

EFFECTO DEL DERRAME DE PETRÓLEO EN SUELO SOBRE LA MICROFLORA DEGRADADORA DE HDROCARBURO, LA VEGETACIÓN Y ALGUNAS PROPIEDADES QUÍMICAS DEL SUELO

EST. CONGRESO

Rodolfo Mendoza¹, Walter Mac Cormack², Eduardo Pagani¹, Liliana Marban³ y
Laura Ríos Merino²

1. Centro de Ecofisiología Vegetal. CEVEG (CONICET). Serrano 669. 1414 Buenos Aires. Argentina. T.E. y Fax: 856 7110. E-mail: emendoza@mail.retina.ar
2. Instituto Antártico Argentino y Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA). Cátedra de Biotecnología. Junin 956. 1113 Buenos Aires.
3. Laboratorio de Química Geológica y Edafológica. LAQUIGE (CONICET). Velasco 847. 1414 Buenos Aires. Argentina.

Abstract

Se estudió el efecto de un derrame de crudo en el suelo sobre algunas propiedades microbiológicas, químicas y de la vegetación colonizadora. El sitio correspondió al yacimiento El Huemul-Koluel Kaike de la Total Austral S.A. (Pcia. Santa Cruz). Se analizaron parcelas por triplicado con 0, 1.95 y 3.90 % p/p de petróleo crudo aplicado en superficie e incorporado a los 3 primeros cm del suelo (6/11/96). Cada parcela se dividió en dos fracciones, una de las cuales fue fertilizada con N y P.

La flora bacteriana aeróbica total y la flora degradadora de hidrocarburos mostraron variaciones significativas en función del tiempo y de la dosis de crudo aplicado al suelo. La fertilización con N y P provocó una disminución inicial en la flora degradadora de la parcela sin contaminar pero aumentó el recuento final en las parcelas contaminadas. Se observó un incremento de la flora fúngica degradadora luego de la aplicación de crudo, la cual se mantuvo relativamente constante con el tiempo y con la fertilización.

La cobertura vegetal colonizadora disminuyó con la dosis de crudo y dentro de cada dosis aumentó con la fertilización. La capacidad de intercambio catiónico y los cationes intercambiables disminuyeron con la aplicación de crudo.

La concentración de hidrocarburos totales en suelo disminuyó con el tiempo y no fue afectada por la fertilización.

Luego de 18 meses desde la contaminación, el ecosistema en general se encuentra en claras vías de recuperación.

Introducción

La Patagonia es una de las áreas del país más productivas tanto para la producción de lana como para la producción petrolera. Los derrames accidentales de crudo sobre los suelos requieren inicialmente un tratamiento rápido y efectivo (Calderón y Rodríguez, 1996). Luego del tratamiento inicial, comienza el proceso de bioremediación del suelo sea este puramente natural o promovido por alguna técnica con el propósito de disminuir el tiempo requerido para la reutilización del suelo contaminado. Se conoce perfectamente que los hidrocarburos existentes en el petróleo crudo son susceptibles a degradación por microorganismos indígenas del suelo. El alcance de la biodegradación depende entre otras cosas de la concentración de oxígeno, la humedad y la disponibilidad de nutrientes (Lawlor et al., 1997). En suelos de la Patagonia continental, derrames accidentales de crudo tratados con nutrientes, han mostrado una sensible disminución en el total de hidrocarburos presentes en el suelo (Luque et al., 1996), resultados similares se obtuvieron en Tierra del Fuego, en donde al cabo de tres años un valor inicial de 3 % de hidrocarburos totales presentes en el suelo se redujo a un valor de 0.17 % (Mendoza et al., 1997).

Luego de ocurrida la contaminación, algunas propiedades del suelo se ven afectadas, pueden influir en el crecimiento vegetal y alterar el tiempo necesario para la reutilización del recurso suelo. No existen en nuestro país muchos antecedentes relacionados con los cambios producidos en las propiedades microbiológicas y químicas del suelo luego de una contaminación con crudo a nivel de campo. Por esta razón, se ha planteado este estudio que tiene como objetivo estudiar el efecto de la contaminación de crudo sobre la flora degradadora de petróleo, la vegetación y algunas características químicas del suelo relacionadas directamente con el nivel nutricional del mismo para el crecimiento vegetal.

