Ruberto Lucas, Martínez-Álvarez Lucas, Vázquez Susana, Mac Cormack Walter

Microorganismos beneficiosos para los suelos de la Antártida Argentina

La Antártida, a pesar de su lejanía de los grandes centros industriales, está expuesta a la contaminación de origen humano. Por lejos, los hidrocarburos del petróleo (derivados de los combustibles que se usan en las bases antárticas como fuente de energía) son los principales contaminantes.

El grupo de microbiología ambiental del IAA estudia diferentes estrategias debiorremediación (herramienta biotecnológica que aprovecha las capacidades metabólicas de los microorganismos nativos para atenuar el efecto de los contaminantes) que permitan eliminar, o al menos reducir en los suelos antárticos, los hidrocarburos provenientes de derrames accidentales de combustibles.

Argentina ha tenido una presencia ininterrumpida en el continente antártico desde 1904. En la actualidad, dicha presencia queda evidenciada por las 13 bases (seis permanentes y siete temporarias) que nuestro país posee en el continente blanco. En estas bases, la energía necesaria para la generación de calor, el movimiento de los vehículos y la producción de electricidad proviene de los combustibles derivados del petróleo. Dichas necesidades requieren que anualmente se transporten millones de litros de Gas Oil Antártico (GOA) hacia las bases antárticas, para su almacenamiento en grandes cisternas. Este combustible posee una composición especial que lo hace apto para el uso en regiones polares de climas extremadamente frio. Estas condiciones climáticas sumamente adversas imperantes diariamente en Antártida, ocasionan que al manejar grandes volúmenes de combustible bajo estas condiciones, se generen focos de contaminación; sobre todo en los suelos cercanos a las cisternas de almacenamiento.

Nuestro país en signatario original del Tratado Antártico firmado en 1959 y su protocolo de protección ambiental (1991), por el cual se ha comprometido a "…proteger el medio ambiente antárticoy los ecosistemas dependientes y asociados…".
Por esta razón, cualquier daño ambiental debe y puede ser reparado.

Figura 1.
Tanques de combustible en la base Carlini.
Los suelos en sus inmediaciones están expuestos a derrames accidentales y contienen hidrocarburos que pueden ser eliminados mediante procesos de biorremediación

El daño ambiental debe y puede ser reparado.

Figura 2.
Integrantes del grupo de Microbiología Ambiental del IAA tomando muestras de suelo y microorganismos en el área de los tanques de almacenamiento de combustible. El daño ambiental debe y puede ser reparado.

Entre varias de sus actividades, el grupo de microbiología ambiental de Instituto Antártico Argentino (IAA) lleva a cabo proyectos que buscan hacer frente a esta problemática ambiental. Para ello, utilizando herramientas biotecnológicas (es decir, haciendo uso de organismos vivos para la obtención de productos, o en este caso, un servicio) se busca aprovechar las capacidades de organismos vivos (especialmente hongos y bacterias) para degradar los contaminantes, contribuyendo así al saneamiento del medio ambiente afectado. Esta estrategia se denomina biorremediación.
El Objetivo General del proyecto es desarrollar metodologías de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos (combustibles) que sean aplicables a escala real en Antártida y otras regiones de clima frío extremo, donde los microorganismos que crecen a las temperaturas a las que estamos habituados no pueden desarrollar o lo hacen lentamente. Al ser un proceso con base biológica, muchos factores pueden condicionar el éxito de la biorremediación, entre ellos la temperatura y la disponibilidad de sustratos necesarios para el crecimiento. Aunque las bajas temperaturas caracterizan la Antártida, durante el verano, y debido a la radiación solar, la capa superficial de los suelos superficiales en el norte de la península antártica puede alcanzar esporádicamente sorprendentes 15°C. Esto implica condiciones más favorables para el desarrollo de un proceso biológico, aprovechando el potencial tanto de los microorganismos sicrófilos (poseen temperaturas óptimas de crecimiento menores a 20°C) como de los sicrotolerantes (capaces crecer a temperaturas cercanas a 0°C, pero cuyo crecimiento óptimo se encuentra por encima de 20°C).

