AEET
ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE ECOLOGÍA TERRESTRE

Ecosistemas 17 (3): 133-138. Septiembre 2008.
http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=557

INVESTIGACIÓN

ecosistemas
REVISTA CIENTÍFICA Y TÉCNICA DE ECOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE
www.revistaecosistemas.net

Indicadores microbiológicos como marcadores de la contaminación y recuperación de suelos contaminados con queroseno

E. Pérez [1], P. Garrido [1], M. Laca [1]

(1) Dpto. I+D, Intertek Oil, Chemical & Agri. Alda. 48009 Bilbao, España.

Recibido el 4 de julio de 2008, aceptado el 5 de agosto de 2008.

Pérez, E., Garrido, P., Laca, M. (2008). Indicadores microbiológicos como marcadores de la contaminación y recuperación de suelos contaminados con queroseno. *Ecosistemas* 17(3):133-138.
Se han analizado diferentes variables microbiológicas con el fin de evaluar su utilidad como herramientas de monitorización de un proceso de biorremediación de un suelo contaminado con queroseno. Los resultados mostraron la existencia de una elevada correlación entre la actividad deshidrogenasa (DH), la respiración basal (RB) y la concentración residual de hidrocarburos (THC). El recuento de heterótrofos cultivables (ufcs) resultó ser menos efectivo que las variables anteriores para monitorizar el proceso de biorremediación. Tras 2-4 semanas de adaptación, el incremento en la actividad de los microorganismos aumentó la tasa de degradación. A medida que los hidrocarburos disponibles se consumían, la actividad disminuyó y con ella las tasas de degradación.

Palabras clave: queroseno, hidrocarburos, deshidrogenasa, respiración basal, bacterias heterótrofas cultivables.

Pérez, E., Garrido, P., Laca, M. (2008). Microbiological indicators as markers of soil contamination and recovery after being polluted with kerosene. *Ecosistemas* 17(3):133-138.
Different microbial variables were analyzed to assess their potential use as monitoring tools for the remediation of hydrocarbon-contaminated soils. Results show a strong correlation between dehydrogenase activity (DH), basal respiration (RB) and hydrocarbon residual concentration (TCH). Cultivable heterotrophic counts (ufcs) were not as effective as the previous variables for the assessment of the evolution of the bioremediation process. After an adaptation period lasting 2-4 weeks, hydrocarbon degradation rates increased with microbial activity. Then microbial activity and biodegradation gradually decreased as hydrocarbons depleted.

Keywords: kerosene, hydrocarbons, dehydrogenase, basal respiration, cultivable heterotrophic bacteria

Introducción

Los hidrocarburos son sustancias de composición química muy diversa, insolubles en agua, que resultan muy tóxicas para los organismos vivos cuando entran en contacto con el suelo. La intensidad de estos daños, sin embargo, depende del tipo de hidrocarburo. Así, combustibles ligeros como la gasolina y el queroseno, son más tóxicos que los medianos y pesados (diesel o fuel), debido a que contienen grandes cantidades de hidrocarburos saturados y bajos contenidos de compuestos polares (Dorn et al. 1998), y a que su mayor volatilidad aumenta el contacto físico entre el contaminante y las células microbianas (Xu y Johnson 1995; Mendoza 1998; Labud et al. 2007). Cada vez más, la biorremediación de hidrocarburos se presenta como una alternativa viable y prometedora por su efectividad y bajo costo frente a técnicas físico-químicas más agresivas que conllevan la pérdida de funciones del suelo. El empleo de bioindicadores microbiológicos para determinar el estado de salud de un suelo contaminado con hidrocarburos presenta numerosas ventajas frente al empleo de indicadores físico-químicos, entre las que destacan su mayor sensibilidad, su carácter integrador, y su alta velocidad de respuesta (Pankhurst et al. 1995; Yakovchenko et al. 1996; Elliott 1997). Sin embargo, se ha demostrado que la medida única de una respuesta microbiológica ofrece diferentes valores en función del tipo de suelo y del contaminante vertido (Bundy et al. 2002).

Ecosistemas no se hace responsable del uso indebido de material sujeto a derecho de autor. ISSN 1697-2473.

A pesar de que la bibliografía presenta cada vez más estudios sobre el empleo de variables microbiológicas para monitorizar procesos biorremediadores de suelo, no existe consenso sobre el grado de afección de los microorganismos ante la presencia de hidrocarburos en el suelo, ni sobre la manera de utilizar estas variables como herramientas de monitorización. Por ello, es recomendable realizar estudios específicos para cada tipo de suelo, contaminante, concentración, etc. que permitan mejorar el conocimiento sobre la complejidad de la ecología microbiana, y poder emplear variables microbiológicas como herramientas útiles de monitorización.