Materiales y Métodos

El sitio utilizado para el estudio fue el yacimiento El Huemul-Koluel Kaike de la Total Austral S.A. (Provincia de Santa Cruz). El suelo donde se estableció el ensayo es representativo del área del yacimiento y presenta los problemas típicos del área de escasa humedad y erosión eólica para el crecimiento vegetal. Mas detalles de las características del suelo utilizado y la vegetación se pueden encontrar en otro trabajo referido a la locación EH 1157 de la zona centro del yacimiento. (Mendoza et al., 1998).

En noviembre de 1996, se cercó un área homogénea del terreno de 20 x 20 m, y se aplicó petróleo crudo en superficie para luego incorporarlo en los primeros 3 cm del perfil. Las concentraciones de crudo correspondieron a: 0, 1.95 y 3.90 % p/p. Los tratamientos se dispusieron en parcelas de 2 x 2 m con tres repeticiones, se dividió las parcelas a la mitad y en una de las mitades se aplicó N (urea) y P (superfosfato triple) de forma conjunta. Luego se realizaron muestreos de suelo cada seis meses en cada uno de los tratamientos. Se midió:

Microorganismos de suelo: flora bacteriana heterótrofa aeróbica total determinada en agar caseína-peptona-almidón (Wynn-Williams, 1992), flora bacteriana degradadora de hidrocarburo por la técnica del número más probable en policubetas de 96 celdas y reveladas con violeta de iodonitrotetrazolio (Wrenn y Venosa, 1996). La flora fúngica degradadora de hidrocarburo se estimó a partir de su crecimiento en placas con medio salino basal agarizado y gasoil como única fuente carbonada y de energía.

Características químicas: pH (Peech, 1965); conductividad eléctrica (CE), (Bower y Wilcox, 1965); capacidad de intercambio catiónico (CIC), (Chapman, 1965a); cationes de intercambio (Ca, Mg, Na y K), (Chapman, 1965b) y contenido de hidrocarburos totales (HCT) por dos metodologías, espectrometría infrarroja, IR, (EPA No. 418.1; Kopp y Mc Kee, 1983); y cromatografía gaseosa, CG, utilizando un detector de ionización de llama.

Vegetación: luego de un año de iniciado el ensayo, se midió el estado de la vegetación del suelo por el método de Braun-Blanquet modificado por Westhoff y Van der Maarel (1978), que estima el grado de cobertura vegetal.

Tratamiento estadístico: los resultados se evaluaron por medio de un análisis de varianza y la diferencia entre los tratamientos se evaluó por el análisis de comparación múltiple de la diferencia mínima significativa (DMS) a una probabilidad de $P < 0.05$.

Resultados y Discusión

Flora bacteriana aeróbica total

El número de bacterias aeróbicas totales aumentó tanto en mayo como en noviembre de 1997 con la cantidad de hidrocarburo aplicado al suelo y con el transcurso del tiempo. Sin embargo, no se detectaron diferencias por efecto de la fertilización, ni tampoco algún efecto significativo por la interacción entre las variables estudiadas (Tabla 1, Fig. 1). La ausencia de un efecto promotor del crecimiento por parte de los nutrientes agregados, sobre la flora bacteriana total de este suelo patagónico, ha sido observada previamente en otras regiones de suelos pobres en

nutrientes y clima frío (Mac Cormack et al. 1998), y señala las diferentes respuestas que distintas poblaciones naturales pueden mostrar ante la presencia de niveles de nutrientes superiores a los encontrados en su estado natural.

El número de bacterias totales al comienzo del ensayo (noviembre 1996) en el suelo no contaminado con petróleo disminuyó al cabo de los seis primeros meses para luego aumentar, aunque sin llegar a superar el valor inicial (Fig. 1). En las muestras contaminadas con petróleo, el número de bacterias fue igual y superior al valor inicial luego de transcurridos seis y doce meses del comienzo del ensayo respectivamente (Fig. 1). Los resultados sugieren la presencia de dos efectos simultáneos y de sentido contrario que han modificado el crecimiento de la población bacteriana. Por un lado la existencia de un efecto estacional que deprime inicialmente el número de colonias en el suelo no contaminado luego de los seis primeros meses de iniciado el estudio (mayo 1997). Posiblemente esta disminución, se haya debido a una baja de las temperaturas en esa parte del año. Por otro lado, la presencia de hidrocarburo en el suelo que previene el efecto estacional depresivo y muestra valores del número de colonias bacterianas similares a los encontrados al comienzo del ensayo (Fig. 1). Luego de un año del comienzo del ensayo (noviembre 1997), se restablecen los valores iniciales en el suelo no contaminado y aumentan los valores en los suelos contaminados. Es posible que el aumento de la temperatura en esa parte del año haya contribuido a promover el crecimiento bacteriano.