Existen dos estrategias principales de biorremediación: la **Bioestimulación**, que se fundamenta en ajustar las condiciones imperantes en el ambiente para favorecer la actividad de los microorganismos. En este caso en particular, en balancear los niveles de Nitrógeno (N) y Fósforo (P) en relación a la cantidad de Carbono (C) existente. Dado que los hidrocarburos aportan un gran exceso de C, se produce un desbalance en la relación C:N:P, lo que impide un desarrollo óptimo de los microorganismos del suelo. La bioestimulación busca evitar esa limitación de nutrientes.
El **Bioaumento**: es una estrategia que mediante el agregado de microorganismos conocidos capaces de degradar el contaminante, busca obtener una mayor capacidad catabólica en el suelo a tratar. Esta estrategia es propuesta para aquellos casos en los que la flora autóctona del suelo carece de la capacidad de degradación requerida o la misma resulta insuficiente. Para llevarla a cabo, es necesaria una etapa previa de cultivo que permita alcanzar una alta cantidad de biomasa, y una posterior vehiculización del mismo de manera exitosa en el suelo, lo que lo torna más costoso. Además, el bioaumento en Antártida implica la utilización de microorganismos obtenidos del continente, ya que la legislación establecida en el Protocolo Ambiental de Madrid no permite la introducción y utilización de organismos no autóctonos.

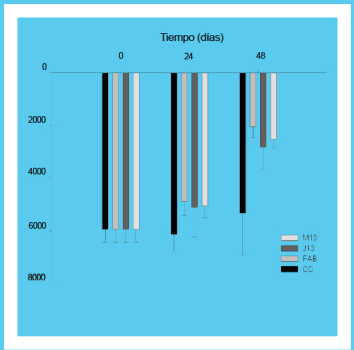


Figura 3.
Cambios en la concentración de hidrocarburos a lo largo de un ensayo de biorremediación en parcelas de suelo crónicamente contaminado.
Luego de 48 días, las parcelas sin tratamiento (CC) sólo mostraron un 10% de remoción, mientras que las bioestimuladas (FAB) mostraron un 65%. Nótese que los sistemas con bioaumento (J13 y M10) no mejoraron la eficiencia del proceso.

Figura 4.
En las condiciones climáticas antárticas los procesos biológicos se dificultosos. Estas parcelas de terreno diseñadas para estudiar la eficiencia de la bioestimulación se encuentran la mayor parte del tiempo cubiertas de nieve, aun en el verano.

Figura 5. Tomando muestras de un ensayo de biorremediación utilizando parcelas de terreno como sistemas experimentales.

IAA INSTITUTO ANTÁRTICO ARGENTINO

"Luego de numerosos estudios realizados tanto en el laboratorio como a campo, hemos observado que la bioestimulación con N y P es un paso esencial para obtener tasas de eliminación de hidrocarburos adecuadas y compatibles con el breve periodo en el cual los suelos cercanos a la Base Carlini se encuentran libres de hielo. En suelos que mostraban una larga historia de exposición a los combustibles (contaminación crónica), el bioaumento no parece mejorar la eficiencia del proceso" comenta el líder del grupo de trabajo, el Dr. Walter Mac Cormack.
En este sentido, diversos estudios a campo realizados en microcosmos, en parcelas de terreno y en sistemas de biopilas han confirmado que la bioestimulación permite remover, en promedio, entre el 60 y el 80% de los contaminantes presentes en el suelo, aumentando significativamente la eliminación por atenuación natural, en donde solo actúan procesos abióticos (evaporación, arrastre por los vientos, etc.) o la actividad de los microorganismos presentes, pero sin ninguna intervención adicional. La figura 3 muestra los resultados obtenidos en uno de esos estudios (Vazquez y col 2009), realizado en parcelas de terreno, distribuidas en tres bloques aleatorizados, en cercanías de Base Carlini (Figuras 4 y 5). Como puede observarse, en un suelo crónicamente contaminado conteniendo una concentración inicial de hidrocarburos totales de 5950 ppm, la bioestimulación permitió la eliminación de un 65% de los contaminantes en sólo 48 días (sistemas ABS) contra sólo un 10% de eliminación en los sistemas no tratados (CC). Sorprendentemente, sistemas bioaumentados con dos diferentes conjuntos de bacterias autóctonas degradadoras de hidrocarburos (sistemas J13 y M10 en figura 3) no incrementaron significativamente la remoción de los contaminantes. Resultados similares se obtuvieron en estudios de microcosmos con suelos de la Base Marambio (Ruberto y col 2009). Estos resultados se han observado repetidamente, confirmando lo esencial de la bioestimulación de los suelos antárticos para un adecuado proceso de biorremediación y mostrando también que el agregado de microorganismos mediante inoculación de bacterias degradadoras autóctonas no es una herramienta de elección cuando el suelo a tratar presenta una larga historia previa de exposición a los hidrocarburos. Esta aseveración ha sido confirmada también en estudios de laboratorio, en microcosmos, que han mostrado que incluso la inoculación de niveles tan altos como 1 x 10 9 células/gr de suelo de bacterias degradadoras no mejora la eficiencia de remoción de hidrocarburos mostrada por la flora autóctona bioestimulada.

