje de eliminación de hidrocarburos de $75.1 \pm 6.6 \%$. Se evidenció que las fracciones más livianas de carbono ($< n\text{-C}_{10}$) fueron eliminadas casi totalmente a los 41 días de la experiencia. Mientras que algunas de las fracciones de carbono medianas y de mayor peso molecular, se redujeron aproximadamente entre el 50 y 80 % a los 41 días. Nocentini et al. (2000) comprobaron que las tasas de eliminación del aceite lubricante, fueron más lentas a diferencia del kerosene y gasoil. Borah y Yadav (2014) también evidenciaron a través de la cepa de *Bacillus cereus* DRDU1, que el gasoil y el kerosene fueron degradados en mayor medida (77 y 88%) a diferencia del aceite (61%). La causa, podría deberse a que este último, es un hidrocarburo poco biodisponible como fuente de carbono, por lo cual la actividad bacteriana se ve afectada por su presencia (Nocentini et al. 2000).

Finalmente, en los sistemas contaminados solo con nafta se observó una eliminación total de los hidrocarburos incorporados en los primeros 20 días del ensayo, sin obtener registros de una mineralización aparente. Esta eliminación de los hidrocarburos de este destilado del petróleo, podría ser producto de una degradación no biológica, dado a que la nafta exhibe una rica composición en compuestos monoaromáticos (Leal et al. 2017). Diversos autores afirman que gran parte de los hidrocarburos monoaromáticos o BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) son volatilizados durante los procesos de aireación del suelo (Nwankwegu y Onwosi, 2017; Raju et al. 2017). Por otro lado, se observó que en los perfiles cromatográficos de los análisis de hidrocarburos, los componentes del sistema nafta desaparecieron completamente en los inicios de la experiencia. Con respecto a los recuentos bacterianos, en estos microcosmos se observaron los conteos más bajos en relación a los demás sistemas. Los autores Nwankwegu y Onwosi (2017) evidenciaron una gran disminución del número de microorganismos en sistemas estudiados durante experiencias de biodegradación contaminados con nafta. La actividad inhibitoria del contaminante, se debe a que su composición química rica en compuestos aromáticos ejerce un efecto tóxico sobre los microorganismos (Modrzyński et al. 2016). Cabe destacar, que algunos componentes de los hidrocarburos pueden resultar tóxicos para algunas poblaciones bacterianas y por lo tanto provoca reducción en la biodiversidad presente. Los hidrocarburos monoaromáticos o BTEX contribuyen a la toxicidad del combustible dado a que presentan propiedades lipofílicas. Estas sustancias suelen acumularse en la membrana bacteriana, alterando su integridad y por ende su función (Leal et al. 2017) produciendo de esta forma su efecto tóxico sobre los microorganismos.

El efecto tóxico mencionado anteriormente para la nafta sobre los microorganismos del suelo pudo ser evidenciado en los sistemas GO/Naft/Ace. En estos microcosmos contaminados con la mezcla de gasoil, aceite y nafta, en los primeros 20 días de experiencia se evidenció una fase de latencia en la mineralización determinada con altos porcentajes de degradación de hidrocarburos, más específicamente con eliminación de los hidrocarburos $< n\text{-C}_{12}$. Esto podría deberse a la presencia de la nafta, ya que por su alta volatilidad pudo ser eliminada del suelo en los momentos de aireación del mismo, de forma similar a lo observado en los microcosmos donde solo se utilizó nafta como contaminante. Wolińska et al. (2016) comprobaron que la incorporación de nafta al suelo, resulta nociva para las comunidades microbianas que lo habitan, inhibiendo su actividad metabólica. Situación que puede ser responsable de la fase de latencia observada en estos sistemas.

Sin embargo, una vez finalizada la fase de latencia mencionada, se pudo observar en los sistemas GO/Naf/Ace una recuperación de los parámetros utilizados para monitorear el proceso de biodegradación. Las fracciones hidrocarbonadas presentan distintos grados de susceptibilidad ante el ataque de los microorganismos. Por ello se los ha clasificado de manera decreciente de acuerdo su grado de susceptibilidad según: n-alcanos > alcanos ramificados > aromáticos de bajo peso molecular > ciclo-alcanos > aromáticos de alto peso molecular (Fathepure 2014). Estas diferencias en las posibilidades de biodegradación, hacen que a medida que transcurre el tiempo, diferentes fracciones de hidrocarburos se vayan biodegradando cuando el contaminante es una mezcla compleja como la utilizada en estos microcosmos. Demostrándose que más allá de la toxicidad sobre los microorganismos de la nafta antes mencionada, una vez que este destilado del petróleo es eliminado del suelo por algún mecanismo fisicoquímico, la comunidad bacteriana del mismo posee la capacidad de recuperarse y llevar adelante la metabolización del resto de los contaminantes presentes. Esto pudo evidenciarse ya que en los sistemas GO/Naf/Ace, luego de que se observó la eliminación de los hidrocarburos < n-C₁₂, la evolución de la biodegradación fue similar a lo observado en los sistemas contaminados con la mezcla de gasoil y aceite.