Flora bacteriana degradadora de hidrocarburo

En líneas generales, el número de bacterias degradadoras de hidrocarburo aumentó con el agregado de petróleo, con el tiempo transcurrido y con la fertilización nitrogeno-fosfatada (Tabla 2, Fig. 2). Además, la combinación de las variables petróleo, tiempo y fertilizante interaccionó de manera positiva y significativa sobre el número de colonias encontradas en las muestras de suelo (Tabla 2).

En los suelos no fertilizados, hubo un claro efecto estacional pero no se observó un aumento manifiesto del número de colonias con el agregado de hidrocarburo, que podría mostrar una pobre respuesta de la flora bacteriana autóctona a la presencia de los contaminantes. Sin embargo en los fertilizados, se observó claramente el efecto estacional y el efecto de la presencia de hidrocarburo que aumentaron el número de colonias. En este caso, la restitución de una adecuada relación C:N:P mediante la fertilización, podría ser la causa de este efecto positivo, no observado en las parcelas sin fertilizar, en donde el agregado del contaminante podría haber determinado un importante desbalance de la relación mencionada.

Flora fúngica degradadora de hidrocarburo

En los recuentos en placa, con medio mínimo agarizado e hidrocarburo como única fuente carbonada y de energía se observó un notable crecimiento de la flora fúngica. Si bien la metodología aplicada no es la mas adecuada para la estimación de la biomasa de este tipo de microorganismos, en los suelos no fertilizados se observó un incremento de la flora fúngica degradadora de hidrocarburos con el agregado de petróleo al 3.90%, mientras que en los fertilizados no se observó efecto de ninguna de las variables (Tabla 3, Fig. 3).

Características químicas del suelo

En los suelos no fertilizados, el pH, la CIC y los cationes de intercambio disminuyeron con el agregado de petróleo crudo al suelo (Fig. 4). Para algunas variables y dosis de petróleo hubo un efecto estacional significativo (pH), mientras que en otras no hubo efecto (Ca). El Na y el K (no mostrado) siguieron similares tendencias que el Ca; hubo una disminución con el agregado de petróleo y no se observó efecto con el tiempo.

La disminución de la CIC y de los cationes de intercambio en el suelo sugiere consecuentemente una disminución de la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento vegetal. Este efecto podría deberse a una impermeabilización de las partículas del suelo producida por el petróleo que impide el intercambio de nutrientes entre el suelo y la solución.

La disminución en los valores de pH con el agregado de crudo resulta consistente con el aumento observado en la población bacteriana. Este aumento determinaría un incremento en la producción de ácidos orgánicos y CO_2 , y de esta forma una disminución del pH en el suelo.

Cobertura de la vegetación

Luego de un año de comenzado el ensayo la vegetación natural del lugar se modificó por efecto del agregado de petróleo y la fertilización (Fig. 5). El petróleo crudo en suelo disminuye la cobertura vegetal en directa relación con la dosis aplicada. La incorporación de fertilizante disminuye el efecto del crudo sobre el crecimiento y aumenta significativamente la cobertura vegetal (Fig. 5).

Hidrocarburo presente en el Suelo

El porcentaje de hidrocarburos totales presentes en el suelo determinado por IR disminuyó significativamente luego de un año de iniciado el estudio y no se observó

efecto atribuido a la fertilización (Tabla 4. Fig. 6). Este resultado es consistente con el aumento observado en las bacterias degradadoras de hidrocarburo.

La disminución en la concentración de hidrocarburos presentes en el suelo contaminado con el tiempo también se observó cuando se determinó el total de hidrocarburos en extractos de suelo por CG (Fig. 8 y 9). En el suelo sin contaminar, los cromatogramas muestran que no hubo cambios importantes con el tiempo (Fig. 7). En los suelos contaminados, los picos y el área de cada pico de los cromatogramas disminuye con el tiempo. Existe también un corrimiento con el tiempo de los picos iniciales del cromatograma hacia la derecha que indica la desaparición de los hidrocarburos mas livianos (Fig. 8 y 9).

