



MINISTERIO DE DEFENSA NACIONAL
INSTITUTO ANTARTICO ECUATORIANO
GUAYAQUIL

INFORME DE TRABAJOS DE CAMPO EN LAS
EXPEDICIONES A LA ANTARTIDA

Expedición: XVII Expedición

Nombre del proyecto: “BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS EN LA ESTACIÓN CIENTÍFICA PEDRO VICENTE MALDONADO, MEDIANTE EL EMPLEO DE CEPAS MICROBIANAS ANTÁRTICAS, EN TERRARIOS”.

Lugar: Isla Greenwich, Islas Shetland del Sur, Antártica
Estación Científica Pedro Vicente Maldonado

Participantes: Miguel Gualoto UTN

(31 de Enero del 2013)

INFORME DE CAMPO

NOMBRE DEL PROYECTO: “BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS EN LA ESTACIÓN CIENTÍFICA PEDRO VICENTE MALDONADO, MEDIANTE EL EMPLEO DE CEPAS MICROBIANAS ANTÁRTICAS, EN TERRARIOS”

INVESTIGADOR: Miguel Gualoto UTN

1. ANTECEDENTES DEL PROYECTO/COMPONENTE.- (si el proyecto es continuativo, explicar los aspectos a ser investigados en el actual trabajo de campo)

En el año 2010, el FUNDEMAR (Fundación para el Desarrollo Marítimo, Fluvial y Lacustre) presentó el proyecto “Búsqueda y aislamiento de bacterias antárticas con capacidad para degradar hidrocarburos”, el mismo que fue aprobado por el SENESCYT y formó parte de la XIV Misión Científica del Ecuador a la Antártida.

Los primeros hallazgos de la diversidad morfológica de los microorganismos y las particularidades de su crecimiento fueron presentados en la conferencia Ecuador en la Antártida en la Universidad de las Américas de Quito, el mes de abril del 2010. El equipo de investigadores aisló un total de 33 cepas microbianas.

La investigación continuó con pruebas de biodegradación de hidrocarburos; de las 33 encontradas, nueve demostraron capacidad para degradar hidrocarburos. Los resultados de este trabajo fueron presentados en las jornadas “Ecuador en la Antártida, Historia, Proyecciones y Perspectivas”, organizado por el IAEN, INAE y SENESCYT, el 17 de noviembre del 2011.

De igual forma se hizo un rastreo de microorganismos en las zonas nevadas del Ecuador, específicamente en el nevado Antisana a la altitud de 4200m. Se realizó un estudio comparativo de la diversidad morfológica microbiana antártica y andina, sus resultados se presentaron en las Jornadas Antárticas de la Universidad del Pacífico de Guayaquil, en el 2010.

El proyecto fue considerado por el SENESCYT para el programa binacional Ecuador-Venezuela, de investigaciones antárticas dirigido a resolver problemas comunes a las dos naciones, esto es, un programa de investigación de Biotecnología aplicada, que beneficie por igual a las partes.

En enero del 2012 formamos parte de la XVI Misión Científica a la Antártida, contando con la participación de la Universidad Técnica del Norte de la ciudad de Ibarra. En esta oportunidad montamos un experimento in situ con suelos contaminados de la Estación Maldonado, en terrarios.

En las celdas se inyectaron los microorganismos aislados con capacidad para degradar hidrocarburos en seis celdas experimentales con 15000ppm de TPHs y 5000 ppm de HAPs. Cada celda contó con 20kg de suelos, tres con TPHs tres con HAPs, una séptima adicional en calidad de testigo, que no recibió absolutamente nada.

Las cepas microbianas inyectadas en las celdas fueron transportadas a Ecuador por separado en papel filtro estéril, en suelo estéril y en placas petri en medio de cultivo, para su conservación e identificación posterior.

2. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO/CUMPLIMIENTO

- Degradar hidrocarburos con las cepas microbianas aisladas in situ, mediante pruebas de biodegradación (terrarios -bandejas de 20 kg), de suelos contaminados con hidrocarburos alifáticos y aromáticos, bajo condiciones locales de la Estación Científica Pedro Vicente Maldonado.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL PROYECTO /CUMPLIMIENTOS

- Verificar la capacidad degradadora de hidrocarburos observada en pruebas de laboratorio en Ecuador.
- Determinar la viabilidad de microorganismos presentes en las celdas experimentales.
- Transportarlas hasta el Ecuador para su hibridación con cepas andinas.
- Hacer pruebas adicionales

4. HIPÓTESIS DEL PROYECTO/COMPONENTE.-

Los microorganismos aislados de suelos antárticos de las Estaciones Pedro Vicente Maldonado, Arturo Prat y Bellinshaussen, pueden degradar biodegradar hidrocarburos bajo condiciones ambientales extremas de la estación Maldonado.

Los microorganismos empleados en pruebas in situ, permanecen viables aún después de haberse consumido la fuente de carbono.

