

BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE ESTACIONES DE SERVICIO Y LAVADEROS INDUSTRIALES POR LA CEPA OHP-AL-GP

Oscar Héctor Pucci, Graciela Natalia Pucci

CEIMA

Facultad de Ciencias Naturales

Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Introducción

Los barros contaminados con diversas fracciones destiladas de petróleo provenientes de estaciones de servicio durante muchos años se los disponía en basurales u otros lugares sin tratamiento previo. En la ciudad de Comodoro Rivadavia, se han extremado esos controles, debido a que en esas instalaciones o en los llamados lavaderos industriales se acondicionan y lavan equipos de la industria petrolera. El grado de contaminación que producen es muy variable así como la composición, en la que entran naftas, gasoil, kerosene, aceites lubricantes y grasas cada uno de ellos con una composición muy compleja (Speight 1991). La disminución de estos contaminantes y el destino de esos barros a áreas de uso industrial o forestal es una posibilidad cierta.

Entre los derivados destilados del petróleo el aceite lubricante se caracteriza por tener una composición de hidrocarburos con cadenas de 25 y hasta 40 átomos de carbono incluyendo hidrocarburos alifáticos aromáticos y poliaromáticos como el naftaleno y fenantreno y también hidrocarburos mixtos aromáticos y parafínicos (Speight 1991)

En trabajos anteriores se han discutido las posibilidades de los métodos de biorremediación en suelos semi-áridos de la patagonia (Pucci et al 1998, Pucci et al 2000, Riss et al 2002)

En este trabajo aisló una cepa de buena capacidad de biodegradación y su aplicación a la mineralización y saneamiento de barros contaminados con petróleo provenientes de estaciones de servicio, previo a su disposición final.

Materiales y Métodos

Origen y obtención de la cepa:

El aislamiento de la cepa se efectuó a partir de un suelo donde se trabajaba un minilandfarming donde se procesaban desechos de hidrocarburos de diferentes procedencias en una planta distante a 400 km de Comodoro Rivadavia. Para el enriquecimiento de bacterias degradadoras se utilizó un medio desarrollado por el grupo: Cl Na 5 g, PO_4HK_2 0,5 g, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{NH}_4$ 0,5g, $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 1 g, SO_4Mg 0.2 g, NO_3K 1 g, Agua dest.c.s 1000 ml, con el agregado de las vitaminas B1 10 mgr, B6 10mgr y B12 1mgr y de solución de oligoelementos 20 ml por litro de una solución esteril de $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ 1,500 g, ZnCl_2 68,00mg, $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ 100,00 mg, H_3BO_3 62 mg, $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 120 mg, $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2$ 17 mg, $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 24 mg, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ 24 mg, HCl , 0,05 molar 1000 ml. Se distribuyó a razón de 100 ml por frasco de 500 ml de capacidad y se agregaron 10 gr de

suelo y por último 200 microlitros de aceite lubricante como única fuente de carbono y energía. Se incubó en agitador rotatorio a 150 rpm, 28°C durante 15 días. Al finalizar los mismos se traspasó 1 ml de la suspensión a 10 ml del mismo medio, se agregaron 20 microlitros de aceite lubricante, incubándose igual que el primer paso. Esto se repitió dos veces y por último se efectuó un aislamiento en el mismo medio sólido con petróleo gasoil expandido. (Pucci GN y Pucci OP Revista de la Asociación Argentina de Microbiología, en prensa)

Biodegradabilidad de hidrocarburos aromáticos y alifáticos

Se determinó por cromatografía gaseosa (HP-6890-columna HP 1) a cuatro tiempos (inicial, a los 5, 10 y 20 días) utilizándose frasco de 30ml con 10 ml de medio de cultivo, 1 ml de inóculo (de absorbancia 0,5 a 700nm en cubeta de 1 cm de paso de luz) y 25 microlitros de un testigo preparado con gasoil, pristano, naftaleno y fenantreno. Para cada determinación se efectuó un duplicado. La extracción se efectuó durante 10 minutos con 2 ml hexano grado cromatográfico, en un agitador alternativo diseñado en el grupo.