Discusión General

La concentración de hidrocarburos presentes en el suelo como consecuencia de un derrame disminuye con el tiempo. Existen parámetros medidos en el suelo y en la vegetación que permiten concluir que el ecosistema se encuentra en claras vías de recuperación. En líneas generales, los microorganismos degradadores aumentaron con el tiempo y con la fertilización. Lawlor et al. (1997), en un trabajo similar sugieren que el aumento en la población microbiana podría relacionarse con una disminución en el pH del suelo como consecuencia de la producción de ácidos grasos y CO_2 liberados al medio por la actividad microbiana. Se ha comprobado que la contaminación del suelo con residuos que contienen hidrocarburos livianos producen un mayor efecto depresivo sobre el crecimiento vegetal que residuos con hidrocarburos pesados (Mendoza, 1998). En el caso de petróleo crudo que contiene una proporción importante de hidrocarburos livianos, produjo una notable disminución del crecimiento vegetal. Sin embargo la fertilización nitrogeno-fosfatada aumenta el crecimiento vegetal en los suelos contaminados a niveles equivalentes al suelo no contaminado y sin fertilizar. Este efecto podría acelerar la bioremediación del sitio y la restauración del ecosistema. El agregado de crudo también disminuye la disponibilidad de nutrientes en el medio, y este efecto podría contribuir aún mas a deprimir el crecimiento vegetal. Este resultado podría justificar la importancia de la fertilización en un proceso de bioremediación de un suelo que ha sufrido contaminación con petróleo.

Bibliografía

Bower C. A. y W. Wilcox. 1965. Soluble Salts. In: Methods of Soil Analysis, Agronomy N° 9. Part 2, pp 933-940 (Black C. A., et al. Eds.). American Society of Agronomy. Madison. Wisconsin. USA.

Calderón G. y R. Rodríguez. 1996. Saneamiento de derrames de petróleo en Tierra del Fuego. 2das Jornadas de Preservación Agua, Aire y Suelo en la Industria Petrolera. San Martín de los Andes, Mayo 1996. Instituto Argentino del Petróleo 563-577.

Chapman H. D. 1965a. Cation-exchange Capacity. In: Methods of Soil Analysis, Agronomy N° 9. Part 2, pp 894-899. (Black C. A., et al. Ed.). American Society of Agronomy. Madison. Wisconsin. USA.

Chapman H. D. 1965b. Total Exchangeable Bases. In: Methods of Soil Analysis, Agronomy N° 9. Part 2, pp 902-904. (Black C. A., et al. Ed.). American Society of Agronomy. Madison. Wisconsin. USA.

Kopp J., y G. Mc Kee. 1983. Method for Chemical Analysis of Water and Wastes. Technical Report EPA 600/4-79-020.

Lawlor K., Sublette K., Duncan K., Levetin E., Buck P., Wells H., Jennings E., Hettenbach S., Bailey S., Berton Ficher J., y T. Todd. 1997. Long-Term Effect of Crude Oil Contamination and Bioremediation in a Soil Ecosystem. *Bioremediation Journal* 1(1): 41-51.

Luque J. L., Amari M. E., Nakamatsu V., Ciano N., Lisoni C., Quinteros J. M. y O. Mackeprang. 1996. Utilización de nutrientes en la biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburo. 2das Jornadas de Preservación Agua, Aire y Suelo en la Industria Petrolera. San Martín de los Andes, Mayo 1996. Instituto Argentino del Petróleo 601-312.

Mac Cormack W. P., Rios Merino L. N. y E. R. Fraile, ER. 1998. Bacterial hydrocarbon degradation in Antarctica. *Berichte zur Polarforschung*. (En prensa).

Mendoza R. E, O. Caso, M. Collantes y R. Portal. 1997. Petroleum Residues in Dry Heath Soils: Effects on Hydrocarbons Leaching, Soil Water Content and Plant Growth. In: *In Situ and On Site Bioremediation*. Eds. B. Alleman y A Leeson. *Landfarming* (4) 2: 167-172. 647 pp. 1997. Battelle Press, Ohio. USA.

Mendoza R., M. Collantes y R. Portal. 1998. Recolonización de especies vegetales y cambios en las características físico-químicas del suelo por efecto del tapado de piletones con residuos de petróleo. 3ras Jornadas de Preservación Agua, Aire y Suelo en la Industria Petrolera. Comodoro Rivadavia. Instituto Argentino del Petróleo y del Gas.

Peech M. 1965. Hydrogen-ion activity. In: Methods of Soil Analysis, Agronomy N° 9. Part 2, pp 914-926. (Black C. A., et al. Eds.). American Society of Agronomy. Madison. Wisconsin. USA.