5. ÁREA DE ESTUDIO.- (determinar donde se efectuó el trabajo, incluyendo coordenadas geográficas, planos o levantamientos)

6. CRONOGRAMA DEL TRABAJO DE CAMPO EFECTUADO. Tabla No1.

FECHA	ACTIVIDADES	OBSERVACIONES
12/01/2013	Salida de reconocimiento	
13/01/2013	Ranchería	
14/01/2013	Preparación de materiales y medios de cultivo	Se recuperaron materiales de otros proyectos y se organizó las repisas con los materiales
15/01/2013	Toma de muestras cerca del león dormido y descubierta de las celdas experimentales	No fue posible sacarlas debido a la gran cantidad de hielo
16/01/2013	Toma de muestras en Punta Ambato Siembra de muestra de Punta Ambato	Coordenadas: 21E 0356065 3073405. Se trabajo con el proyecto de la UTN
17/01/2013	Toma de muestras en Dee con el equipo de la UTN	Tomé una muestra de suelo testigo, para confirmación
18/01/2013	Toma de muestras de las celdas experimentales, para pruebas de viabilidad	Las celdas estuvieron con una capa de hielo de 30cm en su superficie

19/01/2013	Siembra de las muestras para verificar viabilidad de los microorganismos	Se emplearon tres medios TSI, Agar nutritivo y PDA
20/01/2013	Verificación del crecimiento microbiano. Preparación del informe	No se evidencia crecimiento
21/01/2013	Conteo microbiano en las placas de siembra	Se evidencia crecimiento en todos los medios al cuarto día de siembra
22/01/2013	Tinción de gran e identificación morfológica.	Se tiñeron placas de las muestras experimentales en tres medios
23/01/2013	Recolección de muestras Prueba con guano de pingüino	4 am, en marea baja, recolección de moluscos
24/01/2013	Trabajo con microorganismos de guano	
25/01/2013	Viaje a Prat, muestreo de suelos. Tinción de gran cultivo de eses de pingüino	Coordenadas; 21E0362724 3069602 Tres variedades morfológicas encontrada
26/01/2013	Viaje a Dee, recolección de moluscos	Materiales para un nuevo proyecto de investigación
27/01/2013	Procesamiento de muestras de moluscos Preservación de microorganismos para su transporte a Ecuador Limpieza de materiales empleados	Preservación a temperatura ambiente en cooler
28/01/2013	Toma de muestras de las celdas experimentales para su transporte a Ecuador	En Ecuador se determinara la concentración de TPHs y HAPs
29/01/2013	Culminación de informe de campo Desarrollo de la presentación	Entrega de propuesta de Programa de Biorremediación
30/01/2013	Conferencia con resultados	
31/01/2013	Preparación para el viaje	Entrega de vituallas
01/02/2013	Salida de Maldonado	

7. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO DE CAMPO / METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE LOS DATOS.

7.1. Trabajos de campo.

Siendo el objetivo principal de esta fase la verificación de la viabilidad de los microorganismos de las celdas experimentales, el principal trabajo fue la identificación del punto de ubicación de las mismas y su extracción para la toma de muestras.



Celdas sumergidas en el hielo



Capa de hielo sobre las celdas

El trabajo de la extracción fue duro y pesado, gracias a la ayuda de varios colegas pudimos retirar finalmente las celdas e identificarlas para la toma de la muestras correspondiente.



¡Celdas listas!



Muestras listas para su análisis

Para la extracción de las celdas se emplearon palas y una barra para romper el hielo y apalancar las celdas. Para la toma de las muestras se empleó una pala metálica de jardín. La pala se limpió con papel toalla cada vez que se cambió de celda. Las muestras se tomaron en fundas ziploc debidamente rotuladas conforme a los códigos de cada celda experimental.

En cuanto a las muestras de suelo de Punta Ambato, Prat y Maldonado, son muestras puntuales, tomadas con el propósito de tener una reserva de los suelos para los futuros trabajos en el Ecuador.

Solo las muestras de Maldonado y Prat se someterán a la metodología de cuarteo, tal como se ha procedido en las misiones anteriores.

7.2. Trabajos de laboratorio.

- **Preparación de materiales**

Los materiales se esterilizaron se lavaron, secaron y esterilizaron en el autoclave del laboratorio a la temperatura de 121°C durante 15 minutos.

Se emplearon cajas petri desechables traídas del continente, las mismas fueron sometidas a irradiación UV para su esterilización, dentro de la cámara de flujo laminar del laboratorio durante 2 horas.

- **Preparación de medios.**

Los medios preparados disponibles fueron: Agar nutritivo, PDA y agar triple azúcar con Fe TSI. Los medios fueron preparados en frascos boeco, y autoclaveados, para su posterior vertido en las cajas petri y tubos de ensayo con agar inclinado.

- **Realización de siembras.**

Las siembras se realizaron mediante diluciones en tubos de ensayo, y siembras directas en placa, Las siembras se efectuaron dentro de la cámara de seguridad de flujo laminar ascendente, con la ayuda de una aza calibrada y una lámpara de alcohol para el flameado del aza.

- **Cultivos**

Se incubaron los cultivos a temperatura de 15 °C en un termostato calibrado.

- **Identificación morfológica**

Para el efecto se realizó la prueba de gram.

