

Empleo del método de determinación de biomasa microbiana por fumigación–extracción para el estudio en suelos del altiplano boliviano contaminados por hidrocarburos

Use of microbial biomass determination method by fumigation–extraction for research in Bolivian Altiplano tableland hydrocarbon contaminated soils

Francisco Fontúrbel R.^{1[1]} & Darío Achá C.^{2[2]}

Resumen

Los hidrocarburos son sustancias de composición variable que tienen diversos efectos tóxicos sobre los ecosistemas edáficos. Los microorganismos son fuertemente afectados por estas sustancias y eso repercute en la abundancia total. Dicha abundancia puede ser expresada en términos de biomasa microbiana, que puede ser determinada por el método de fumigación–extracción. Se evaluó el método de fumigación–extracción para el estudio de suelos altiplánicos contaminados con hidrocarburos, y se determinó que el citado método es apropiado para este tipo de estudios.

Palabras clave: Suelo, hidrocarburo, contaminación, biomasa microbiana, altiplano boliviano.

Abstract

Hydrocarbons are variable substances that produce diverse toxic effects over soil ecosystems. Microorganisms are widely affected by hydrocarbons, and this situation influences total microbial abundance. This abundance could be expressed with microbial biomass, that could be determined by fumigation–extraction method. We evaluate fumigation–extraction method for research on altiplano contaminated–soils, and we determinate that this method is appropriate for this kind of study.

Key words: Soil, hydrocarbon, contamination, microbial biomass, Bolivian Altiplano tableland.

Introducción

Los hidrocarburos y sus derivados son sustancias de alto peso molecular, mayormente insolubles en agua, que resultan muy tóxicas para los organismos vivos. La mayoría de los microorganismos del suelo no pueden crecer en presencia de hidrocarburos y mueren. Entre estos microorganismos afectados están varios de importancia ecológica, como las bacterias fijadoras de nitrógeno.

^{1[1]} E–mail: fonturbel@mbotanica.zzn.com, Dirección postal: P.O. Box # 180, La Paz –Bolivia

^{2[2]} E–mail: daaco@entelnet.bo, Dirección postal: P.O. Box # 9756, La Paz –Bolivia

^{1,2} Website: <http://www.mbotanica.ft.st>

Los efectos tóxicos sobre los microorganismos se pueden evaluar mediante parámetros como la biomasa microbiana total, ya que la muerte masiva de microorganismos provocará un descenso en dicha biomasa. Sin embargo, en casi todos los ambientes del planeta existen –aunque en muy baja cantidad– microorganismos (entre bacterias y hongos) capaces de degradar los hidrocarburos a formas menos tóxicas al emplearlos como fuente de carbono (Parrish et al. 1999) y esta es una de las posibles causas de incremento de la biomasa microbiana luego de un tiempo de exposición al contaminante.

El método de fumigación–extracción se basa en la retención del carbono microbiano del suelo mediante la exposición a una atmósfera de cloroformo, para posteriormente extraer este carbono mediante una solución de sulfato de potasio, y realizar la medición mediante reacciones bioquímicas con dicromato de potasio.

En el presente estudio se pretende evaluar el método de fumigación–extracción en el estudio de suelos contaminados por hidrocarburos, para determinar si el citado método es aplicable a dicho tipo de estudios.

Metodología

Sitio y protocolo de muestreo. Las muestras de suelo fueron tomadas en la localidad del altiplano boliviano, cerca de la localidad de Chúa, a orillas del lago Titikaka (Fig. 1), cuyas coordenadas son 0525972 / 8210582 a 3845 msnm. Se escogió este sitio para el muestreo, puesto que en época húmeda existen pequeñas vertientes naturales en la que se encuentran restos de hidrocarburos, y por ello se presume que en este sitio existe una mayor cantidad de microorganismos resistentes y / o degradadores de hidrocarburos. La muestra fue tomada el 20 de mayo de 2000.



Se realizó un muestreo de capa arable como se describe en Totsche (1995). Se tomó una muestra de dos kilogramos en una bolsa plástica y se retornó a La Paz para proceder con los análisis de laboratorio. Se procedió a cernir la muestra con una malla de 2mm para separar restos vegetales, piedras de menor tamaño y otras impurezas. Luego de este proceso se recuperó un 75% de la muestra inicial. Todos los ensayos posteriores se realizaron con esta tierra cernida.

Fig. 1: Sitio de toma de muestra.

Determinación de biomasa microbiana. Para la determinación de la biomasa microbiana total de las muestras se empleó el método de fumigación–extracción para suelos descrito por Jenkinson & Powlson

(1976) y Tate et al. (1988).

