

R Medina *, J Pessacq, J Rosso, I Morelli, M.T. Del Panno.
CINDEFI (CONICET-UNLP) Calle 50 y 115, (1900) La Plata, Argentina.
*rociomedinalp@gmail.com

Introducción

El conocimiento del rol de los organismos indígenas en suelos contaminados es esencial para el desarrollo y aplicación de tecnologías de biorremediación exitosas. Las zonas petroquímicas de la provincia de Buenos Aires son un buen ejemplo de suelos expuestos crónicamente a hidrocarburos. Existen diferentes opiniones sobre si la contaminación con hidrocarburos reduce la diversidad microbiana conllevando a la pérdida de resiliencia de las comunidades microbianas del suelo. La resiliencia definida como capacidad de recuperación de la comunidad microbiana del suelo luego de un disturbio, fue evaluada sobre un suelo crónicamente contaminado y sometido a estrés ácido.

Objetivo

Evaluar la resiliencia de la diversidad catabólica (SIR) y la diversidad metabólica funcional (CLPP), así como el impacto en la población cultivable, de un suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos frente a estrés ácido, en dos niveles.

Materiales y Métodos

MICROCOSMOS: Se prepararon 9 microcosmos de 200 gr de suelo crónicamente contaminado (Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos -PAH: 200 mg kg⁻¹). Tres fueron sometidos a pH 5 y tres a pH 4 con HCl 10%. Como control se reservaron tres microcosmos a los que no se modificó el pH original del suelo. La capacidad de retención de agua de los sistemas se ajustó al 70% durante todo el ensayo.

DETERMINACIONES POST ESTRÉS: 15 días después de aplicado el estrés ácido se midieron la actividad deshidrogenasa, densidad de población bacteriana heterótrofa (R2 agar), degradadora de PAH (NMP) y las variables pH, conductividad (CE) y potencial redox (Eh).

EL PERFIL FISIOLÓGICO DE LA COMUNIDAD (CLPP) fue determinado en cada microcosmo mediante la siembra de una dilución apropiada de una suspensión de tierra, en las policubetas de BIOLOG EcoPlate® (31 sustratos).

La **DIVERSIDAD CATABÓLICA** se midió a través de la producción de CO₂ inducida por cada uno de 10 sustratos incorporados a una suspensión de suelo (0.5%) en agua, contenida en viales de 25ml. Luego de 4 horas de incubación el CO₂ producido se midió por CG (Clarus 500, equipado con una columna Carboxen 1010 y detector de conductividad térmica).

ESTRES ACIDO: mediante el agregado de HCl 10% se ajusto el pH del suelo a valores de pH5 y pH4, Figura 1.

Resultados y Discusión

EFFECTO DEL ESTRÉS ACIDO SOBRE LAS POBLACIONES CULTIVABLES, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y PARÁMETROS ABIÓTICOS, LUEGO DE 15 DÍAS.

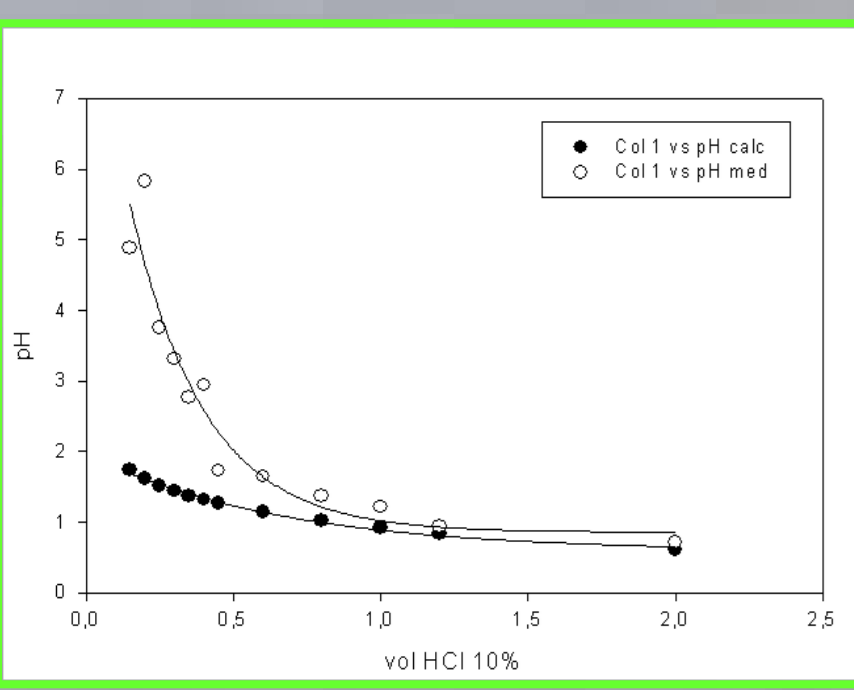


Figura 1: Curva de calibración de pH para la acidificación de los microcosmos. Medida del pH del suelo en respuesta al agregado de distintos volúmenes de HCl 10%.