7.3. Trabajos adicionales.

Con el propósito de en un futuro cercano, emplear la tecnología de biorremediación in situ de hidrocarburos, con bacterias sicrotolerantes antárticas, hemos considerado la necesidad de hacer bioestimulación, para aportar nutrientes fundamentales para el crecimiento microbiano, tales como N, P y microelementos.

La fuente disponible in situ es el guano de pingüino y otras aves antárticas. Este guano es rico en nitrógeno y fósforo fundamentales para el metabolismo microbiano. Por otro lado el guano también es fuente importante de otros microorganismos, cuyo potencial en biorremediación no se ha investigado.

Una alternativa al guano es la disponibilidad de musgo deteriorado por las actividades de las estaciones científicas por pisoteo, apertura de caminos u otros trabajos. Los musgos son fuente importante de materia orgánica y de un conjunto de microorganismos con potencial biorremediador, en especial de componentes activos responsables de la meteorización de las rocas en la formación de suelos.

Finalmente existe otra fuente, que en nuestra opinión se está desaprovechando; esto es, los residuos orgánicos generados en las cocinas de las estaciones; en especial los correspondientes a hortalizas y frutos. Los cítricos y frutos aportan con microorganismos capaces de degradar hidrocarburos aromáticos, en especial hongos y levaduras, tales como *Aspergillum*, *Penicillum*, *Fusarium*, *Mucor*, *Cándida*, *Sacharomyces*, etc.

Nos parece irracional que estos residuos se incineren o se transporten al continente. Si el objetivo de incinerarlos o llevarlos fuera, es el de eliminar posibles problemas de contaminación, el tan solo hecho de traerlos y almacenarlos temporalmente hasta su consumo en las estaciones, es ya una fuente de contaminación biológica exógena. Proceso que se ha mantenido desde el establecimiento de las bases antárticas a partir de los años 50 del siglo pasado.

La posibilidad de emplearlos en trabajos de biorremediación in situ, brinda ventajas insuperables en cuanto a:

- Eliminación de los riesgos de contaminación en el transporte hacia el continente.
- Eliminación de los costos asociados a su gestión y transporte.
- Empleo efectivo en la descontaminación de pequeños derrames de hidrocarburos y derivados que siempre se generan en las operaciones de la base.
- Protección del suelo y agua de la contaminación generada por las actividades de las estaciones científicas.
- Cumplimiento de las regulaciones ambientales de cada país y de las regulaciones del Tratado Antártico.
- **Siembra de excremento de pingüino**
Se emplearon 5 g de guano de pingüino, en 50 ml de agua destilada, para siembras directas en agar nutritivo en caja petri y por dilución hasta 10^{-3} , a 15°C. Con las cepas encontradas se implementó una prueba de remediación e hidrocarburos in vitro.
- **Preservación de microorganismos y transportación a Ecuador.**

En papel

Es un método relativamente fácil de conservación de bacterias es el secado sobre tiras o discos de papel filtro estéril. Este método es ideal para el control de la calidad del cultivo. El papel puede conservarse dentro de un tubo estéril de tapa rosca. Cuando se lo necesita con ayuda de una pinza estéril, se los deposita en el medio líquido de cultivo correspondiente. Los representantes de la familia *Enterobacteriaceae*, así como muchas otras bacterias se pueden conservar en el papel por el transcurso de varios años.

La técnica de este método consiste en: El papel estéril es impregnado con una suspensión de bacterias, que contiene 10^8 células/mg y se secan al aire o al vacío [2]. Las bacterias sobreviven más y mejor en el secado en vacío. Las cintas o discos de papel se conservan en tubos cerrados en extractores o entre hojas de plástico transparente estéril [7] Si el desecador se introduce en la refrigeradora, el tiempo de conservación se prolonga.

8.- DATOS OBTENIDOS

8.1. Trabajos de campo.

- **Recolección de muestras.**

Se tomaron dos muestras. Una en punta Ambato en las coordenadas **21E0356065 3073405**, la muestra fue puntual y otra en la Estación Arturo Prat (muestra puntual tomada mediante la metodología de cuarteo), junto a la zona de almacenamiento de combustibles, coordenadas: **21E0362724 - 3069602**.

Se ha planificado la toma de una muestra adicional en la Isla Rey Jorge en la Estación rusa Bellinshaussen, donde se definirán las coordenadas.

8.2. Trabajos de laboratorio

- **Viabilidad microbiana.**

Para evaluar la presencia (viabilidad) o ausencia de microorganismos en las celdas experimentales que invernaron, se tomaron sendas muestras a partir de las cuales se realizaron siembras directas, en placa, en tres medios nutritivos: Agar nutritivo AN, Agar de papa y dextrosa PDA y agar triple azúcar y hierro TSI.

Los microorganismos surgieron al tercer día de haber sido sembrados, el número de colonias por medio observados se recogen en la siguiente tabla.