En este trabajo se describen los resultados obtenidos del análisis de una batería de indicadores microbiológicos medidos durante el proceso de biorremediación en un suelo con muy bajo contenido en materia orgánica, contaminado con una mezcla de hidrocarburos ligeros. Además, se describe la relación existente entre estas variables y la concentración residual de hidrocarburos en el suelo, con el propósito de proporcionar una herramienta eficaz para monitorizar la efectividad de la biorremediación en la recuperación de la salud del suelo.

Materiales y métodos

Se eligió un suelo de textura franco-arcillo-limosa procedente de un área rural abandonada situada en Gallarta, Bizkaia, el cual se caracterizó por un bajo contenido en materia orgánica (1,7%) y pH de 6,5. El suelo se contaminó de manera artificial con queroseno sintético (10.000 mg kg^{-1}). Un análisis cromatográfico indicó que poseía un 79% de compuestos alifáticos (C8-C19), y un 21% de fracción aromática. La contaminación del suelo se realizó por codisolución del contaminante en acetona (500 ml kg^{-1} suelo), siguiendo las recomendaciones de la Norma ISO/CD 15952, por lo que previo al inicio de los tratamientos de biorremediación, se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente durante 2 semanas. El suelo se separó en contenedores de 2 kg y se establecieron 5 tratamientos por triplicado: suelo no contaminado (UC), suelo contaminado estéril (SC), suelo contaminado (C), suelo contaminado fertilizado 1 (FC1) y suelo contaminado fertilizado 2 (FC2). Todos ellos se airearon 3 veces por semana y, excepto el control estéril, se mantuvieron a un 60% de su capacidad de retención hídrica durante todo el ensayo mediante la adición periódica de agua. El tratamiento SC se esterilizó 2 veces en autoclave durante 1 h a 121ºC, evaluándose posteriormente la actividad microbiológica mediante el análisis de la respiración basal. El control estéril (SC) se mantuvo en ausencia de agua para evitar la aparición de actividad microbiológica en caso de que algunos grupos formadores de esporas hubieran resistido el proceso de esterilización.

El suelo se fertilizó con KH_2PO_4, K_2HPO_4, NH_4NO_3 y urea para conseguir una proporción molar de C orgánico total, N y P de 100:10:1 y 50:10:1 en los microcosmos FC1 y FC2, respectivamente. El suelo se incubó a temperatura ambiente durante 19 semanas y se muestreó quincenalmente, analizándose la concentración de hidrocarburos en suelo (EPA 3550 B), la actividad deshidrogenasa (por el método de Trevors et al. 1982, modificado por García et al. 1993), respiración basal (análisis de la producción de CO_2 por cromatografía de gases tras incubar las muestras durante 48 h a 25ºC en oscuridad, al 50% de su capacidad de campo) y el recuento de heterótrofos cultivables (extracción por agitación con agua y siembra en placas de agar LB). La normalidad de los datos se comprobó con el test de Kolmogorov-Smirnov, las diferencias entre tratamientos se analizaron a través de los análisis estadísticos t-Student para las medias y ANOVA para las varianzas. El análisis de correlaciones se realizó con el test de Pearson. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el uso del paquete estadístico STATGRAPHICS® Centurión XV (The User´s Guide to STATGRAPHICS® Centurion XV).

Resultados y discusión

La ausencia de actividad respiratoria observada en los microcosmos estériles indicó que la gran pérdida de hidrocarburos (73%) detectada durante las dos primeras semanas tras la contaminación en todos los microcosmos se debió a procesos abióticos, principalmente a la volatilización del contaminante. Algunos autores han descrito que el agua es capaz de desplazar los hidrocarburos del suelo, ya que es fuertemente retenida en los capilares, reduciendo la porosidad efectiva del suelo (Fine et al. 1997). Como consecuencia, se puede producir una reducción, tanto de la retención física de los hidrocarburos en los poros pequeños y capilares del suelo, como de la adsorción a la superficie de las partículas minerales y la materia orgánica (Mortland 1970; Chiou y Shoup 1985). Así, la presencia de agua en los suelos puede favorecer la pérdida abiótica de los hidrocarburos por procesos como lixiviación. Sin embargo, en nuestro caso se descartan las pérdidas del contaminante por lixiviación ya que los experimentos se llevaron a cabo en contenedores estancos que se airearon de forma mecánica tres veces por semana, evitando que el contaminante se quedara en el fondo del recipiente.