Conclusiones

Los principales resultados presentados, demuestran que el suelo de la ciudad de Río Gallegos estudiado, poseen características físicas, químicas y microbiológicas que lo hacen apto para desarrollar procesos de biorremediación. Se demostró que la relación C:N:P más eficiente para tareas de fertilización fue la de 100:2.5:0.25, con un rango óptimo de incorporación de humedad entre 10-15% para suelos contaminados con 3% de hidrocarburos, estando esto de acuerdo con observaciones previas realizadas en otras regiones con características similares a las de la Patagonia Sur. Esto implica que en estos suelos, con la aplicación de una adecuada estrategia de bioestimulación, es posible llevar adelante procesos de biorremediación en derrames de hidrocarburos que puedan ocasionarse en la zona, estimándose que los hidrocarburos del rango de la nafta podrán volatilizarse de forma espontánea generando una momentánea inhibición de la actividad bacteriana. Por otro lado, los resultados también mostraron que una vez que los hidrocarburos del rango de la nafta son eliminados del suelo, la actividad bacteriana puede recuperarse y desarrollar la biodegradación de los hidrocarburos del rango del gasoil, y en menor medida los del aceite lubricante, brindando esto un panorama auspicioso para la aplicación de esta tecnología a gran escala en la región.

Contribución de los autores

Cambarieri: Investigación, Metodología. Pucci: Supervisión, Redacción - revisión y edición. Acuña: Administración del proyecto, Visualización, Análisis formal, Redacción - revisión y edición