Tabla No.2 Códigos de las muestras y número de UFCs surgidos

No	MEDIO	CÓDIGO	N UFCs / 72 Horas	ln N
1	Agar nutritivo	AN-PBR-1-G	32	3,46
2		AN-PBR-R-1-G	11	2,39
3		AN-PBR-2-D	38	3,63
4		AN-PBR-R-2-D	22	3,09
5		AN-PBR-3-B	68	4,21
6		AN-PBR-R-3-B	-	0,00
7		Testigo	13	2,56
8	Potato dextrosa agar PDA	PDA-PBR-1-G	12	2,48
9		PDA-PBR-R-1-G	15	2,70
10		PDA-PBR-2-D	17	2,83
11		PDA-PBR-R-2-D	44	3,78
12		PDA-PBR-3-B	47	3,85
13		PDA-PBR-R-3-B	95	4,55
14		Testigo	35	3,55

15	Triple azúcar, hierro agar TSI	TSI-PBR-1-G	10	2,30
16		TSI-PBR-R-1-G	15	2,70
17		TSI-PBR-2-D	10	2,30
18		TSI-PBR-R-2-D	18	2,89
19		TSI-PBR-3-B	28	3,33
20		TSI-PBR-R-3-B	20	2,99
21		Testigo	12	2,48

Fuente: Dr. Miguel Gualoto

Las celdas experimentales fueron:

1. PBR-1-G..... Gasolina
2. PBR-R-1-G..... Gasolina (repetición)
3. PBR-2-D..... Diesel
4. PBR-R-2-D..... Diesel (repetición)
5. PBR-3-B..... Benceno
6. PBR-R-3-B..... Benceno (repetición)

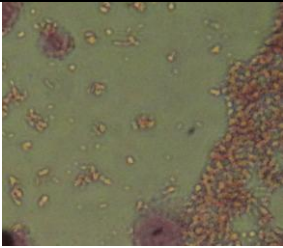


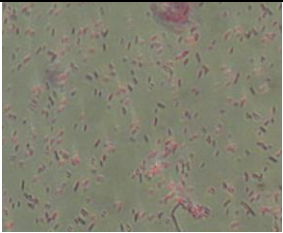
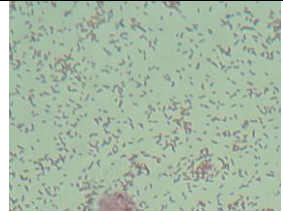

- **Tinción de gram**

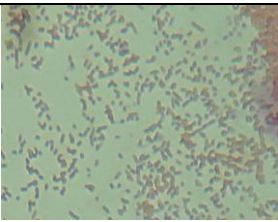
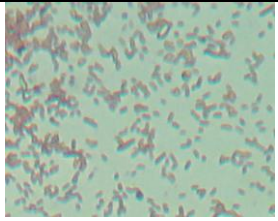
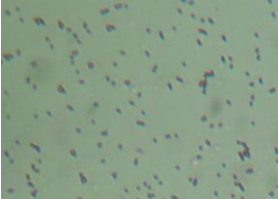
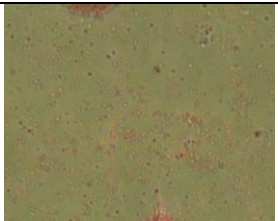
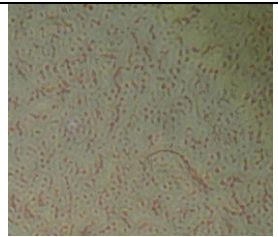

Se aplicó la metodología estándar de tinción gran para las placas descritas en la tabla.

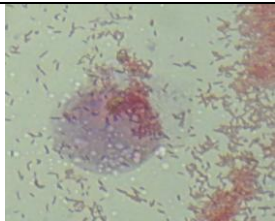
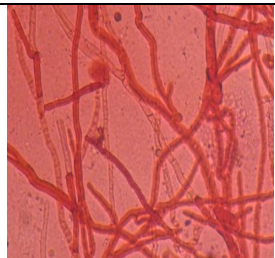


Muestras teñidas listas para su observación

Tabla No3. Caracterización de los microorganismos aislados

No	CÓDIGO	MORFOLOGÍA	REACCIÓN GRAM		IMÁGEN
			GRAM(-)	GRAM(+)	
1	AN-PBR-1-G	Bacilos	x		
2	AN-PBR-R-2-D-A	Bacilos		x	
	AN-PBR-R-2-D-B	Bacilos	x		
3	AN-PBR-3-B	Cocoides	x		
	PDA-PBR-1-G	Bacilos	x		
	PDA-PBR-2-D	Bacilos	x		

	PDA-PBR-R-3	Bacilos	x		
	TSI-PBR-1-G	Bacilos	x		
	TSI-PBR-R-1-G	Cocoides		x	
	TSI-PBR-2-D	Cocos	x		
	TSI-PBR-3-B-1	Vibriones	x		
	TSI-PBR-3-B-2	Bacilos		X	

	TSI-PBR-3-B-3	Bacilo	x		
	TSI-PBR-3-B-4	Hongo			

Fuente: Dr. Miguel Gualoto

Son siete bacilos gran negativos, dos bacilos gran positivos, una de cocoides gram negativos y una de cocoides gran positivos, una de vibriones gran negativos y una de hongos.

- **Cultivo de eses de pingüino.**

Se efectuaron siembras directas en AN y PDA, además de una siembra por diluciones hasta 10^{-3} en placa. De estos cultivos se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla No4. Población y morfología de los microorganismos de heces de pingüino.