Microcosmo	R2 (UFC/g s)	NMP/g s	Deshidrogenasa (µgTPF/g s)	pH	CE (mS/cm)	Eh (mV)
Suelo Contaminado (SC)	4,87.10 ⁶ (0,24) ???a	6,08.10 ⁴ (1,83.10 ⁴)a	No Detec	9,05 (0,01)	135,86 (42,06) a	158,56 (3,40) a
SC pH 5	1,45.10 ⁶ (0,40) ??? b	1,65.10 ⁴ (9,56.10 ³) b	No Detec	7,27 (0,20)	1192 (297,42) b	208,87 (7,17) b
SC pH 4	1,35.10 ⁶ (0,03) ??? c	6,48.10 ³ (2,43.10 ³) b	4,01 (2,59)	7,51 (0,30)	1659 (823,88) b	198,33 (6,42) b
Suelo Pristino	2,02.10 ⁸	9,23.10 ³	31,13 (4,7)	5,92	Necesito un valor de referencia!	319,10

Respuesta del suelo contaminado al estrés ácido:
Incremento del pH durante los 15d de incubación, sin llegar al valor original.
Aumento significativo del potencial redox (Eh) y de la conductividad eléctrica (CE).
No se observan diferencias significativas en la actividad deshidrogenasa respecto del suelo sin acidificar.
Disminución significativa de poblaciones bacterianas heterótrofas y degradadoras de PAH.