Muestra de un lavadero industrial,

La muestra se componía de 16 submuestras de 3 Kgr cada una que se redujeron por cuarteos sucesivos a una de aproximadamente cinco kilogramos a partir de la que se prepararon los biorreactores sólidos.

Extracción y cromatografía de hidrocarburos de la muestra.

La extracción de hidrocarburos, a partir de los suelos contaminados, se efectuó por soxhlet, utilizando como solvente cloroformo, durante un período de 24 hs. La separación de las fracciones se realizó en columna de silicagel, eluyendo con hexano, benceno y cloroformo-metanol (1:1), separándose en fracciones de 25 ml en frascos de 30 ml. Se recupero el solvente y se seleccionaron los 2 frascos de cada fracción que contenían la mayor cantidad de hidrocarburos.

Estudio bacteriológico de suelo.

Se realizaron recuentos por diseminación en superficie. Para recuentos de hongos se utilizó agar Sabouraud. Recuento de bacterias aerobias totales se utilizó medio R₂A. Para el recuento de bacterias degradadoras se utilizó un medio desarrollado por el grupo descripta más arriba.

Estudio de la cinética de mineralización de hidrocarburos

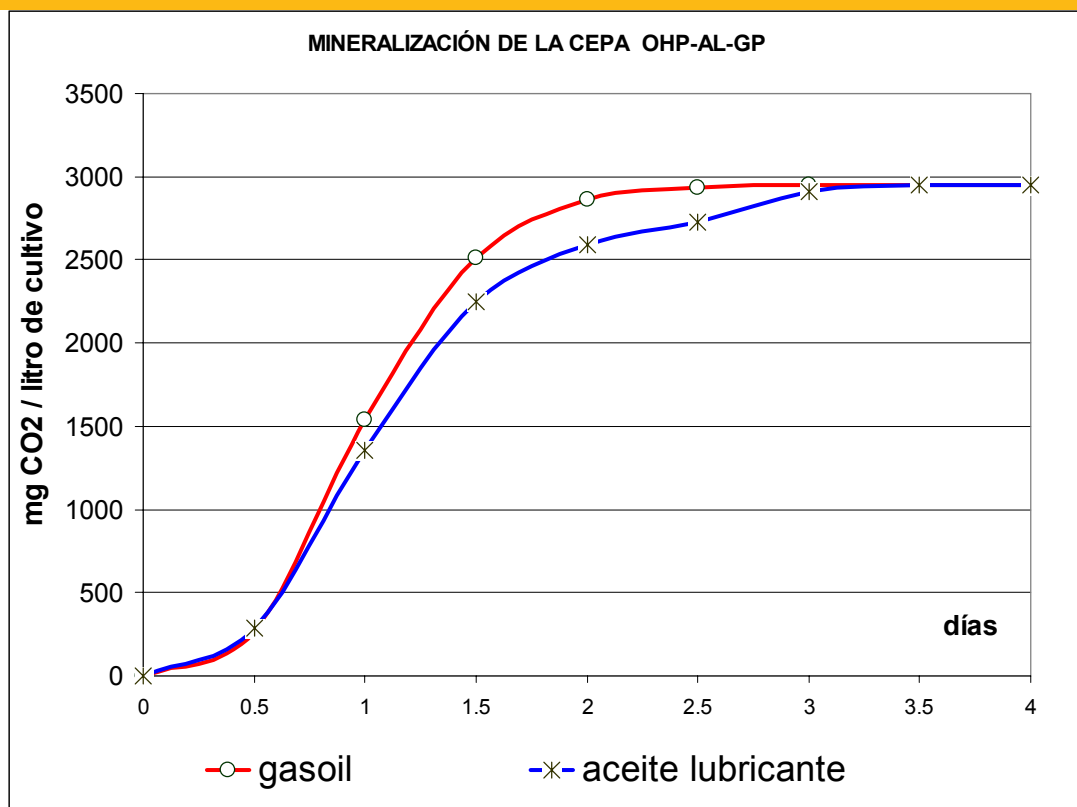
La cinética de degradación se efectuó midiendo el dióxido de carbono producido en un biorreactor en fase sólida que contenía 100 gr de suelo con el agregado de nutrientes nitrógeno y fósforo para llegar a una relación C:N:P igual a 100:5:1. Se prepararon cuatro variantes por duplicado que correspondían a suelo con nutrientes y humedad, suelo inhibido, suelo con nutrientes, y suelo con nutrientes, humedad e inoculación de cepa OHP-AL-GP. la mineralizaciones se determinaron dos veces por semana. Y se graficaron los promedios.