No	MEDIO	SIEMBRA	UFCs	ln N	MORFOLOGÍA	REACCIÓN GRAM
1	PDA	Directa	29	3,36	Cocos	(+)
2	AN	Directa	41	3,71	Cocos	(-)
3	AN	10^{-1}	42	3,73	Bacilos/cocos	(-)
4	AN	10^{-2}	15	2,70	Bacilos/cocos	(-)
5	AN	10^{-3}	3	1,09	Bacilos/cocos	(-)

Fuente: Dr. Miguel Gualoto

Las colonias del medio PDA, eran de color crema, de forma redonda y bordes regulares y consistencia mucosa brillante; en tanto que las colonias de AN, eran blanco lechosas, redondas bordes regulares, de consistencia pastosa mate.

- **Pruebas de degradación in vitro**

Debido a la imposibilidad de obtener una solución estándar con la cual construir una curva de referencia para HAPs, esta prueba no se realizó in situ, quedando pendiente para su ejecución en los laboratorios de de la UNT en el Ecuador¹.

- **Preservación de microorganismos y transportación a Ecuador.**

Como se acotó anteriormente los microorganismos fueron impregnados en Papel filtro. Luego de transcurridos varios días después de conteo inicial en las cajas surgieron otras colonias inicialmente no identificadas, razón por la que también se las aisló para ser transportadas al Ecuador. En total se transportan 17 muestras, conforme a la tabla No5.

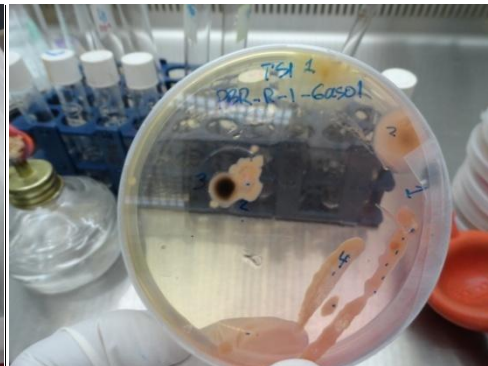
Tabla No5. Colonias seleccionadas para transportación

No	CÓDIGO	Tipo	Apariencia
1	TSI--R-1.G	Hongos	Blanco filamentoso (1)
			Crema filamentoso (2)
			Verde (3)
		Bacteria	Blanquecina fusiforme
2	TSI-R-2-D	Bacteria	Blanco lechosa, globular
3	TSI-R-1-G-1	Bacteria	Blanquecina mucosa, brillante
4	TSI-1-G-2	Hongo	Blanco filamentoso, redondeado
5	TSI-R-3-B-1	Bacteria	Blanco, lechoso, mucoso, brillante
6	TSI-R-3-B-2	Bacteria	Blanco rosáceo
7	AN-PIN-DIR	Bacteria	Blanco crema
8	PDA-PIN-DIR	Bacteria	Blanco amarillento
9	PDA-3-B-1	Bacteria	Violeta, redonda, pegajosa
10	PDA-3-B-2	Bacteria	Blanco, lechoso
11	PDA-R-2-DIR	Bacteria	Blanco lechoso
12	TSI-3-B-2	Bacteria	Amarillenta
13	TSI-TESTIGO	Bacteria	Blanco, lechoso

Fuente: Dr. Miguel Gualoto



Materiales listos para su transporte



Colonias seleccionadas

¹ Henry H. Tabak, Rakesh Govind, Chunsheng Fu, and Chao Gao. 2001. Protocol for Determining Bioavailability and Biodegradation Kinetics of Organic Soil Pollutants in Soil Systems to Enhance Bioremediation of Polluted Soil Sites. Cap. 17.

Las muestras de suelos experimentales a ser transportadas y analizadas en cuanto a su concentración de hidrocarburos son:

1. PBR-1-G
2. PBR-R-1-G
3. PBR-2-D
4. PBR-R-2-D
5. PBR-3-B
6. PBR-R-3-B
7. PBR-TESTIGO

9.- TRABAJOS PENDIENTES RELACIONADOS CON EL PROYECTO

En vista de que la presente investigación es de Biotecnología aplicada, la tarea inmediata es la transferencia de los resultados preliminares de laboratorio al campo, a través de un proyecto de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de concentración conocida; por esto una vez concluida la expedición, en el Ecuador se ejecutarán trabajos de biorremediación in situ, en zonas de montaña cercanas a la ciudad de Ibarra (sede de la Universidad Técnica del Norte), en las inmediaciones al nevado Cayambe (5400 metros de altura).

Las pruebas se realizarán en terrarios, así como en lechos de compostaje. Al efecto se construirán las facilidades para la biorremediación, tales como:

- Bermas perimetrales.
- Fosa perimetral.
- Impermeabilización de la base.
- Bodega de materiales e insumos.

Un componente fundamental para la ejecución de estas pruebas es, la generación de un manual de bioseguridad para los trabajos de laboratorio y campo, que garanticen la seguridad del personal, equipos, instalaciones y ambiente.

Esta pruebas estimamos terminarlas a finales de junio del presente año y sus resultados publicarlos en las Jornadas Antárticas organizadas por el INAE.