EFFECTO DEL ESTRÉS ACIDO SOBRE EL PERFIL FISIOLÓGICO DE LA COMUNIDAD

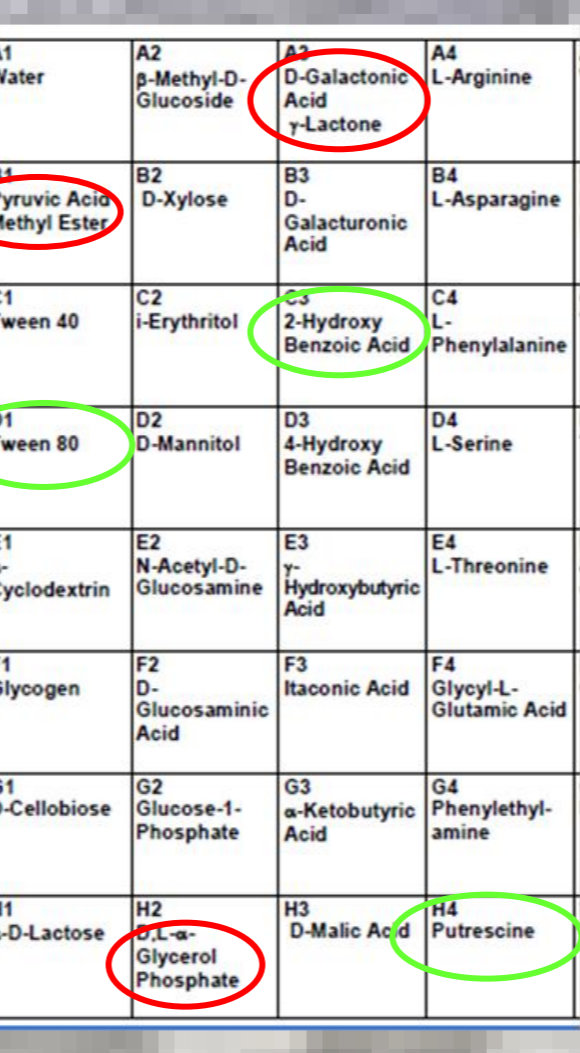