Westhoff V., y Van der Maare. 1978. The Barun-Blanquet Approach. In: Classification of Plant Communities, pp 287-399. (R. H. Whittaker. De). Junk, The Hague Switzerland.

Wrenn B.A. y A. D. Venosa. 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by most-probable-number procedure. Canadian Journal of Microbiology 42: 252-258.

Wynn-Williams D. D. 1992. Counting bacterial colony-forming units in soil. In: Biotas Manual of methods for Antarctic terrestrial and freshwater research. 3pp. (D.D. Wynn-Williams Ed.) Cambridge.UK.

Tabla 1. Análisis de Varianza del número de bacterias heterótrofas aeróbicas totales en suelo.

Fuente de variación	grados de libertad	Valor de <i>F</i>	Nivel de significancia
<i>Efecto Principal</i>			
HC	2	3.621	0.0495 *
Tiempo (T)	1	5.228	0.0362 *
Fertilización (F)	1	0.578	0.4663 ns
Repeticiones (R)	2	1.507	0.2514 ns
<i>Interacciones</i>			
HCxT	2	0.525	0.6012 ns
HCxF	2	1.249	0.3134 ns
HCxR	4	1.166	0.3625 ns
TxF	1	0.001	0.9781 ns
TxR	2	0.171	0.8440 ns
FxR	2	0.432	0.6568 ns
Residual	16		
Total	35		

ns. = no significativo.

* = significativo, $P < 0.05$ (5%).

Tabla 2. Análisis de Varianza del número de bacterias degradadoras de hidrocarburo en suelo.

Fuente de variación	grados de libertad	Valor de <i>F</i>	Nivel de significancia
<i>Efecto Principal</i>			
HC	2	21.824	0.0070 **
Tiempo (T)	1	81.207	0.0008 ***
Fertilización (F)	1	30.422	0.0053 **
Repeticiones (R)	2	0.479	0.6510 ns.
<i>Interacciones</i>			
Dobles			
HCxT	2	20.926	0.0076 **
HCxF	2	15.631	0.0129 *
HCxR	4	0.798	0.5838 ns.
TxF	1	32.139	0.0048 **
TxR	2	0.908	0.4730 ns.
FxR	2	1.438	0.3384 ns.
Triples			
HCxTxF	2	13.832	0.0160 *
HCxTxR	4	0.897	0.5406 ns.
HCxFxR	4	1.101	0.4641 ns.
TxFxR	2	1.018	0.4392 ns.
Residual	4		
Total	35		

ns. = no significativo.

* = significativo, $P < 0.05$ (5%).

** = significativo, $P < 0.01$ (1%).

*** = significativo, $P < 0.001$ (0.1%).

Tabla 3. Análisis de Varianza del número de hongos degradadores de hidrocarburos en suelo.

Fuente de variación	grados de libertad	Valor de <i>F</i>	Nivel de significancia
<i>Efecto Principal</i>			
HC	2	4.933	0.0214 *
Tiempo (T)	1	3.278	0.0890 ns
Fertilización (F)	1	2.517	0.1322 ns
Repeticiones (R)	2	0.429	0.6583 ns
<i>Interacciones</i>			
HCxT	2	0.590	0.5661 ns
HCxF	2	1.576	0.2374 ns
HCxR	4	0.220	0.9235 ns
TxF	1	2.998	0.1026 ns
TxR	2	0.157	0.8557 ns
FxR	2	1.780	0.2004 ns.
Residual	16		
Total	35		

ns. = no significativo.

* = significativo, $P < 0.05$ (5%).

Tabla 4. Análisis de Varianza de la concentración de hidrocarburos totales en suelo.

Fuente de variación	grados de libertad	Valor de <i>F</i>	Nivel de significancia
<i>Efecto Principal</i>			
HC	2	115.063	0.0000 ***
Tiempo (T)	2	26.968	0.0000 ***
Fertilización (F)	1	0.467	0.5073 ns
Repeticiones (R)	2	1.613	0.2173 ns
<i>Interacciones</i>			
HCxT	2	7.631	0.0003 ***
HCxF	2	1.232	0.3071 ns
HCxR	4	1.213	0.3275 ns
TxF	1	0.168	0.8460 ns
TxR	2	1.347	0.2775 ns
FxR	2	0.007	0.9930 ns.
Residual	28		
Total	53		

ns. = no significativo.