A pesar de que se han descrito reacciones abióticas como de hidrocarburos en la matriz del suelo, como la fotooxidación y la adsorción (Margesin et al. 2007), la rápida desaparición de éstos se atribuyó principalmente a la coevaporación del queroseno con la acetona aplicada al suelo. Debido a la alta proporción de combustible volatilizado, los porcentajes de degradación se calcularon a partir de la concentración de hidrocarburos resultante en el suelo estéril SC durante el proceso de remediación, evitando así sobreestimaciones en la evaluación de la biodegradación. La **Figura 1** muestra la evolución de la concentración residual de hidrocarburos en el suelo a lo largo de todo el experimento. En todos los casos se produjo una disminución significativa de la concentración de hidrocarburos. En los microcosmos no fertilizados (C), se obtuvieron rendimientos de

degradación moderados (80%). La adición de nutrientes (FC1 y FC2) incrementó la velocidad de degradación, alcanzando un 92% al final del ensayo, no observándose diferencias significativas entre ambos tratamientos de estimulación (P>0,05). Al contrario que lo observado por otros autores (Atagana et al. 2003) que describen un efecto tóxico del exceso de fertilización en el suelo, la adición de una concentraciones superior de nutrientes en el suelo estudiado no produjo un efecto inhibitorio en los microorganismos.

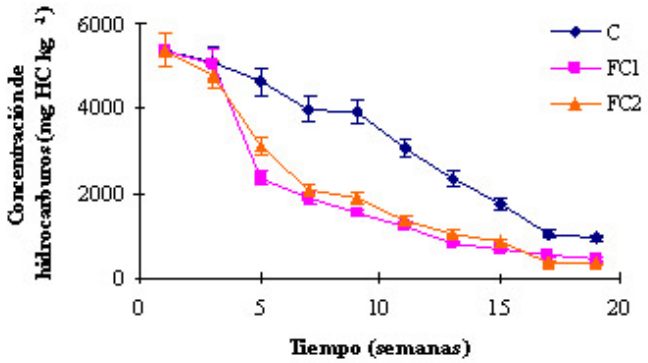
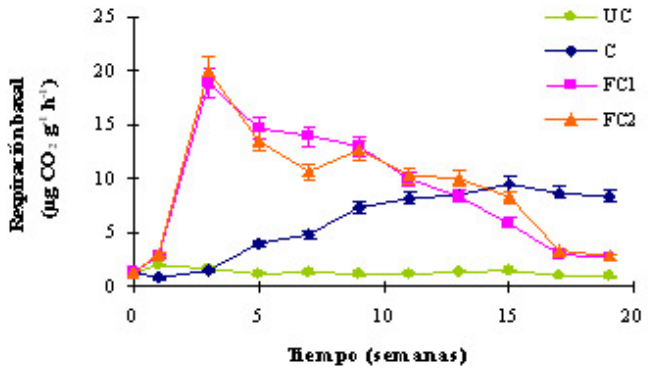


Figura 1: *Concentración de hidrocarburos (mg kg^{-1}) respecto al tiempo (semanas).*
♦ *Control no contaminado (C);* ■ *Fertilizado 1 (CF1);* ▲ *Fertilizado 2 (CF2)*

La adición de hidrocarburos al suelo provocó una disminución de la actividad deshidrogenasa, la respiración basal y el número de ufcs (**Fig. 2**), evidenciando la toxicidad del queroseno para los microorganismos del suelo. En experimentos anteriores se contaminó el mismo suelo con la misma concentración de una mezcla de hidrocarburos más pesada, similar a un gasóleo de automoción (misma viscosidad, densidad y curva de destilación) y la disminución observada de la actividad deshidrogenasa, la respiración basal y el número de ufcs fue significativamente inferior a la observada en el experimento aquí descrito. La volatilidad de los compuestos presentes en el queroseno facilita el contacto de los hidrocarburos con los microorganismos sea mayor, aumentando su toxicidad (Xu y Johnson 1995; Mendoza 1998; Labud et al 2007). Tras esta fase inhibitoria, los microorganismos comenzaron a degradar los hidrocarburos activamente, resultando en un incremento de todas las actividades estudiadas. En el suelo no fertilizado (C) este incremento de actividad y ufcs se produjo de una manera progresiva. Por el contrario, la incorporación de nutrientes redujo la duración del periodo inicial de adaptación de 4 a 2 semanas, produciendo además, un incremento brusco de la actividad deshidrogenasa y respiratoria de los microorganismos del suelo. Estas actividades se mantuvieron elevadas hasta la semana 13, disminuyendo progresivamente después de esta fecha. Los mayores incrementos de actividad observados en los microcosmos fertilizados se debieron probablemente a una mejor aclimatación de los microorganismos en estos microcosmos, a la presencia de los hidrocarburos y a una degradación más eficiente (Margesin et al. 2000). La variación en la concentración de nutrientes no produjo diferencias significativas en la evolución de las diferentes variables microbiológicas estudiadas (P>0,05).