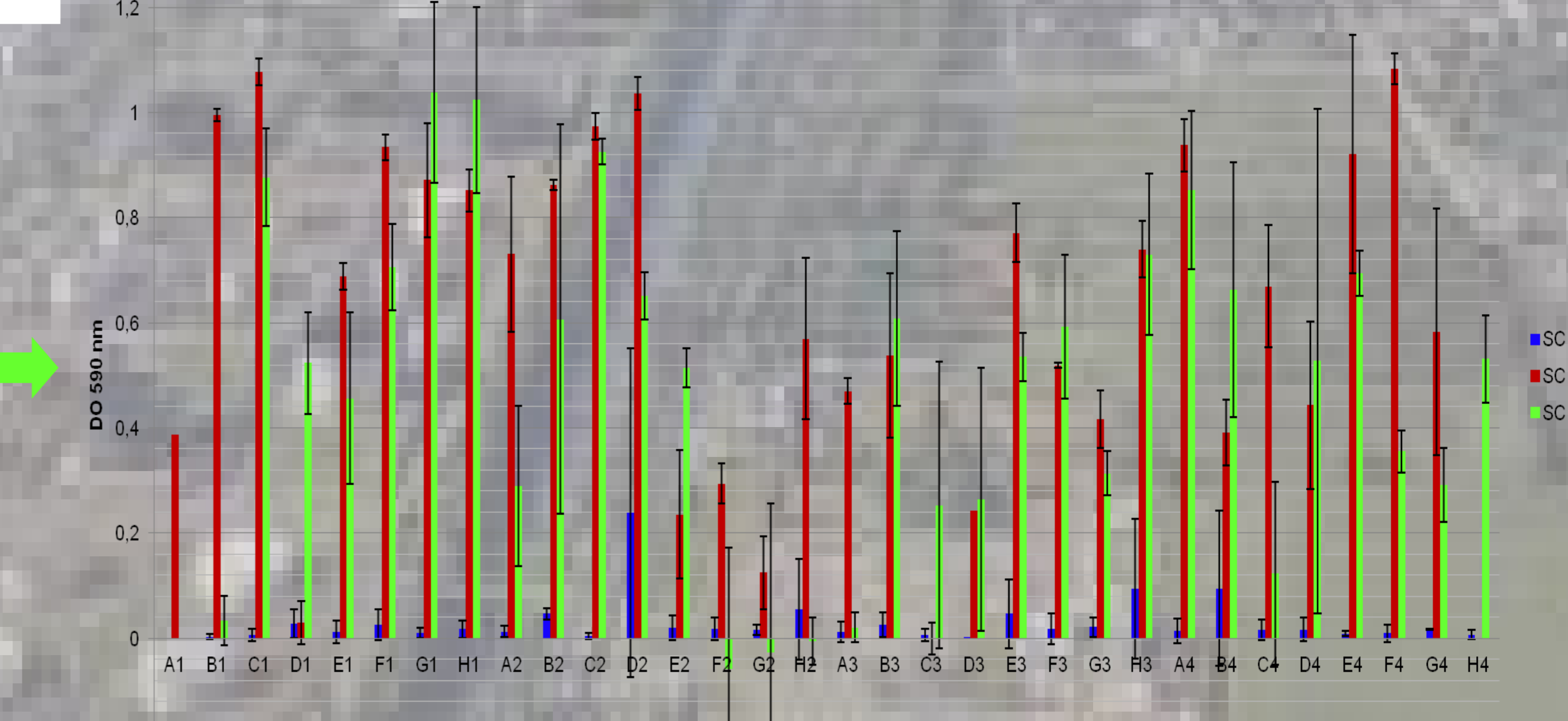
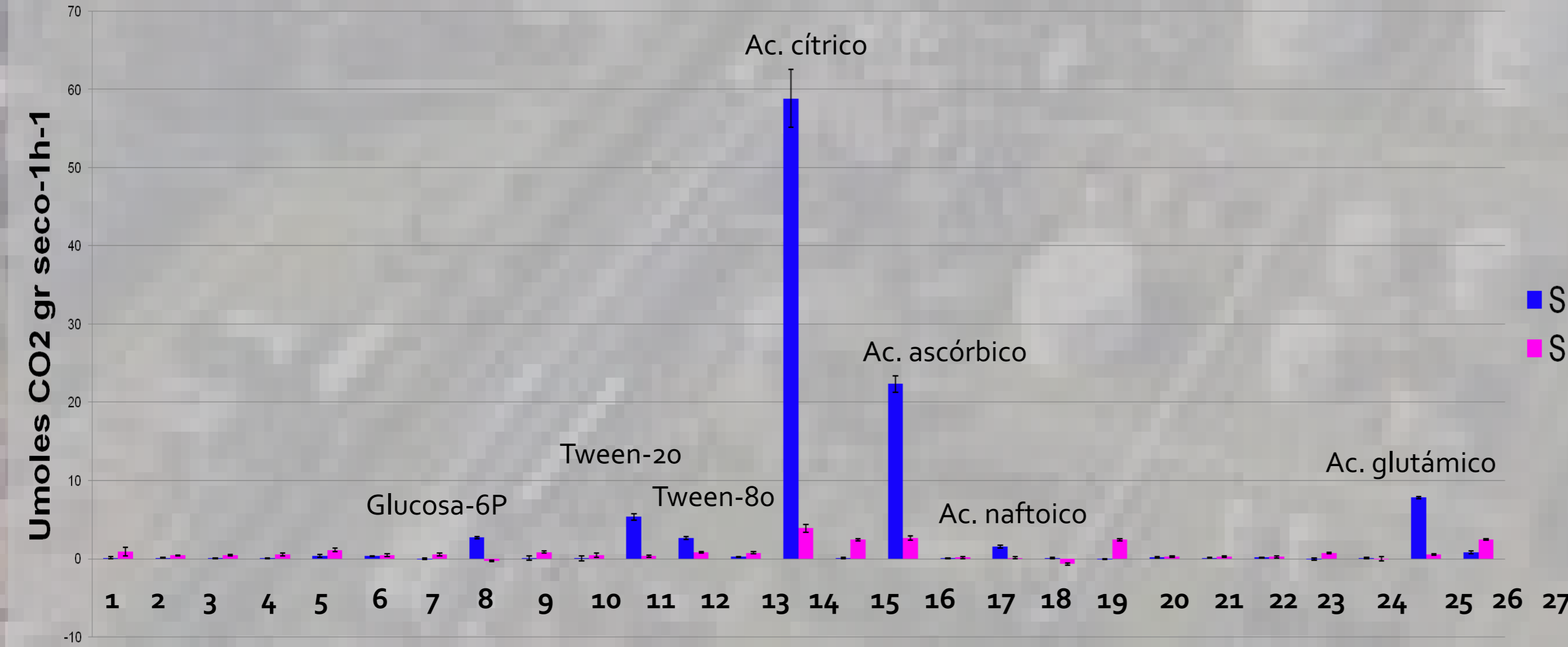
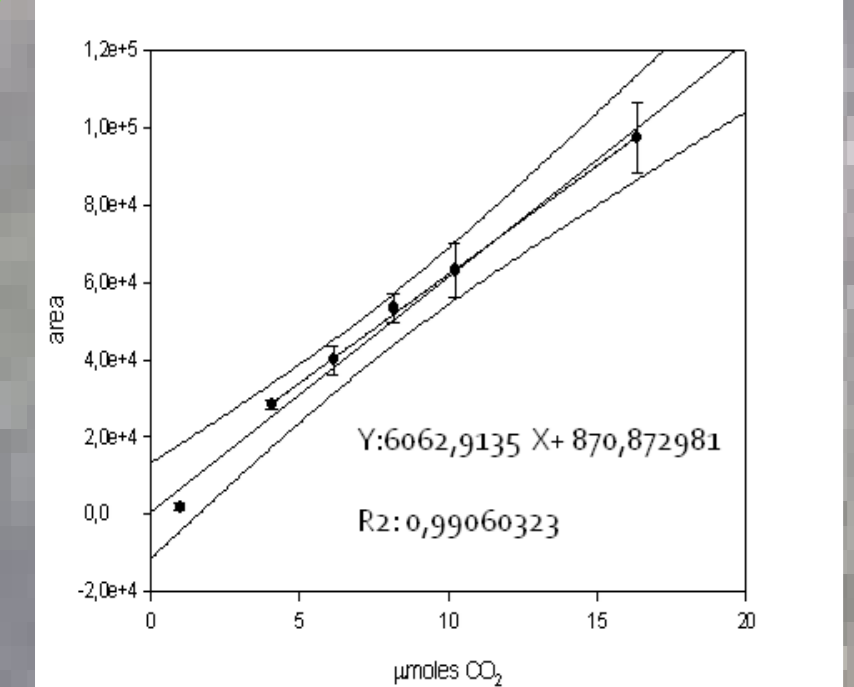