*** = significativo, $P < 0.001$ (0.1%).

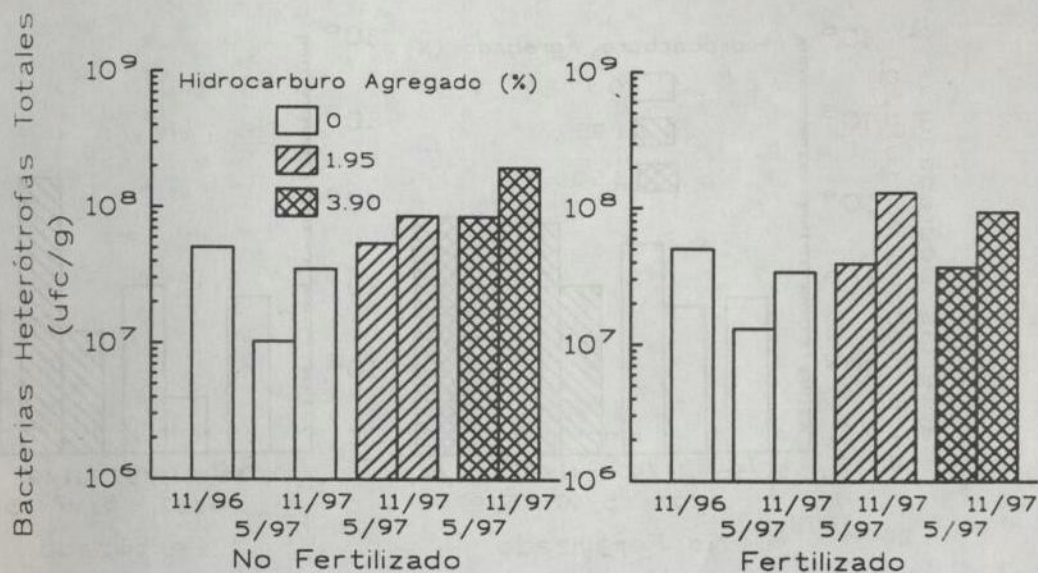


Figura 1. Efecto del agregado de hidrocarburos al suelo sobre la población de bacterias heterótrofas aeróbicas totales con el tiempo en suelos fertilizados y sin fertilizar. El 11/96 corresponde al muestreo inicial antes de aplicar hidrocarburo y fertilizante.

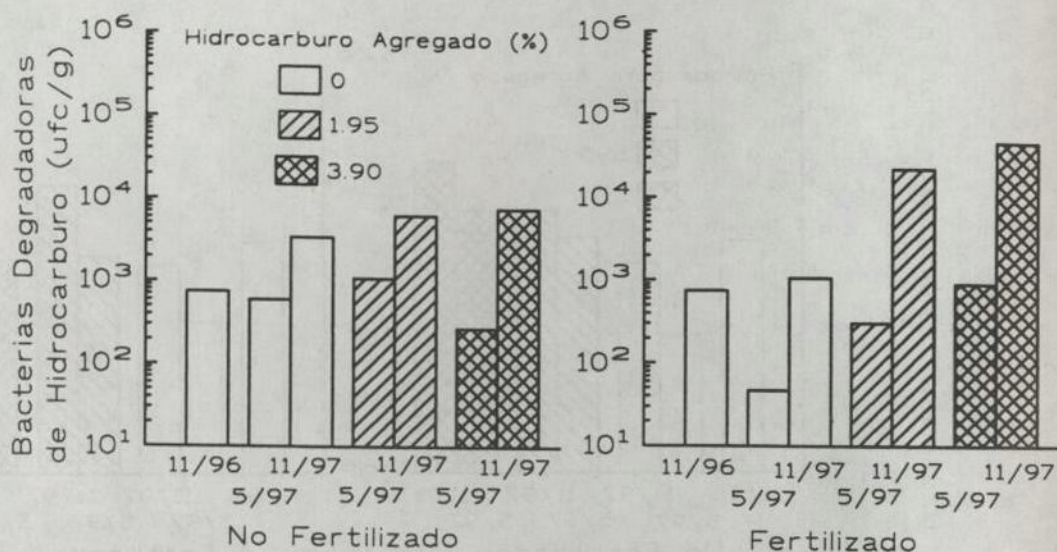


Figura 2. Efecto del agregado de hidrocarburos al suelo sobre la población de bacterias degradadoras de hidrocarburo con el tiempo en suelos fertilizados y sin fertilizar. El 11/96 corresponde al muestreo inicial antes de aplicar hidrocarburo y fertilizante.