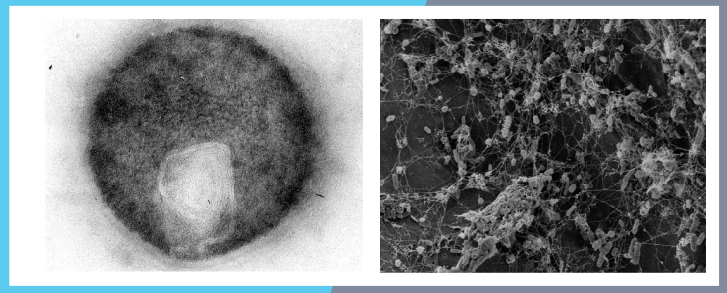


Figura 6. Los microorganismos antárticos degradadores de hidrocarburos son herramientas potenciales para el desarrollo de procesos de biorremediación basados en el bioaumento. A la izquierda Rhodococcus ADH, una bacteria con alta capacidad de degradar hidrocarburos alifáticos. A la izquierda, imagen de M10 un consorcio bacteriano capaz de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos.

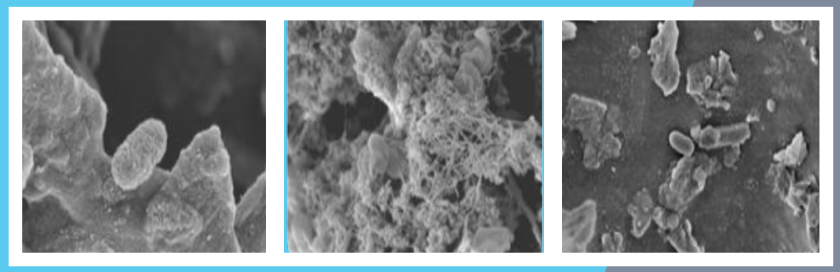


Figura 7. Bacterias asociadas a diferentes matrices inertes utilizadas como vehículos para la inmovilización.

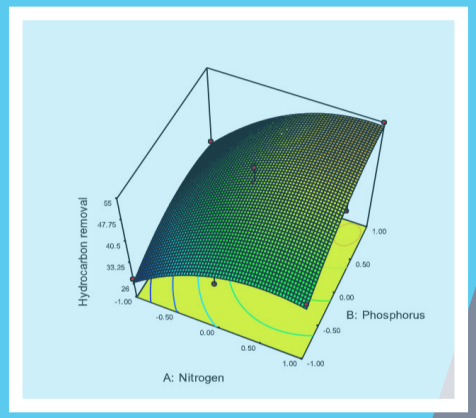


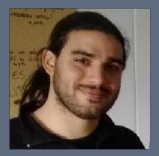
Figura 8. El Método de Superficie Respuesta (RSM) mostró que la remoción de hidrocarburos del suelo de base Carlini seria máxima sometido a una relación C:N:P de 100:17,6:1,73, la cual difiere de aquellas tomadas como referencia (100:10:1) para la mayoría de los proyectos de bioestimulación