Se concluirá con la identificación definitiva de los microorganismos aislados, tanto morfológica, bioquímica y molecular. Esperamos obtener la caracterización completa hasta finales de este año.

Terminada la fase antártica, inician los trabajos de Hibridación microbiana que se realizarán en el Ecuador, en los laboratorios de la UTN y de otros centros de investigación nacionales e internacionales, en especial los trabajos de Biología molecular. El objetivo final de estos trabajos, es obtener cepas microbianas híbridas “andino-antárticas”, para la biorremediación a gran escala de espacios contaminados de la serranía ecuatoriana. Esta etapa requerirá al menos dos años de trabajo a partir de Noviembre del 2013.

10.- CONCLUSIONES.

- a) **Viabilidad microbiana.-** Una de las tareas de esta fase de la investigación, era verificar la presencia de microorganismos (sobrevivencia) en las celdas experimentales; para el efecto se emplearon los mismos medios de cultivo empleados en el aislamiento in situ realizado la Misión anterior, a saber agar nutritivo, PDA y TSI. La tabla No6, nos muestra el lnN de cada celda experimental

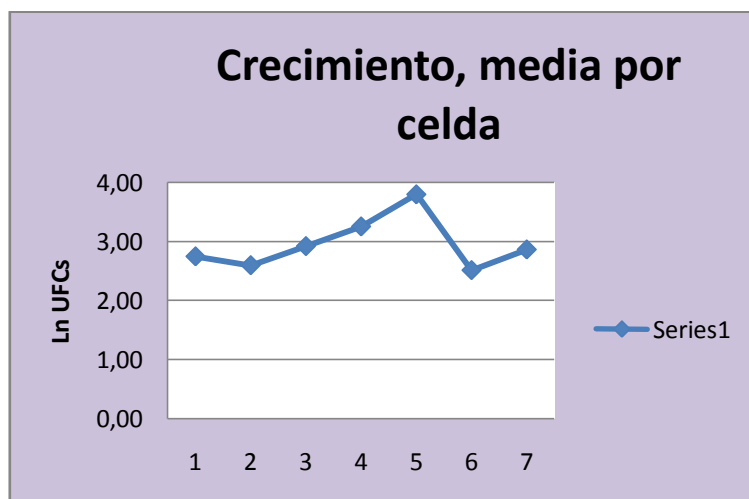
Tabla No6. ln N de las celdas experimentales

No	CELDA	MEDIO			Suma	Media
		AN(lnN)	PDA(lnN)	TSI(lnN)		
1	PBR-1-G	3,46	2,48	2,30	8,24	2,75
	PBR-R-1-G	2,39	2,70	2,70	7,79	2,60
2	PBR-2-D	3,63	2,83	2,30	8,76	2,92
	PBR-R-2-D	3,09	3,78	2,89	9,76	3,25
3	PBR-3-B	4,21	3,85	3,33	11,39	3,80
	PBR-R-3-B	0,00	4,55	2,99	7,54	2,51
4	TESTIGO	2,56	3,55	2,48	8,59	2,86
Suma		19,34	23,74	18,99		
Media		2,76	3,39	2,71		

Fuente: Dr. Miguel Gualoto

Para la elaboración de las gráficas, se empleó el ln de N, para obtener curvas más consecuentes con el proceso.

La celda experimental que presenta mayor abundancia es PBR-3-B, seguida por PBR-R-2-D.

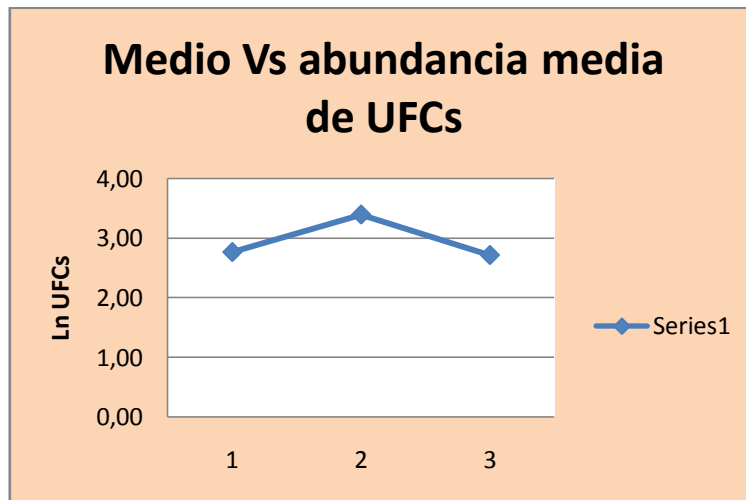


Fuente: Dr. Miguel Gualoto

La celda PBR-3-B, corresponde al Benceno; esto podría significar que existe una buena tasa de degradación de este hidrocarburo aromático, aunque habrá que esperar para su confirmación, cuando se efectúen los análisis de concentración de benceno en un laboratorio independiente certificado del Ecuador.

Tratándose del benceno, se debe considerar también la tasa de volatilización natural de este hidrocarburo, que representa aproximadamente un 15%; factor a considerar en la toma y transportación de las muestras hasta Ecuador.