Figura 2: Curva de calibración para la medida de CO₂. Se determinó el área correspondiente a cantidades conocidas de CO₂.



Respuesta del suelo contaminado al estrés ácido: Diversidad Funcional
Luego del estrés ácido (pH5 y/o pH4), se detecta una significativa respuesta metabólica sobre la mayoría de los sustratos testeados, respecto al control. La respuesta fue diferencial, dependiente del pH, en el caso de los sustratos indicados con círculos.

DIVERSIDAD CATABÓLICA (RESPUESTA INDUCIDA POR SUSTRATO-SIR) Suelo Contaminado vs. Suelo Pristino



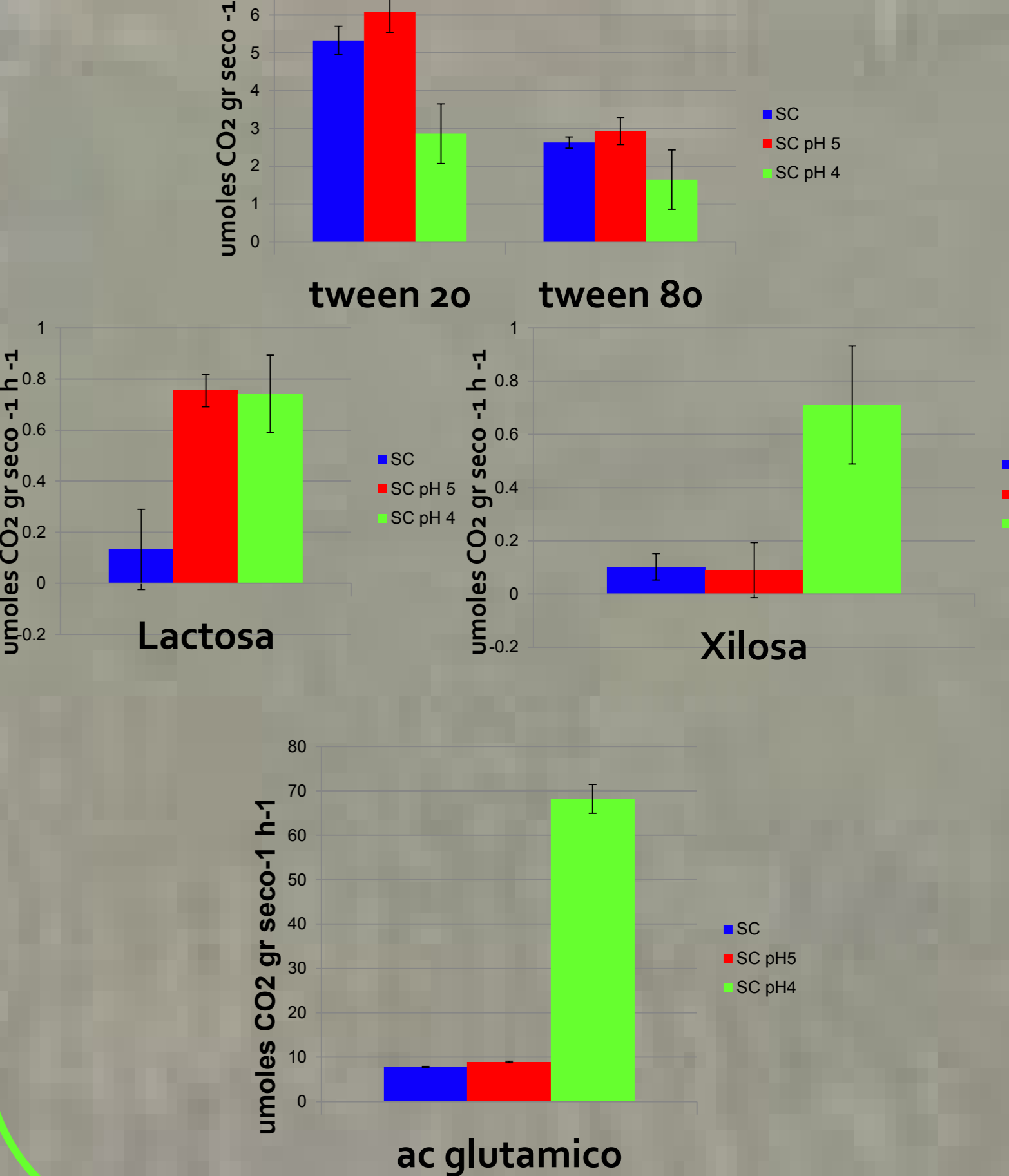
Sustratos empleados en el ensayo:
Carbohidratos (100mM): 1- Glucosa, 2- Xilosa⁽¹⁾, 3- Manitol⁽²⁾, 4- Adonitol, 5- Celobiosina⁽¹⁾, 6- Lactosa⁽¹⁾, 7- Fructosa, 8- Glucosa 6 fosfato.
Polímeros (100 mM): 11- Tween 20⁽²⁾, 12- Tween 80⁽²⁾, 13- Dextrina, 28- Almidón⁽¹⁾.
Intermediarios y vitaminas (10 mM): 9- Piruvato de sodio, 10- Glicerol 3 fosfato, 14- Ac cítrico⁽¹⁾, 15- Succinato de sodio, 16- Acido ascórbico.
Hidrocarburos (100 ppm): 17- Tetracosano, 18- Acido naftoico, 19- Fenantreno, 20- Fluoreno.
Aminoácidos (10 mM): 21- Arginina, 22- Tirosina, 23- Glicina, 24- N acetil glucosamina⁽¹⁾, 25- Taurina, 26- Acido glutámico⁽¹⁾, 27- Fenilalanina.
⁽¹⁾ Sustratos evaluados post estrés ácido.