RESULTADOS

Cinética de mineralización de aceite lubricante y gasoil

En la figura 1 se grafican las mineralizaciones de gasoil y aceite lubricante, que a pesar de la diferencia de composición, presentan cinéticas casi iguales, no ocurre lo mismo con otros hidrocarburos (cinéticas no mostradas)

Figura 1 Mineralización de gasoil y aceite lubricante por la cepa OHP-AL-GP



Biodegradabilidad de hidrocarburos aromáticos y alifáticos.

Se presentan los datos en las figuras 2 a, b, c, d que corresponden a las cromatografías a testigo inicial, b a los 5 días, c a los 10 días y d a los 20 días de incubación.

Figura 2a.

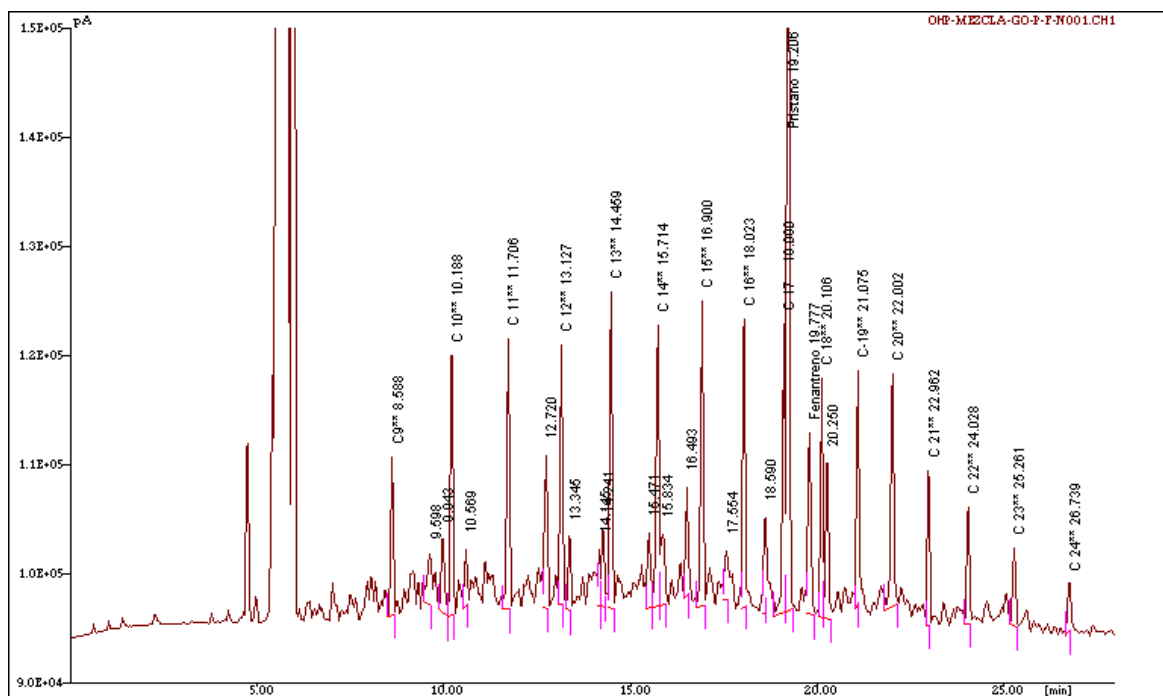


Figura 2 b.