De los tres medios empleados, PDA presenta le promedio de UFCs, más alto. Dato que confirma los resultados obtenidos en la misión anterior para siembras directas en placa.²



Fuente: Dr. Miguel Gualoto

El medio que mayor diversidad de géneros produjo es TSI con 6, en tanto que AN y PDA produjeron dos cada una.



Fuente: Dr. Miguel Gualoto

² Gualoto Miguel. Informe de Campo. XVI Misión Antártica. 2012, p.9

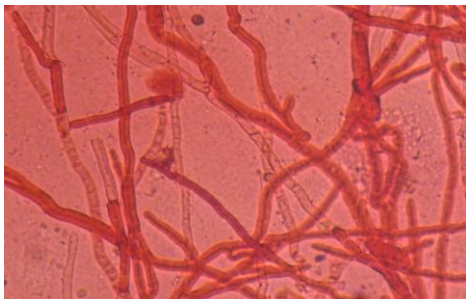
La presencia de microorganismos en todas las celdas experimentales, muestra que la concentración empleada de hidrocarburos: 15000ppm de TPHs y 5000 de aromáticos HAPs, no inhibió su crecimiento y sobrevivencia. Para confirmar si se trata de las mismas cepas inyectadas, debemos esperar para compararlas con las cepas almacenadas en Ecuador.

Por otro lado es necesario aclarar que durante los trabajos de extracción de las celdas experimentales se pudo observar un espejo iridiscente característico de hidrocarburos, en el agua derretida sobre algunas celdas, algo que no se observó en la celda experimental del benceno y la celda testigo. En las dos primeras celdas se pudo evidenciar un olor a hidrocarburo.

Considerando las condiciones extremas de temperatura y el metabolismo reducido de los microorganismos, esperábamos que el olor a hidrocarburo aún se mantenga; en todo caso, solo los análisis de concentración de los hidrocarburos remanentes en los suelos de las celdas experimentales, confirmarán si se produjo o no un proceso de biorremediación.

Múltiples trabajos e investigación, señalan un amplio grupo de bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos a bajas temperaturas, así el estudio de Biorremediación de hidrocarburos empleando cepas antárticas realizado en Ecuador (Gualoto,2011), muestra dicha capacidad en especies como *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus sp.*, *Clostridium perfringens* y *Sphingomonas sp.*, **esperamos que en el conjunto de bacterias aisladas para esta fase de la investigación encontrar al menos una de estas cepas.**

La presencia de hongos en la celda de benceno (hidrocarburo aromático) es considerada como un aspecto positivo, por cuanto estos son buenos degradadores de aromáticos (Fernando & Aust, 1994). Varios estudios (Reddy, 1995), muestran que el benzo[α] pireno, benzo [α] antraceno y pireno son degradados directamente por *P. chrysosporium*, hasta quinona. El fenantreno es degradado hasta 14 CO, por enzimas no lignolíticas de *P. chrysosporium*, (Sutherland *et al.*, 1991; Dhawale, Dhawale & Dean-Ross, 1992; Hammel *et al.*, 1992; Sutherland, 1992).



Hongo detectado en la celda TSI-PBR-3-B

Tabla No7. Bacterias sicrotolerantes degradadoras de hidrocarburos, aisladas de suelos árticos y antárticos. Todas estas bacterias han sido identificadas hasta el nivel de género mediante la secuenciación y análisis de ARNr 16S.³

Antarctic		
<i>Rhodococcus</i> 5/1, 5/14 and 7/1	JP8 jet fuel, C ₆ -C ₂₀ n-alkanes, pristane	Bej <i>et al.</i> 2000
<i>Pseudomonas</i> Ant 5	JP8 jet fuel, naphthalene, 2-methyl-naphthalene	Aislabie <i>et al.</i> 2000
<i>Pseudomonas</i> Ant 9	JP8 jet fuel, p-xylene, 1,2,4-trimethyl-benzene, naphthalene, 1 and 2-methyl-naphthalene	Aislabie <i>et al.</i> 2000
<i>Pseudomonas</i> 7/22	JP8 jet fuel, toluene, m- and p-xylene, 1,2,4-trimethyl-benzene	Aislabie <i>et al.</i> 2000
<i>Pseudomonas</i> 30-3	JP8 jet fuel, C ₈ -C ₁₃ n-alkanes, toluene, m- and p-xylene, 1,2,4-trimethyl-benzene	Panicker <i>et al.</i> 2002
<i>Pseudomonas stutzeri</i> 5A	JP8 jet fuel, benzene, toluene, m-xylene	Eckford <i>et al.</i> 2002
<i>Pseudomonas</i> 5B	JP8 jet fuel, hexane	Eckford <i>et al.</i> 2002
<i>Sphingomonas</i> Ant 17	JP8 jet fuel, m-xylene, naphthalene, 1 and 2-methyl-naphthalene, dimethyl-naphthalene, 2 ethyl-naphthalene, fluorene, and phenanthrene	Aislabie <i>et al.</i> 2000 Baraniecki <i>et al.</i> 2002
<i>Sphingomonas</i> Ant 20	JP8 jet fuel, 1-methyl-naphthalene, and phenanthrene	Aislabie <i>et al.</i> 2000

Es necesario señalar, que entre los microorganismos introducidos en las celdas experimentales, **no se inoculó cepa fúngica alguna**. Su presencia se debe probablemente a la germinación de esporas del ambiente que se depositaron en las celdas experimentales.