Es importante aclarar que ese nivel de inóculo es aproximadamente 3 órdenes de magnitud mayor a la carga bacteriana total de un suelo antártico y cinco órdenes de magnitud mayor que los recuentos de bacterias degradadoras. Además, en uno de los estudios, se aplicaron técnicas de fingerprinting de ADN de comunidad bacteriana total (Vazquez y col 2009) y no se pudo detectar la presencia de los microorganismos inoculados, lo que sugiere que el inóculo agregado no es capaz de sobrevivir en cantidades detectables, probablemente por efectos de competencia con la microbiota del suelo y la predación por virus y protozoos. Estas limitaciones ecológicas al establecimiento de los inóculos son actualmente motivo de nuevos estudios.Si bien es claro que el bioaumento no mejora la eficiencia de la biorremediación en los casos de contaminación crónica, es posible que sí lo haga cuando suelos prístinos se vean abruptamente afectados por un derrame accidental. Es por ello que parte de nuestros estudios actuales se siguen centrando en el aislamiento, la caracterización y el estudio (en el laboratorio y a campo, de microorganismos antárticos capaces de degradar hidrocarburos (Figura 6). De todas maneras, bajo estas circunstancias aún se debe optimizar el tipo de inóculo así como también definir las matrices o vehículos adecuados para inmovilizar el inóculo, ya que tanto los factores ecológicos antes mencionados, como el arrastre debido a la escorrentía y el lavado por las precipitaciones hacen muy difícil el establecimiento y la sobrevida del inóculo agregado directamente al suelo. La figura 7 muestra imágenes de las bacterias degradadoras inmovilizadas sobre diferentes matrices inertes para su inoculación.A partir de estos resultados, estamos comenzando a estudiar estrategias de biorremediación que buscan racionalizar el diseño del proceso. Por un lado, nos planteamos la optimización de la cantidad de N y P a agregar. Para ello, utilizando la metodología estadística de superficie de respuesta y tomando como referencia una relación de C:N:P de 100:10:1, buscamos los valores que maximizaban la remoción biológica de hidrocarburos en los suelos de base Carlini (Martínez Álvarez, Lo Balbo, Mac Cormack, & Ruberto, 2015) . (Figura 8).

Figura 9. Preparación de las biopilas en Base Carlini

Actualmente, y partir de todos estos resultados previos, estamos analizando la factibilidad de un proceso secuencial de biorremediación de suelos, que busca remover la masa de los contaminantes (70- 80%) en una primera etapa de bioestimulación, para luego concentrarse sobre los componentes de la fracción remanente aplicando bioaumento con microorganismos que degraden específicamente los componentes mayoritarios de dicha fracción remanente. En el caso de los derrames de gasoil, dichos compuestos son principalmente los alcanos lineales de entre C11 y 14 átomos de carbono. Por otro lado, pensando en la posibilidad de una segunda etapa del proceso de biorremediación, el grupo de trabajo se sigue focalizando en la obtención de herramientas biológicas, especialmente aquellas capaces de remover los componentes de la fracción remanente de hidrocarburos luego de la etapa de bioestimulación. Para ello, se han realizado cultivos de enriquecimiento y estudios de la dinámica de las comunidades microbianas que en ellos se desarrollan mediante fingerptinting de ADN por electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante (DGGE). A partir de estos estudios se han identificado cepas pertenecientes al grupo de las Actinobacterias, así como numerosos miembros de la familia Pseudomonadaceae.
De esta manera, continuamos avanzando en el desarrollo de procesos de remediación biológica eficientes, simples y de bajo costo, que se ajustan a la legislación vigente, para que Argentina disminuya el impacto de la presencia humana en Antártida y cumpla así el compromiso asumido de proteger su medio ambiente.

Los autores



Dr Lucas Ruberto:
Investigador Adjunto Instituto Nanobiotec-CONICET e Investigador del IAA.

Dr Lucas Martinez:
Investigador Asistente CONICET-Investigador del IAA. Docente FFyB-UBA y UNM.

Dra Susana Vazquez:
Investigadora Adjunta Instituto Nanobiotec-CONICET. Docente FFyB-UBA

Dr Walter Mac Cormack:
Jefe del Dto de Microbiología Ambiental y Coordinador de Ciencias de la Vida del IAA. Docente UBA.

Referencias bibliográficas

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 Regions Science and Technology, 119. https://doi.org/10.1016/j.coldregions.2015.07.005

Martínez Álvarez, L. M., Ruberto, L. A. M., Lo Balbo, A., & Mac Cormack, W. P. (2017). Bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils in cold regions: Development of a pre-optimized biostimulation biopile-scale field assay in Antarctica. Science of the Total Environment, 590–591. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.204

Ruberto, L., Dias, R., Lo Balbo, A., Vazquez, S. C., Hernandez, E. A., & Mac Cormack, W. P. (2009). Influence of nutrients addition and bioaugmentation on the hydrocarbon biodegradation of a chronically contaminated Antarctic soil. Journal of Applied Microbiology, 106(4). https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04073.x

Vázquez, S., Nogales, B., Ruberto, L., Hernández, E., Christie-Oleza, J., Lo Balbo, A., … Mac Cormack, W. (2009). Bacterial community dynamics during bioremediation of diesel oil-contaminated antarctic soil. Microbial Ecology, 57(4). https://doi.org/10.1007/s00248-008-9420-9