Tabla: Sustratos evaluados en SC, post estrés ácido.

Sustrato	SC	SC-pH5	SC-pH4
Xilosa (2)	0,10 (0,05) a	0,09 (0,10) a	0,71 (0,22) b
Manitol (3)	0,05 (0,06) a	0,04 (0,14) a	0,08 (0,16) a
Celobiosina (5)	0,35 (0,18) a	0,19 (0,32) a	0,40 (0,25) a
Lactosa (6)	0,23 (0,15) a	0,75 (0,06) b	0,74 (0,15) b
Tween 20 (11)	5,33 (0,37) a	6,08 (0,55) a	2,96 (0,78) b
Tween 80 (12)	2,63 (0,15) a	2,93 (0,36) a	1,64 (0,41) b
Almidón (28)	3,39 (0,26) a	3,07 (0,42) a	2,66 (0,95) a
Ac. Cítrico (14)	200,91 (36,47) a	242,5 (14,9) a	246,22 (30,98) a
N acetilglucosamina (24)	-0,07 (0,13) a	0,04 (0,26) a	0,03 (0,29) a
Ac. Glutámico (26)	7,79 (0,12) a	8,93 (0,15) a	68,18 (3,24) b

Efecto del estrés ácido sobre la diversidad Catabólica (Respuesta Inducida por Sustrato-SIR) del Suelo Contaminado

En base al perfil fisiológico (CLPP) post estrés y al perfil catabólico (previo al estrés) se seleccionaron 10 sustratos para evaluar la diversidad catabólica post estrés de los sistemas (indicados con ⁽¹⁾ en el listado). En los gráficos se muestran los sustratos que mostraron diferencias significativas respecto al microcosmo control.



Diversidad Catabólica del Suelo Contaminado

Respuesta de SC al estrés ácido: Diversidad Catabólica
El estrés ácido no produjo cambios significativos en la mineralización de 5 de los 10 sustratos, estimulo la mineralización de acido glutámico, xilosa y lactosa respecto al control. No se observan cambios significativos con el estrés a pH 5 en el caso de Tween 80, pero si un descenso en la mineralización de este sustrato en el estrés a pH 4 respecto del control. Por otro lado, la mineralización de Tween 20 descendió notablemente en el estrés a pH 4.

Conclusiones

La originalmente reducida capacidad metabólica del suelo contaminado puede ser atribuida al proceso de adaptación producido por el primer disturbio, contaminación, dejando en el suelo una comunidad altamente seleccionada, degradadora de PAH.

El efecto de un segundo disturbio, acidificación, produjo diferentes patrones de resiliencia (estimulación, inhibición o sin cambio). La estimulación de la diversidad funcional, y la parcial estimulación de la capacidad mineralizante son indicadores de la potencialidad del suelo contaminado, recuperada por el efecto de la acidez. Ciertas poblaciones de la comunidad del suelo contaminado habrían estado preservadas en estado de latencia, y luego de la acidificación habrían recuperado su potencial metabólico, probablemente por cambios generados en la matriz del suelo debido al cambio de pH.