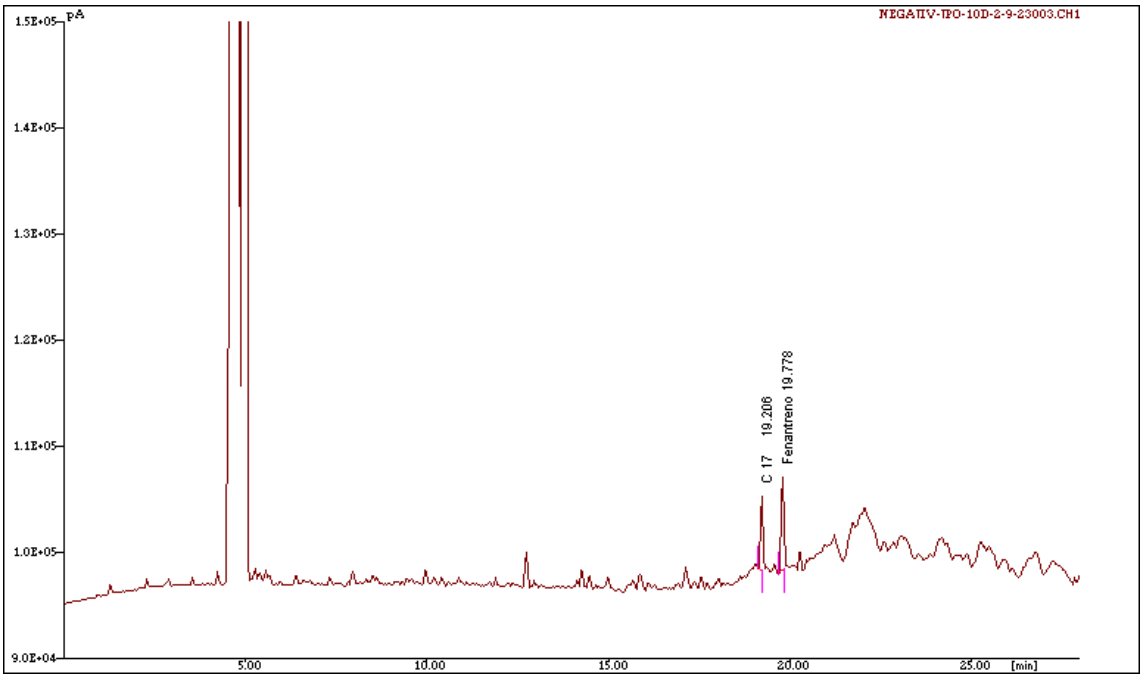


Figura 2 c.