Diseño del experimento. Se tomó un dato inicial de biomasa del suelo sin contaminación. Posteriormente se prepararon tres recipientes a los que se agregaron 10, 15 y 25 ml de aceite de motor por cada 100g de suelo. Se dejó incubar por una semana y se tomaron dos mediciones de biomasa durante dos semanas.

Resultados

Se realizaron 3 fumigaciones-extracciones. Las variables en estas fueron la concentración de aceite y el tiempo de exposición. En la primera se midió la cantidad de carbono en las muestras sin aceite y se realizó un blanco de calibración. En la segunda se midió la cantidad de carbono de las muestras con 10, 15 y 25 ml de aceite por cada 100g, luego de una semana de incubación. En la tercera se midieron los mismos parámetros luego de dos semanas de incubación. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Lectura de fumigación-extracción

Muestra	Vol. FeSO ₄	meq C/ Kg	Diferencia en meq C/ Kg
Blanco	7,00		
Testigo SF	5,10	17,8125	
Testigo F1	4,70	21,5625	3,750
Testigo F2	4,90	19,6875	1,875
M10-1 SF	4,70	21,5625	
M10-1 F	1,90	47,8125	26,250
M15-1 SF	3,90	29,0625	
M15-1 F	2,70	40,3125	11,250
M25-1 SF	3,40	33,7500	
M25-1 F	2,80	39,3750	5,625
M10-2 SF	4,90	48,4375	
M10-2 F	0,90	110,9375	62,500
M15-2 SF	7,40	9,3750	
M15-2 F	3,80	65,6250	56,250
M25-2 SF	6,80	18,7500	
M25-2 F	4,60	53,1250	34,375

Los resultados de la tabla 1 fueron analizados gráficamente, representados en las figuras 2 a 7. La figura 2 muestra la variación de la cantidad de titulante en el tiempo. Nótese que la cantidad de titulante es inversamente proporcional a la biomasa microbiana.

La figuras 3 y 4 muestran la variación de biomasa microbiana en función a la cantidad de aceite aplicado sobre las muestras de suelo, para la primera y segunda semana (luego de la incubación) respectivamente. En las figuras 5 y 6 se muestra la extrapolación de la biomasa microbiana para concentraciones de aceite de 20, 30 y 50 ml/100g.

La figura 7 resume las figuras 3 y 4, mostrando la diferencia de biomasa microbiana entre semanas en función a las diferentes concentraciones de aceite empleadas.

Discusiones

No se presentaron problemas para el empleo de suelo tamizado y tratado con diferentes concentraciones de hidrocarburos, puesto que la presencia del contaminante no obstaculizó los procesos de fumigación y extracción. Los suelos contaminados reaccionaron de igual manera que los no contaminados ante el proceso de extracción de carbono, y por consiguiente, al análisis de reacción con dicromato de potasio realizado para la determinación indirecta de la biomasa.

Los resultados obtenidos muestran el cambio de biomasa en el tiempo, en función a las diferentes concentraciones de contaminante empleadas. En las muestras con 10 y 25 ml de contaminante por cada 100g de suelo, se observó una constante disminución de la biomasa, atribuibles a los efectos tóxicos de los contaminantes, mientras que la muestra con 15 ml/100g mostró un incremento de la biomasa a la segunda semana de lectura de biomasa.

Este aumento es atribuible a la presencia de microorganismos resistentes y /o degradadores de hidrocarburos en el suelo (Fontúrbel en prensa [a]), los cuales respondieron óptimamente a la citada concentración de aceite, la cual no fue ni insuficiente como fuente de carbono ni demasiado tóxica para inhibir el crecimiento de estos organismos.

La posibilidad de la existencia de microorganismos resistentes y /o degradadores de hidrocarburos en los suelos fueron confirmadas por estudios complementarios (Achá en prensa, Fontúrbel en prensa [a], Fontúrbel en prensa [b]), y se demostró que el suelo del punto de muestreo descrito en el presente artículo posee importantes cepas capaces de crecer con hidrocarburos (en parte debido a las condiciones naturales del sitio, que tiene una exposición permanente a pequeñas vertientes de hidrocarburos), y algunas de ellas incluso son capaces de degradar los hidrocarburos si se les provee de medios de cultivo específicos (Achá en prensa, Fontúrbel en prensa [a]).