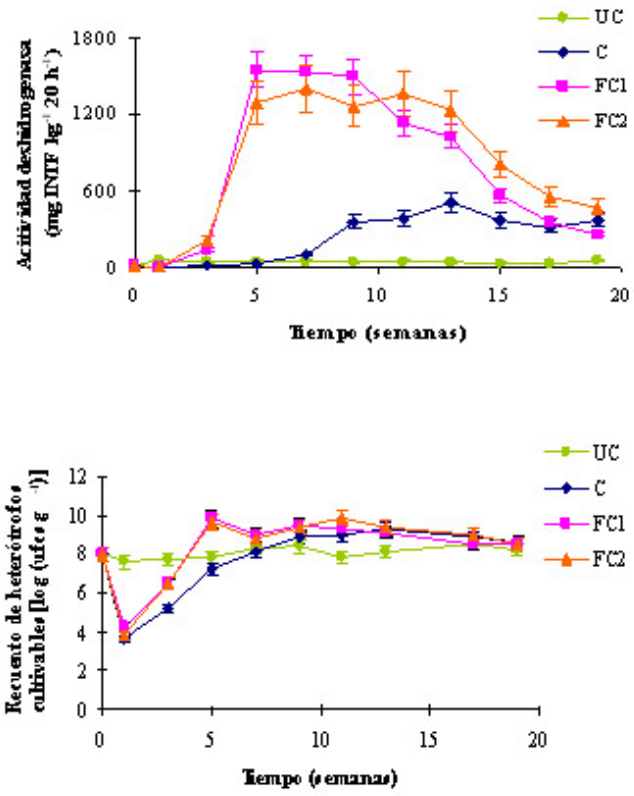


Figura 2: *Respiración basal (µg CO_2 g^{-1} h^{-1}), recuento de heterótrofos cultivables [log (ufc g^{-1})] y actividad deshidrogenasa (mg INTF kg^{-1} h^{-1}) respecto al tiempo (semanas).*
● *Control no contaminado (UC)* ♦ *Contaminado (C);* ■ *Fertilizado 1 (CF1);* ▲ *Fertilizado 2 (CF2)*

El análisis de correlación (test de Pearson, Tabla 1) mostró que en los microcosmos C tanto la actividad deshidrogenasa, la respiración basal como el número de heterótrofos totales se correlacionaron negativamente con la concentración de hidrocarburos del suelo. En los microcosmos fertilizados, la relación existente entre estas variables y la concentración residual de hidrocarburos exhibió 2 periodos diferenciados: durante las primeras 4-5 semanas tras la fertilización, todas las variables microbiológicas estudiadas mostraron un incremento, mientras que la concentración de hidrocarburos en el suelo descendía bruscamente. Esto dio lugar a una correlación negativa, indicadora de una degradación muy activa de los hidrocarburos. Posteriormente, las correlaciones se tornaron positivas, indicando que la actividad microbiológica disminuía a medida que se consumían los hidrocarburos disponibles en el suelo.

	THC		
	C	FC1	
		0-5 semanas	5-19 semanas
RB	-0,8917**	-0,9724**	0,9655*
DH	-0,7691*	-0,9738**	0,9906**
ufcs	-0,7316*	-0,9560*	0,9708*

Tabla 1*: Coeficientes de correlación bivariada de Pearson entre las diferentes variables relacionadas con la presencia de hidrocarburos y la actividad microbiológica estudiadas (*:P<0,05; **: P<0,01) THC: Hidrocarburos totales; C: contaminado; FC1: Fertilizado 1; RB: respiración basal; DH: actividad deshidrogenasa; ufcs: unidades formadoras de colonias.*

Conclusiones

El vertido de hidrocarburos sobre un suelo franco-arcillo-limoso pobre en materia orgánica y ligeramente ácido tuvo un efecto tóxico inicial al hacer disminuir la población de heterótrofos y la actividad microbiológica del suelo. La comunidad microbiana necesitó un periodo de 2-4 semanas para incrementar su actividad y biomasa, comenzando a degradar activamente los hidrocarburos vertidos. El porcentaje de degradación final resultante fue muy elevado, tanto con incorporación de nutrientes como sin ellos, indicando que el rendimiento final del proceso de biodegradación de los hidrocarburos no se vio limitado por la falta de nutrientes. Tal y como se esperaba, la aplicación de fertilizante permitió un incremento de la velocidad de degradación, disminuyendo el periodo de adaptación de los microorganismos.