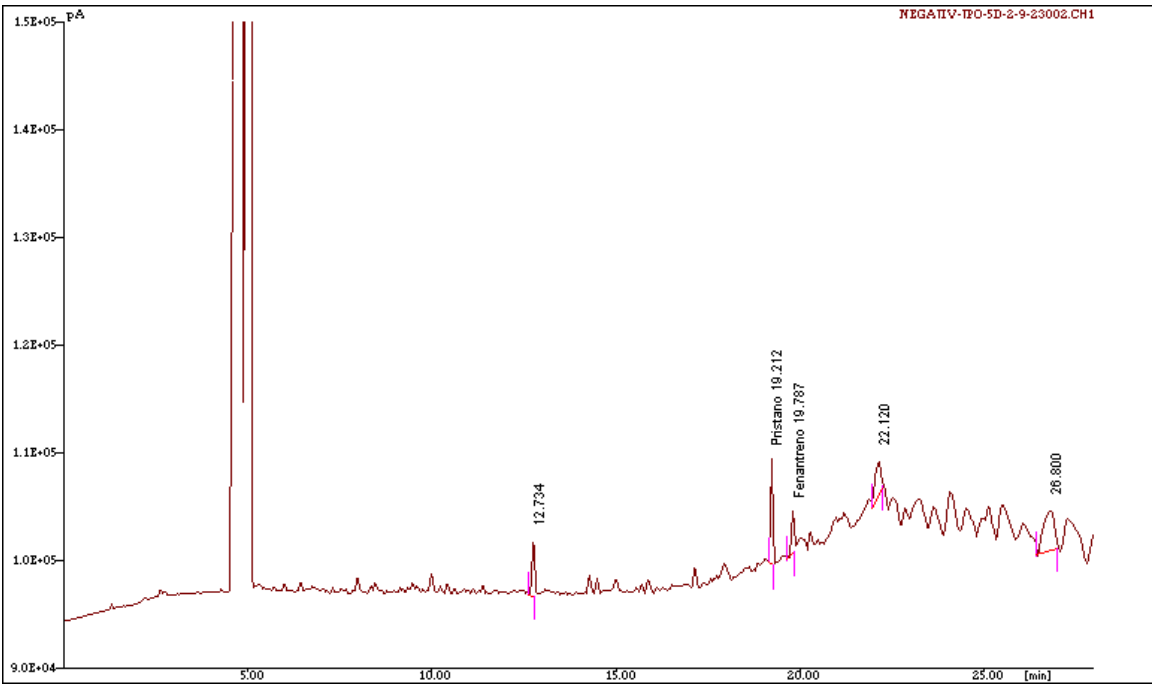
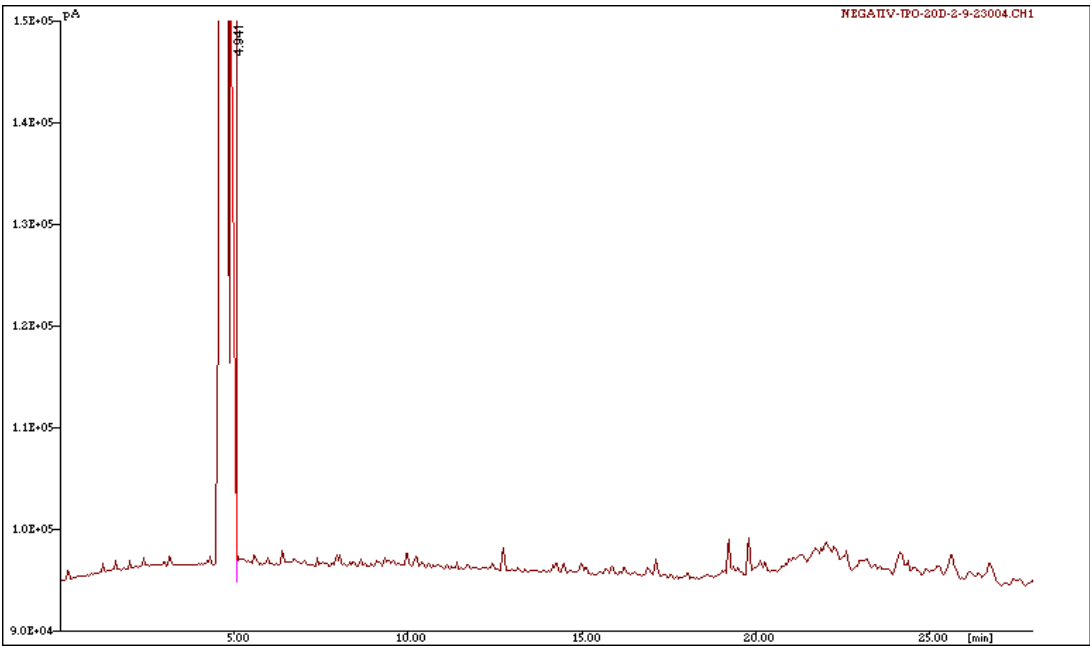


Figura 2 d.



La cepa OHP-AL-GP fue caracterizada por su perfil de metil esteres de ácidos grasos como correspondiente al grupo de Rhodococcus. Su perfil de biodegradación de hidrocarburos muestra que tiene un muy buen desarrollo en aceite lubricante y gasoil un buen desarrollo en pentadecano y hexadecano y pristano, un buen desarrollo en n-octano y kerosene y un desarrollo pobre o disgónico en fenol, pentano, hexano y heptano, debemos notar que estos últimos 4 hidrocarburos tiene en general un poder toxico muy grande para las membranas biológicas. No desarrollo utilizando como única fuente de energía y carbono con los siguientes hidrocarburos: nafta, ciclohexano, ciclohexanona, benceno, tolueno, xileno, naftaleno, antraceno, fenantreno, benzoato y m-toluato. Este perfil de biodegradación es coincidente con el género Rhodococcus.