Varias fuentes describen la capacidad de algunos géneros y especies fúngicas, para degradar HAPs: *Phanerochaete laevis* (Bogan & Lamar, 1996), *Corioloopsis gallica* (Pickard *et al.*, 1999), *Trametes versicolor* (Johannes&Majcherczyk, 2000), *Bjerkandera* sp.(Kotterman, Rietberg & Field, 1998). *Aspergillum niger*, *Penicillum chrysogenum* (Gualoto, 2011)

La biomasa fúngica ha sido incrementada en suelos contaminados con hidrocarburos en relación a su control, tanto en suelo ártico (Sexstone and Atlas 1977), como antártico (Aislabie *et al.* 2001), en dichos suelos los hongos

³ Dennis M. Filler. Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Cold Regions. Cambridge University Press. 2008. p, 72.

Phialophora spp. y *Hormoconis resinae*, son dominantes y tienen la capacidad para degradar hidrocarburos (Kerry 1990; Aislabie *et al.* 2001).

11. RECOMENDACIONES

La prueba de biorremediación in situ, mediante terrarios, sin un proceso de bioestimulación, que provea de nutrientes adicionales que los microorganismos necesitan para su metabolismo; enfrenta serio problemas de realizarse, con eficiencia y en un tiempo aceptable, que reduzca los costos de su ejecución. Numerosos estudios reportan que la biorremediación de suelos de las regiones frías, contaminados con hidrocarburos, puede ser incrementada mediante la adición de nitrógeno, fósforo o ambos nutrientes (Walworth and Reynolds 1995; Braddock *et al.* 1997; Walworth *et al.* 1997; Braddock *et al.* 1999; Mohn and Stewart 2000; Mohn *et al.* 2001; Ferguson *et al.* 2003a).

En virtud de esto, **creemos necesario la implementación de un experimento de biorremediación que incluya la bioestimulación, en especial de fuentes orgánicas de nitrógeno y fósforo**, tal como lo afirman varios estudios de biorremediación realizados en zonas frías (Hoyle *et al.* 1995, Lewis *et al.* 1986; Ferguson *et al.* 2003a, Braddock *et al.* 1997; Braddock *et al.* 1999).

Similares recomendaciones de hacen en proyectos de remediación ejecutados en zonas templadas y tropicales.⁴

Ampliar los estudios de investigación para otra gama de contaminantes producidos en las operaciones de las Estaciones científicas antárticas, tales como: PCBs, metales pesados, derivados de hidrocarburos, etc.

Finalmente consideramos que es vital para la Estación Científica Pedro Vicente Maldonado, el disponer de una herramienta biotecnológica segura y eficiente para eliminar los problemas de contaminación ambiental que su operación genera y con ello ser un modelo de gestión digno de imitar por otras estaciones científicas antárticas.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Aislabie, J., Fraser, R., Duncan, S. y Farrell, R.L., 2001. Effect of oil spills on microbial heterotrophs in Antarctic soils. *Polar Biology*, 24, 308-313.
2. Lapage S. P., Shelton J. E., Mitchell T. G, Mackenzie A. R. Culture collections and the preservation of bacteria, p. 135—228. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), *Methods in microbiology*, vol. 3A, Academic Press, London, 1970.
3. Dennis M. Filler., 2008. *Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Cold Regions*. Cambridge University Press, 154-158.
4. Asim K. Bej., Jackie Aislabie. 2010. *Polar microbiology: The ecology, biodiversity, and bioremediation potential of microorganisms in extremely cold environments*. CRC Press. 231-238.

⁴ Gualoto Miguel, Biorremediación de lodos industriales hidrocarbúrficos. 2007. El Coca. Informe de consultoría para Weatherford Ecuador.

5. Gualoto Miguel. 2011. Biorremediación de hidrocarburos con bacterias antárticas. IAEN, Ecuador en la Antártida, Historia perspectivas y proyecciones.
6. Margesin Rosa. 2009. Permafrost soil. Springer. 279- 284.
7. Coe A. W., Clark S. P. Mon. Bull. Min. Health Public Health Lab. Serv., 25, 97—100 (1966).
8. Margesin Rosa. 2008. Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology. Springer.,83-89, 394-395.
9. Caroli S., Cescom P.2001. Environmental Contamination in Antarctica, a Challenge to Analytical Chemistry. Elsevier. 33-45.
10. Ajay Singh, Ramesh C. Kuhad, Owen P. Ward. 2009. Advances in Applied Bioremediation. Springer. 123-126.
11. Margesin Rosa, Schinner Franz. Manual for Soil Analysis – Monitoring and Assessing Soil Bioremediation. Springer. 134- 137.
12. Gadd G.M. 2001. Fungi in Bioremediation. Cambridge University Press. 136-145.

13. Fecha: Maldonado, **31** de enero del 2013