Debido a las elevadas correlaciones observadas entre la actividad deshidrogenasa y la respiración basal con los THC del suelo a lo largo de todo el proceso de biorremediación, ambas variables son herramientas adecuadas para monitorizar la biodegradación de queroseno en el suelo estudiado. Las correlaciones observadas entre las variables medidas en el suelo fertilizado y el suelo sin fertilizar permitieron monitorizar además la efectividad del tratamiento aplicado. El comportamiento de las variables seleccionadas en este estudio permitió predecir tanto el comienzo de la degradación activa de los hidrocarburos, que coincide con el incremento en actividad y biomasa, como el rendimiento del proceso biorremediador.

Referencias

Atagana, H. I., Haynes, R. J., Wallis, F. M. 2003. Optimisation of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Biodegradation* 14:297-307.

Bundy, J. G., Paton, G. I., Campbell, C. D. 2002. Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. *Journal of Applied Microbiology* 92:276-288.

Chiou, C. T., Shoup, T. D. 1985. Soil sorption of organic vapors and effects of humidity on sorptive mechanism and capacity. *Environmental Science and Technology* 19:1196-1200.

Dorn B. P., Vipond E. T., Salanitro P. J., Wisniewski L. H. 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils using earthworms, microtox, and plants. *Chemosphere* 37:845-860.

Elliott, E. T. 1997. Rationale for developing bioindicators of soil health. En: Pankhurst, C. E., Doube, B. M., Gupta, V. V. S. R. (Eds.), *Biological Indicators of Soil Health*, pp. 49-57. CAB International, New York.

EPA 3550 B. 1996. Ultrasonic extraction. (www.epa.gov/sw-846/pdfs/3550b.pdf).

Fine, P., Graber, E. R., Yaron, B. 1997. Soil interactions with petroleum hydrocarbons: abiotic processes. *Soil Technology* 10:133-153.

García, C., Hernández, T., Costa, F., Ceccanti, B., Masciandaro, G. 1993. The dehydrogenase activity of soil as an ecological marker in processes of perturbed system regeneration. En: Gallardo-Lancho, J. (Ed), *Proceedings of the XI International Symposium of Environmental Biochemistry*, pp. 89-100. CSIC, Salamanca, España.

ISO/CD 15952. Soil Quality: Effects of pollutants on juvenile land snails (Helix aspersa). Determination of the effects on growth by soil contamination. International Organization for Standarization. P.O. Box 5059. NL-2600 GB Delft. The Netherlands.

Labud, V., García, C., Hernández, T. 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere* 66:1863-1871.

Margesin, R. Hämmerle, M. Tscherko, D. 2007. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microbial Ecology* 53:259-269.

Mendoza, R. E. 1998. Hydrocarbon leaching, microbial population, and plant growth in soil amended with petroleum. *Bioremediation Journal* 3:223–231.

Mortland, M. M. 1970. Clay-organic complexes and interactions. *Advances in Agronomy* 22:75-l17.

Pankhurst, C. E., Hawke, B. G., McDonald, H. J., Kirkby, C. A., Buckerfield, J. C., Michelsen, P., O'Brien, K. A., Gupta, V.

V. S. R., and Doube, B. M. 1995. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35:1015-1028.

The User´s Guide to STATGRAPHICS® Centurion XV. 2005. StatPoint, Inc.US. www.statgraphics.com

Trevors, J. T., Mayfield C. I., Innis, W. E. 1982. Measurement of electron transport system (ETS) activity in soil. *Microbial Ecology* 8:163-168.

Xu, J. G., Johnson, R. L. 1995. Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oil contaminated, remediated and uncontaminated soils planted to barley and field pea. *Plant and Soil* 173:3–10.

Yakovchenko, V.P., Sikor, L. J., Kaufman, D. D. 1996. A biologically based indicator of soil quality. *Biology and Fertility of Soils* 21:251–345.