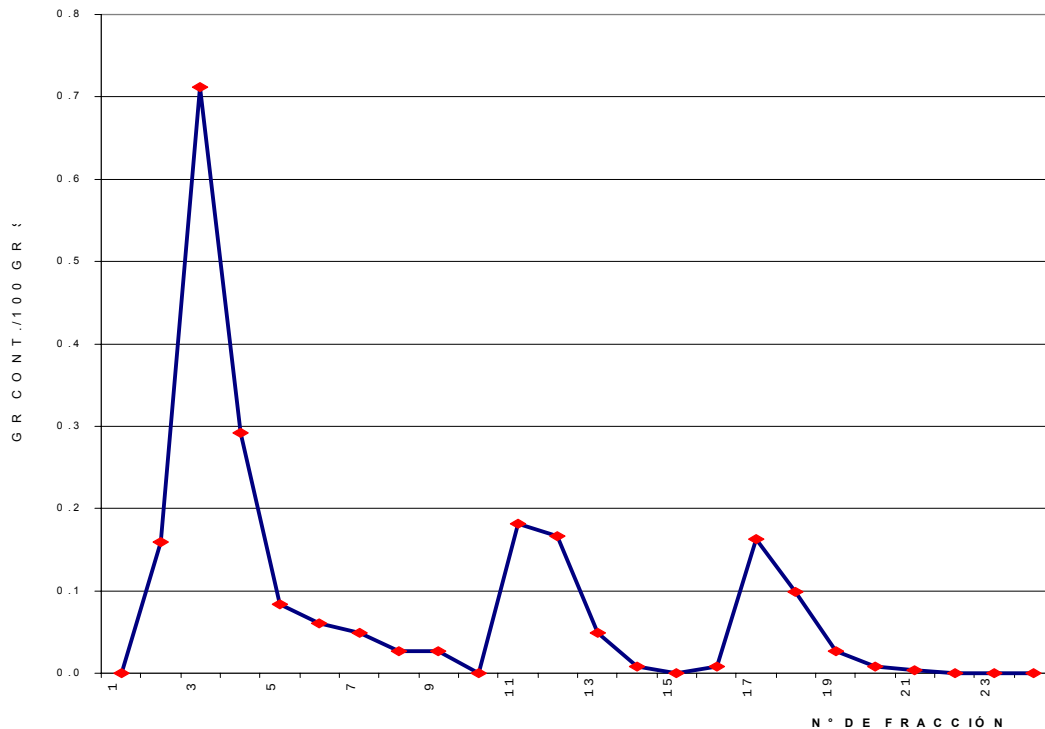
Existe una aparente contradicción, que no es tal, entre los resultados de las determinaciones cromatográficas en que elimina la totalidad de los hidrocarburos presentes en biorreactores líquidos incluyendo los aromáticos y el perfil de biodegradación, pero se debe tener en cuenta que el primero es una mezcla compleja y que posibilita el cometabolismo de hidrocarburos más recalcitrantes. Mientas que en el segundo ensayo se utilizan hidrocarburos puros por lo que no existe la posibilidad de ese proceso.

BIOCEGRADACIÓN DE BARROS

Hidrocarburos:

El análisis por cromatografía en columna de los hidrocarburos presentes indicó los siguientes porcentajes alifáticos 75% aromáticos 18,6% polares y asfálténicos 6,4% esta composición es apta para el tratamiento biológico, por el bajo contenido en compuestos polares, que son los que presentan mayor recalcitrancia. La cromatografía en columna se presenta en la figura 3.