Referencias

- Acuña, A.J., Perez Krenke, J.F., Pucci, O.H., Pucci, G.N. 2007. Biodegradación de hidrocarburos. Influencia de la fertilización en el proceso de biorremediación. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental* 84:82-86.
- Acuña, A.J., Pucci, O.H., Pucci, G.N. 2008. Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de la Patagonia Argentina. *Ecosistemas* 17(2):85-93.
- Acuña, A.J., Tonín, N.L., Diaz, V., Pucci, G.N., Pucci, O.H. 2012. Optimización de un sistema de biorremediación de hidrocarburos a escala de laboratorio. *Ingeniería Investigación y Tecnología* 13(1):105-112.
- Acuña, A.J., Pucci, O.H., Pucci, G.N. 2018. Electrobiorremediación de hidrocarburos en suelos insaturados de la Patagonia Argentina. En: Brutti, L., Beltran, M., Garcia de Salamone, I (eds.), *Biorremediación de los recursos naturales*, pp. 119-137. INTA Ediciones, Buenos Aires, Argentina.
- Acuña, A.J., Cambarieri, L., Pucci, G.N. 2020. Biodegradación de dos residuos de estaciones de servicio en Río Gallegos - Argentina. *Acta Biológica Colombiana* 25(3):299-309.
- Adams, G.O., Tawari-Fufeyin, P., Okoro, S.E., Ehinomen, I. 2015. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation* 3:28-39.
- Ahmad, A.A., Muhammad, I., Shah, T., Kalwar, Q., Zhang, J., Liang, Z., et al. 2020. Remediation methods of crude oil contaminated soil. *World Journal of Agriculture and Soil Science* 4(3):WJASS.MS.ID.000595.
- Ahmed, F., Fakhruddin, A.N.M. 2018. A review on environmental contamination of petroleum hydrocarbons and its biodegradation. *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources* 11(3):555811.
- Al-Hawash, A.B., Dragh, M.A., Li, S., Alhujaily, A., Abbood, H.A., Zhang, X., Ma, F. 2018. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *The Egyptian Journal of Aquatic Research* 44(2):71-76.
- Alvarez, H.M. 2015. Biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos: un proceso complejo que involucra múltiples variables. *Revista Química Viva* 14(1):18-25.
- Álvaro, C.E.S., Arocena, L.A., Martínez, M.A., Nudelman, N.E.S. 2017. Biodegradación aerobia de fracciones de hidrocarburos provenientes de la actividad petrolera en un suelo de la región Patagonia Norte, Argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 33(2):247-257.
- Azubuiké, C.C., Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C. 2016. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32:180.
- Bahmani, F., Ataei, S.A., Mikaili, M.A. 2018. The effect of moisture content variation on the bioremediation of hydrocarbon contaminated soils: modeling and experimental investigation. *Journal of Environmental Analytical Chemistry* 5:236.
- Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology* 96(9):1049-1055.
- Bhattacharya, M., Biswas, D., Sana, S., Datta, S. 2015. Biodegradation of waste lubricants by a newly isolated *Ochrobactrum* sp. C1. *3 Biotech* 5:807-817.
- Borah, D., Yadav, R.N.S. 2014. Biodegradation of diesel, crude oil, kerosene and used engine oil by a newly isolated *Bacillus cereus* strain DRDU1 from an automobile engine in liquid culture. *Arabian Journal for Science and Engineering* 39:5337-5345.
- Cambarieri, L., Pucci, G.N., Acuña, A.J. 2020. Evolución de la comunidad microbiana nativa durante el proceso de biodegradación de un residuo procedente de estaciones de servicios. *AACINI-Revista Internacional de Ingeniería Industrial* 1:5-16.
- Carrizo, A., Giménez, L., Pucci, O.H., Pucci, G.N. 2015. Importancia de la aireación y nutrientes en biopilas de suelos empetrolados en la Patagonia. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental* 123:50-53.
- Chikere, C.B., Azubuiké, C.C., Etefia, E.E. 2017. Biodegradation potential of indigenous bacteria isolated from a crude oil polluted soil. *Journal of Environment and Biotechnology Research* 6(2):213-219.
- Dong, Y., Lang, Z., Kong, X., Lu, D., Liu, Z. 2015. Kinetic and multidimensional profiling of accelerated degradation of oil sludge by biostimulation. *Environmental Science: Processes and Impacts*. 17:763.
- Ercoli, E., Galvez, J., Di Paola, M., Cantero, J., Videla, S., Medaura, M., Bauzá, J., 2000. Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo. *III Workshop Latinoamericano sobre aplicaciones de la Ciencia en la Ingeniería de Petróleo, 8 y el 12 de mayo de 2000, Puerto Iguazú, Argentina*. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/53385046/ANALISIS-Y-EVALUACION-DE-PARAMETROS-CRITICOS-EN-BIODEGRADACION-DE-HIDROCARBUROS-EN-SUELO>
- Fathepure, B.Z. 2014. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Frontiers in microbiology* 5:173.
- García Trejo, A. 1981. *Experimentos en Microbiología del Suelo*. Continental. México D.F., México.
- Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1):1-9.
- Imam, A., Suman, S.K., Ghosh, D., Kanaujia, P.K. 2019. Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. *Trends in Analytical Chemistry* 118:50-64.