Si bien el método de fumigación–extracción es aplicable a estos casos, los mencionados estudios complementarios realizados en el mismo sitio de muestreo han mostrado que los análisis de biomasa microbiana deben ser complementados con otro tipo de análisis, como ser análisis de diversidad microbiana (Achá en prensa) o ensayos de actividad enzimática (Fontúrbel en prensa [b]) que ayudan a eliminar subjetividades de interpretación en las lecturas de biomasa total, ya que algunas veces los cambios fuertes se producen a nivel de diversidad y no así de abundancia.

Por lo tanto, el método es útil como indicador para suelos contaminados por hidrocarburos, pero es conveniente respaldar la información obtenida con otro tipo de análisis de abundancia parcial o de diversidad. Es por ello que también es necesario complementar los estudios al hacer extrapolaciones a diferentes concentraciones de hidrocarburos, ya que no necesariamente los valores de biomasa tendrán un comportamiento determinado, puesto que este parámetro está afectado por otras variables como ser humedad, temperatura o luminosidad.

Conclusiones

Se vio que el método de fumigación–extracción, para cuantificación de biomasa microbiana total, puede ser fácilmente empleado para estudios de suelos contaminados con hidrocarburos, obteniéndose buenos resultados.

La aplicación del método frente a diferentes concentraciones del contaminante abre las posibilidades de emplearlo como indicador de contaminación ambiental, siempre que los resultados se combinen con otro tipo de estudios enzimáticos y /o de diversidad.

Referencias

Achá, D. en prensa. Efecto de los hidrocarburos sobre la diversidad de microorganismos en suelos altiplánicos y detección de microorganismos degradadores de hidrocarburos. Trabajo presentado en el II Congreso Boliviano de la Ciencia del Suelo, Cochabamba, 20p.

Brown, J. 1994. Oil Spill in a Test Tube,
http://www.accessexcellence.org/AE/AEC/AEF/1994/brown_oil.html

Fontúrbel, F. en prensa [a]. Determinación de la presencia de agentes biológicos resistentes y degradadores de hidrocarburos en el suelo mediante técnicas fisicoquímicas. Trabajo presentado en el II Congreso Boliviano de la Ciencia del Suelo. Revista Boliviana de Ecología y

Conservación Ambiental, Cochabamba.

Fontúrbel, F. en prensa [b]. Efectos de la contaminación por hidrocarburos sobre parámetros microbiológicos y bioquímicos del suelo. Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental, Cochabamba.

Parrish P., J. Clark & R. Prince. 1999. *Alaska Oil Spill Bioremediation Monitoring Program: An update*. USEPA, NHEERL, Gulf Ecology Division, 1 Sabine Island Drive, Gulf Breeze, FL 32561. <http://www.epa.gov/ged/publica/c1756.htm>

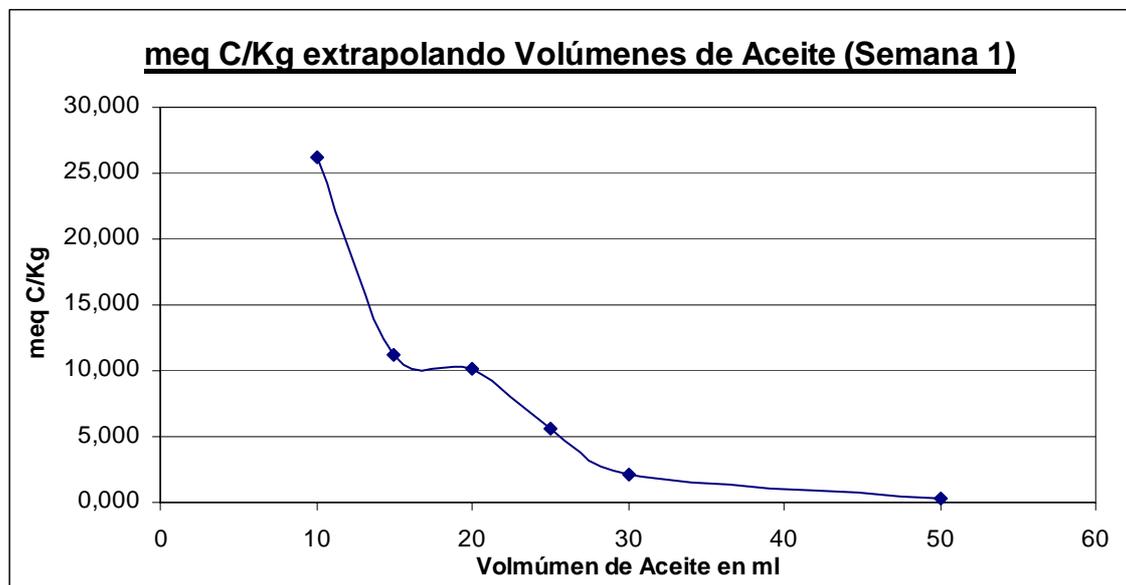
Jenkinson, D. & S. Powlson. 1976. *The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-I. Fumigation with chloroform*. Soil Biol. Biochem. Vol. 8, pp 167–177.