Figura 3 Composición del contaminante hidrocarbonado de barros de lavadero industrial. Su contenido en hidrocarburos alifáticos es de 75% de aromáticos 18,6% y de polares y asfaltenos del 6,4%



Análisis Microbiológico:

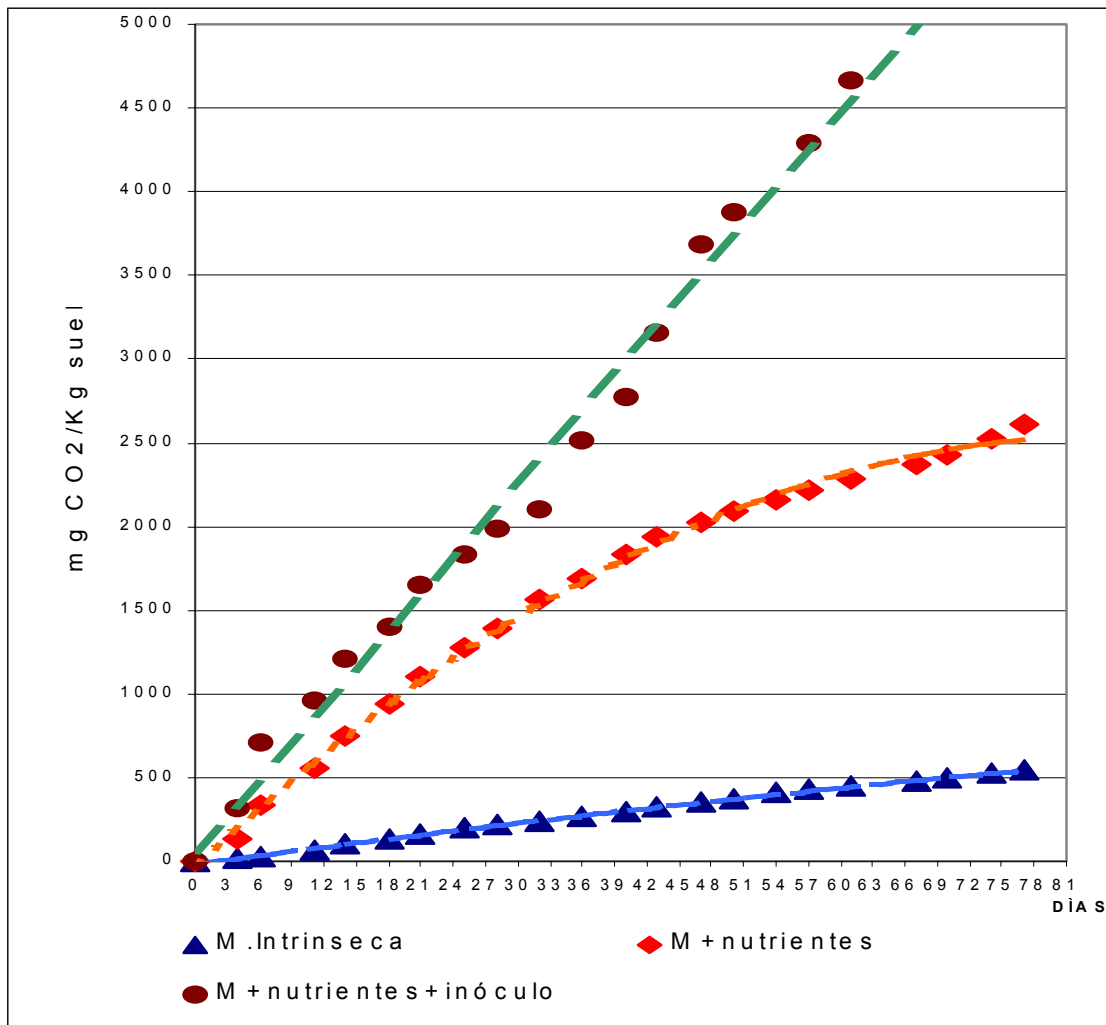
Los recuentos bacterianos fueron 10^6 para bacterias aerobias que desarrollan en R₂A y de $4,5 \cdot 10^4$ para bacterias que desarrollan en medio mineral suplementado con oligoelementos, vitaminas y petróleo-gasol. En medio sabuoraud el desarrollo fue solo de aspergillus y penicillium, que no tuvieron significado en biodegradación de compuestos aromáticos o polares (datos no mostrados).