- Khan, M.A.I., Biswas, B., Smith, E., Naidu, R., Megharaj, M. 2018. Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil- a review. *Chemosphere* 212:755-767.
- Koma, D., Sakashita, Y., Kubota, K., Fujii, Y., Hasumi, F., Chung, S.Y., Kubo, M. 2003. Degradation of car engine base oil by *Rhodococcus* sp. NDKK48 and *Gordonia* sp. NDKY76A. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67(7):1590-1593.
- Lawniczak, L., Wozniak-Karczewska, M., Loibner, L.P., Heipieper, H.J., Chrzanowski, L. 2020. Microbial degradation of hydrocarbons - basic principles for bioremediation: a review. *Molecules* 25:586.
- Leal, A.J., Rodrigues, E.M., Leal, P.L., Lopes Júlio, A.D., de Cássia Rocha Fernandes, R., Chaer Borges, A., Tótola, M.R. 2017. Changes in the microbial community during bioremediation of gasoline-contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology* 48(2):324-351.
- Lewin, A., Wentzel, A., Valla, S. 2013. Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments. *Current Opinion in Biotechnology* 24(3):516-525.
- Lin, T.C., Pan, P.T., Cheng, S.S. 2010. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 176:27-34.
- Liu, P.; Tsung, C.C., Liang-Ming, W., Chun-Hsuan, K., Po-Tseng, P., Sheng Shung, C. 2011. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65:1119-1127.
- Maier, R.M., Gentry, T.J. 2015. Microorganisms and organic pollutants. En: Pipper, I.L., Gerba, C.P., Gentry, T.J. (eds.), *Environmental microbiology*, pp. 377-413. Academic Press, San Diego, Estados Unidos.
- Minai-Tehrani, D., Rohanifar, P., Azami, S. 2015. Assessment of bioremediation of aliphatic, aromatic, resin, and asphaltene fractions of oil-sludge-contaminated soil. *International Journal of Environmental Science and Technology* 12:1253-1260.
- Modrzyński, J.J., Christensen, J.H., Mayer, P., Brandt, K.K. 2016. Limited recovery of soil microbial activity after transient exposure to gasoline vapors. *Environmental Pollution* 216:826-835.
- Nocentini, M., Pinelli, D., Fava, F. 2000. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem. *Chemosphere* 41(8):1115-1123.
- Nozari, M., Samaei, M.R., Dehghani, M., Ebrahimi, A.A. 2018. Bioremediation of alkane hydrocarbons using bacterial consortium from soil. *Health Scope* 7(3):e12524.
- Nwankwegu, A.S., Onwosi, C.O. 2017. Bioremediation of gasoline contaminated agricultural soil by bioaugmentation. *Environmental Technology and Innovation* 7:1-11.
- Pereira, E., Napp, A.O., Allebrandt, A., Barbosa, R., Reuwsaat, J., Lopes, W., et al. 2019. Biodegradation of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater by autochthonous microorganisms. *International Biodeterioration and Biodegradation* 145:104789.
- Peressutti, S., Alvarez, H., Pucci, O. 2003. Dynamics of hydrocarbon-degrading bacteriocenosis of an experimental oil pollution in Patagonian soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 52:21-30.
- Pucci, G.N., Acuña, A.J., Pucci, O.H. 2011. Biodegradación de hidrocarburos en la meseta patagónica, un resumen de la optimización de los parámetros a tener en cuenta. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental* 115:36-41.
- Pucci, G.N., Acuna, A.J., Pucci, O.H. 2013. Inconvenientes en el desarrollo de la biodegradación. En: Albanesi, A.S. (eds.), *Microbiología agrícola. Un aporte de la investigación en Argentina*, pp. 465-474. Magna, San Miguel, Tucumán, Argentina.
- Raju, M.N., Rodriguez, L., Sanaguano Salguero, H., Burgos Morán, R.E., Venkateswarlu, K., Scalvenzi, L. 2017. Biodegradation of diesel, crude oil and spent lubricating oil by soil isolates of *Bacillus* spp. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 98:698-705.
- Reddi, L.N., Inyang, H.I. 2000. *Geoenvironmental engineering: principles and application*. CRC Press, Mew York, USA.
- Ríos, S.M., Nudelman, N.S. 2006. Natural attenuation of oil spills in patagonian soils. Characterization by ¹H NMR spectroscopy. *Environmental Technology*. 29(1):23-33.
- Silva-Castro, G.A., Rodriguez-Calvo, A., Laguna, J., González-López, J., Calvo, C. 2016. Autochthonous microbial responses and hydrocarbons degradation in polluted soil during biostimulating treatments under different soil moisture. Assay in pilot plant. *International Biodeterioration and Biodegradation* 108:91-98.
- Skopp, J., Jawson, M.D., Doran, J.W. 1990. Steady-state aerobic microbial activity as a function of soil water content. *Soil Science Society of America Journal*. 54:1619-1625.
- Taccari, M., Milanovic, V., Comitini, F., Casucci, C., Ciani, M. 2012. Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. *International Biodeterioration and Biodegradation* 66(1):39-46.
- Tang, J., Sun, G., Wang, R. 2009. Management on the bio remediation of petroleum contaminated soil and its cost analysis. *16th International Conference on Industrial Engineering and Engineering Management*. Beijing, China.
- Tejada, M., González, J.L., Hernández, M.T., García, C. 2008. Application of different organic amendments in a gasoline contaminated soil: effect on soil microbial properties *Bioresource Technology* 99:2872-2880.
- USEPA 2004. *How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites. A guide for corrective action plan reviewers. EPA 510-R-04-002*. United States Environmental Protection Agency, Washington D. C., Estados Unidos.
- Vandecasteele, J.P. 2008. *Petroleum microbiology: concepts, environmental implications, industrial applications*. Technip, París, Francia.
- Wang, X.B., Chi, C.Q., Nie, Y., Tang, Y.Q., Tan, Y., Wu, G., Wu, X.L. 2011. Degradation of petroleum hydrocarbons (C6-C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. *Bioresource Technology* 102:7755-7761.
- Wolińska, A., Kuźniar, A., Szafraniek-Nakonieczna, A., Jastrzębska, N., Roguska, E., Stępniewska, Z. 2016. Biological activity of autochthonic bacterial community in oil-contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 227:130.
- Wu, M., Dick, W.A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., et al. 2016. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 107:158-164.
- Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F., Xu, P. 2011. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology* 102:4111-4116.