Tate, K., D. Ross & C. Feltham. 1988. *A direct extraction method to estimate soil microbial C: effects of experimental variables and some different calibration procedures*. Soil Biol. Biochem. Vol. 20, pp 329–335.

Totsche, K.. 1995. *Quality – project design – spatial sampling*. En Alef & Nannipieri, 1995 (eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press, Londres, p 12.

Agradecimientos

A Lic. Cristina Ruiz, Lic. Isabel Morales, Ing. Jaime Chincheros y a Sergio Colque por el invaluable apoyo técnico y científico. A la Unidad de Suelos del Instituto de Ecología (Universidad Mayor de San Andrés) por respaldar esta investigación.



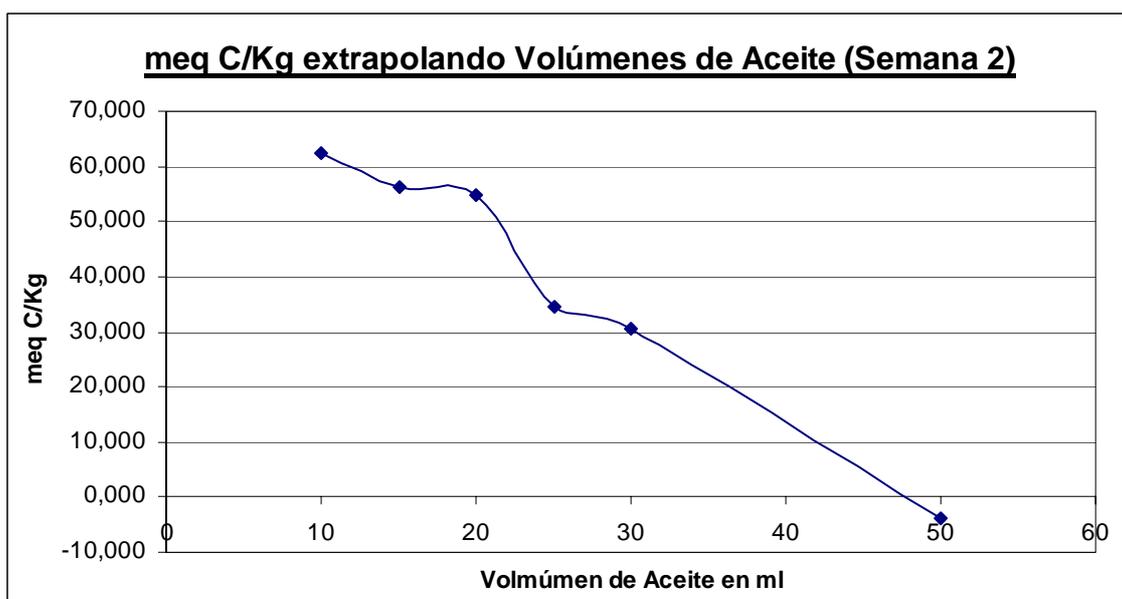


Fig. 6: Volumen de aceite aplicado extrapolando concentraciones de 20, 30 y 50 ml/100g en función a los miliequivalentes de carbono por Kg de muestra para la segunda semana.

Discusiones

No se presentaron problemas para el empleo de suelo tamizado y tratado con diferentes concentraciones de hidrocarburos, puesto que la presencia del contaminante no obstaculizó los procesos de fumigación y extracción. Los suelos contaminados reaccionaron de igual manera que los no contaminados ante el proceso de extracción de carbono, y por consiguiente, al análisis de reacción con dicromato de potasio realizado para la determinación indirecta de la biomasa.

Los resultados obtenidos muestran el cambio de biomasa en el tiempo, en función a las diferentes concentraciones de contaminante empleadas. En las muestras con 10 y 25 ml de contaminante por cada 100g de suelo, se observó una constante disminución de la biomasa, atribuibles a los efectos tóxicos de los contaminantes, mientras que la muestra con 15 ml/100g mostró un incremento de la biomasa a la segunda semana de lectura de biomasa.