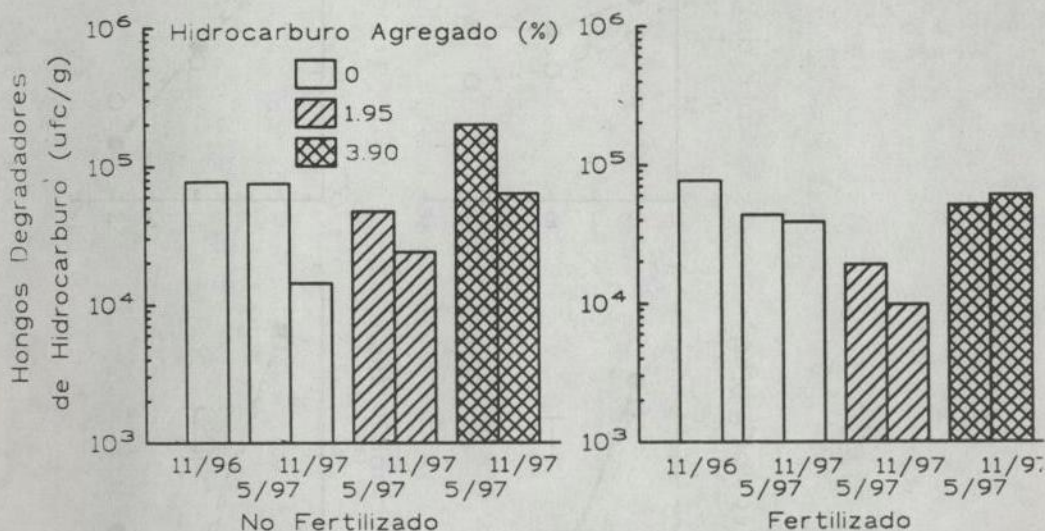


Figura 3. Efecto del agregado de hidrocarburos al suelo sobre la población de hongos degradadores de hidrocarburo con el tiempo en suelos fertilizados y sin fertilizar. El 11/96 corresponde al muestreo inicial antes de aplicar hidrocarburo y fertilizante.

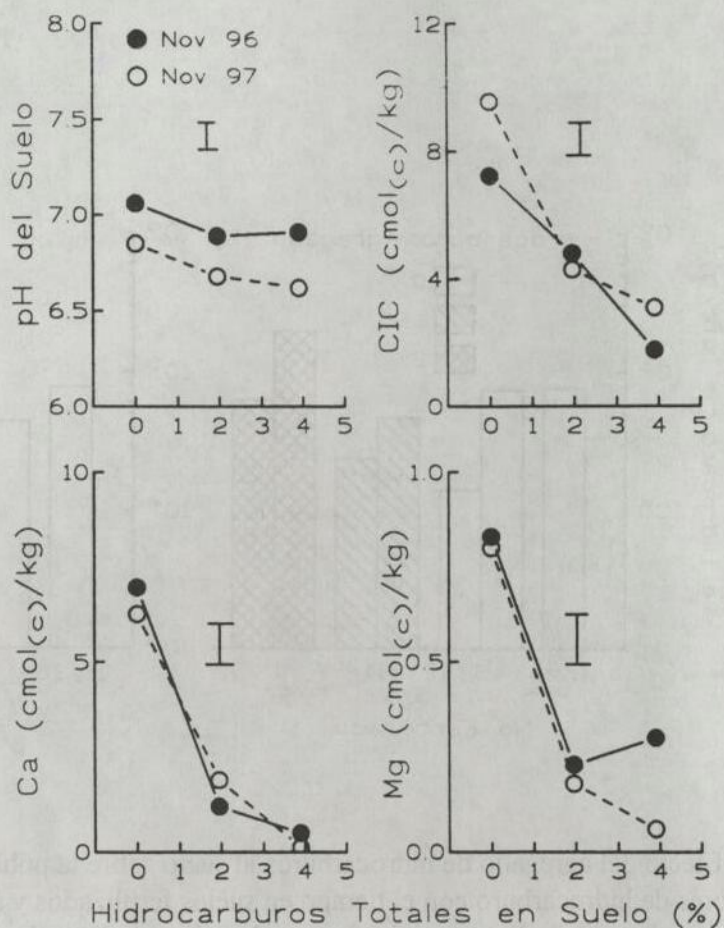


Figura 4. Efecto del agregado de hidrocarburos al suelo sobre el pH, la capacidad de intercambio catiónico y los cationes de intercambio, calcio y magnesio, en el suelo sin fertilizar. Las barras indican la DMS a un nivel de $P < 0.05$.