Estudio de la cinética de biodegradación de los hidrocarburos:

En la figura 4 se presentan las tres curvas de los promedios de las cinéticas que corresponden a los biorreactores: intrínseco (suelo con humedad) con suelo con nutrientes y humedad, suelo con nutrientes, humedad e inoculación de cepa OHP-AL-GP. En los tres casos se les restó la escasa producción de dióxido de carbono producida en el suelo inhibido.

Figura 4. Cinéticas de biodegradación de hidrocarburos totales contenidos en la muestra de lavadero industrial estudiada durante 80 días. La biodegradación con nutrientes e inoculante (cepa OHP-AL-GP) tiene una excelente acción y un modelo que sigue una ecuación lineal. A todas las cinéticas se les restó la biodegradación intrínseca.

El seguimiento durante 77 días indica que, para el barro tratado, la opción más rápida corresponde al tratamiento con inoculación, es de hacer notar que la cantidad del inóculo fue importante, 2 ml de una densidad óptica de 0,5 unidades de absorbancia, esta biodegradación se



ajusta a una ecuación poco común, lineal $\text{CO}_2 \text{ [mg/Kg peso seco]} = 73.394 \text{ tiempo[días]} + 55.74$ $[R^2 = 0.9889]$, lo que indica un excelente modelo de biodegradación.

El biorreactor con suelo, humedad y nutrientes también tuvo un buen desempeño pero fue necesaria una ecuación polinómica de segundo grado para explicar su comportamiento $\{\text{CO}_2 \text{ [mg/Kg peso seco]}\} = -0.3463 \{\text{tiempo[días]}\}^2 + 59.755 \{\text{tiempo[días]}\} - 24.127$ $R^2 = 0.998$.

El biorreactor con suelo y humedad tuvo un desempeño modesto y también fue necesaria una ecuación polinómica de segundo grado para explicar su comportamiento $\{\text{CO}_2 \text{ [mg/Kg peso seco]}\} = -0.0197 \{\text{tiempo[días]}\}^2 + 8.7935 \{\text{tiempo[días]}\} - 15.516$ $R^2 = 0.9986$.

Conclusiones

La cepa OHP-AL-GP presenta un excelente potencial de biorremediación de hidrocarburos conflictivos como son los aceites lubricantes, su posible empleo en la eliminación de barro provenientes de lavados de motores o de estaciones de servicio sería su aplicación más importante. La velocidad de degradación, en condiciones óptimas de cultivo, le confiere una ventaja adicional.

Los barro provenientes de lavaderos industriales de camiones y equipos utilizados en la industria petrolera tienen un tratamiento biológico de muy buena performance ya sea con remediación asistida con nutrientes o a la que se agrega inoculación de cepas autóctonas, siendo este último caso que presenta una ecuación más conveniente costo/beneficio, por el bajo costo del inoculante.

BIBLIOGRAFÍA

PUCCI, O.H.; BAK, M.A.; PERESSUTTI, S.R.; KLEIN, I.; HÂRTIG, C.; WÛNSCHE, L. (1998) IN SITU-SANIERUNG EINES HOCHGRADIG MIT KOHLENWASSERSTOFFEN KONTAMINIERTEN AREALS IN CERRO DRAGÓN, PATAGONIEN, ARGENTINIEN. UFZ-Bericht – Umweltforschungs-zentrum Leipzig-Halle GmbH. ISSN 0948-9452. N° 18:5-13..

PUCCI, O.H.; BAK, M.A.; PERESSUTTI, S.R.; KLEIN, L.; HÂRTIG, L.; ALVAREZ, H.M.; WÛNSCHE, L. (2000) “INFLUENCE OF CRUDE OIL CONTAMINATION ON THE BACTERIAL COMMUNITY OF SEMIARID SOILS OF PATAGONIA (ARGENTINA)”. Acta Biotechnol. 20 - 2:129-146..

RIIS, V.; BABEL, W. and PUCCI, O.H. (2002) “INFLUENCE OF HEAVY METALS ON THE MICROBIAL DEGRADATION OF DIESEL FUEL”. Chemosphere, 49:559-568. 2002.

SPEIGHT J. (1991) The chemistry and technology of petroleum. Ed Marcel Dekker. Second Edition. NY. Cap.20. Pag. 701-705