Este aumento es atribuible a la presencia de microorganismos resistentes y /o degradadores de hidrocarburos en el suelo (Fontúrbel en prensa [a]), los cuales respondieron óptimamente a la citada concentración de aceite, la cual no fue ni insuficiente como fuente de carbono ni demasiado tóxica para inhibir el crecimiento de estos organismos.

La posibilidad de la existencia de microorganismos resistentes y /o degradadores de hidrocarburos en los suelos fueron confirmadas por estudios complementarios (Achá en prensa, Fontúrbel en prensa [a], Fontúrbel en prensa [b]), y se demostró que el suelo del punto de muestreo descrito en el presente artículo posee importantes cepas capaces de crecer con hidrocarburos (en parte debido a las condiciones naturales del sitio, que tiene una exposición permanente a pequeñas vertientes de hidrocarburos), y algunas de ellas incluso son capaces de degradar los hidrocarburos si se les provee de medios de cultivo específicos (Achá en prensa, Fontúrbel en prensa [a]).

Si bien el método de fumigación–extracción es aplicable a estos casos, los mencionados estudios complementarios realizados en el mismo sitio de muestreo han mostrado que los análisis de biomasa microbiana deben ser complementados con otro tipo de análisis, como ser análisis de diversidad microbiana (Achá en prensa) o ensayos de actividad enzimática (Fontúrbel en prensa [b]) que ayudan a eliminar subjetividades de interpretación en las lecturas de biomasa total, ya que algunas veces los cambios fuertes se producen a nivel de diversidad y no así de abundancia.

Por lo tanto, el método es útil como indicador para suelos contaminados por hidrocarburos, pero es conveniente respaldar la información obtenida con otro tipo de análisis de abundancia parcial o de diversidad. Es por ello que también es necesario complementar los estudios al hacer extrapolaciones a diferentes concentraciones de hidrocarburos, ya que no necesariamente los valores de biomasa tendrán un comportamiento determinado, puesto que este parámetro está afectado por otras variables como ser humedad, temperatura o luminosidad.

Conclusiones

Se vio que el método de fumigación-extracción, para cuantificación de biomasa microbiana total, puede ser fácilmente empleado para estudios de suelos contaminados con hidrocarburos, obteniéndose buenos resultados.

La aplicación del método frente a diferentes concentraciones del contaminante abre las posibilidades de emplearlo como indicador de contaminación ambiental, siempre que los resultados se combinen con otro tipo de estudios enzimáticos y /o de diversidad.

Referencias

Achá, D. en prensa. Efecto de los hidrocarburos sobre la diversidad de microorganismos en suelos altioplánicos y detección de microorganismos degradadores de hidrocarburos. Trabajo presentado en el II Congreso Boliviano de la Ciencia del Suelo, Cochabamba, 20p.

Brown, J. 1994. Oil Spill in a Test Tube,
http://www.accessexcellence.org/AE/AEC/AEF/1994/brown_oil.html

Fontúrbel, F. en prensa [a]. Determinación de la presencia de agentes biológicos resistentes y degradadores de hidrocarburos en el suelo mediante técnicas fisicoquímicas. Trabajo presentado en el II Congreso Boliviano de la Ciencia del Suelo. Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental, Cochabamba.

Fontúrbel, F. en prensa [b]. Efectos de la contaminación por hidrocarburos sobre parámetros microbiológicos y bioquímicos del suelo. Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental, Cochabamba.

Parrish P., J. Clark & R. Prince. 1999. *Alaska Oil Spill Bioremediation Monitoring Program: An update*. USEPA, NHEERL, Gulf Ecology Division, 1 Sabine Island Drive, Gulf Breeze, FL 32561. <http://www.epa.gov/ged/publica/c1756.htm>

Jenkinson, D. & S. Powlson. 1976. *The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-I. Fumigation with chloroform*. Soil Biol. Biochem. Vol. 8, pp 167-177.

Tate, K., D. Ross & C. Feltham. 1988. *A direct extraction method to estimate soil microbial C: effects of experimental variables and some different calibration procedures*. Soil Biol. Biochem. Vol. 20, pp 329-335.

Totsche, K.. 1995. *Quality – project design – spatial sampling*. En Alef & Nannipieri, 1995 (eds.) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press, Londres, p 12.

Agradecimientos

A Lic. Cristina Ruiz, Lic. Isabel Morales, Ing. Jaime Chincheros y a Sergio Colque por el invaluable apoyo técnico y científico. A la Unidad de Suelos del Instituto de Ecología (Universidad Mayor de San Andrés) por respaldar esta investigación.