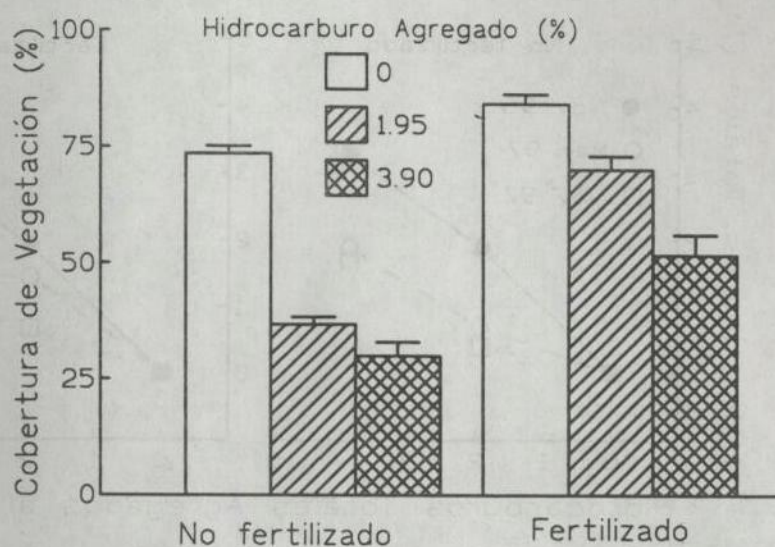


Figura 5. Efecto del agregado de hidrocarburos al suelo sobre cobertura de la vegetación del lugar en suelos fertilizados y sin fertilizar luego de un año de iniciado el ensayo.

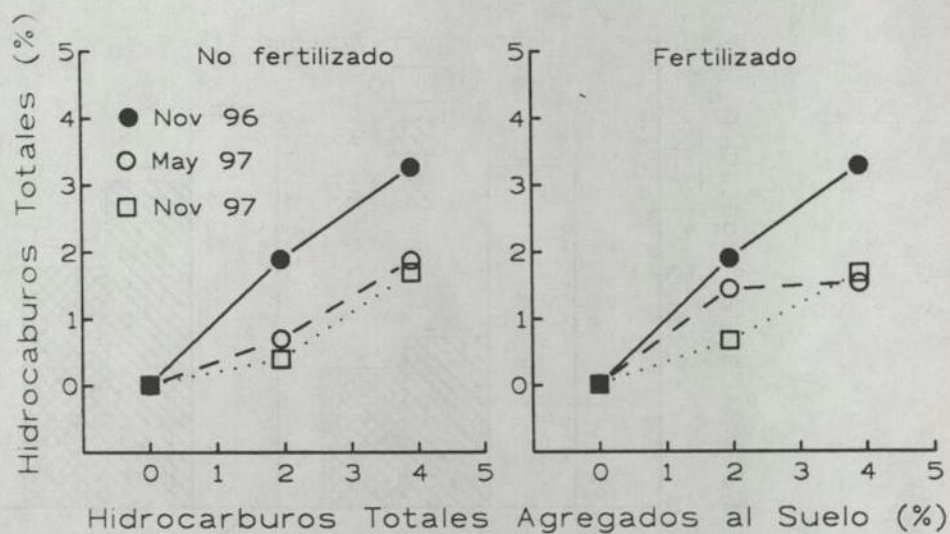
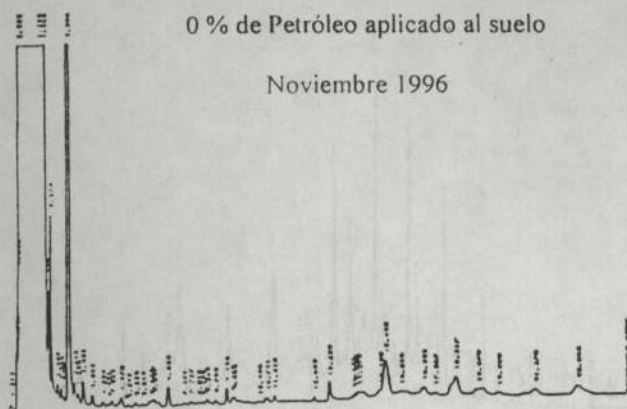
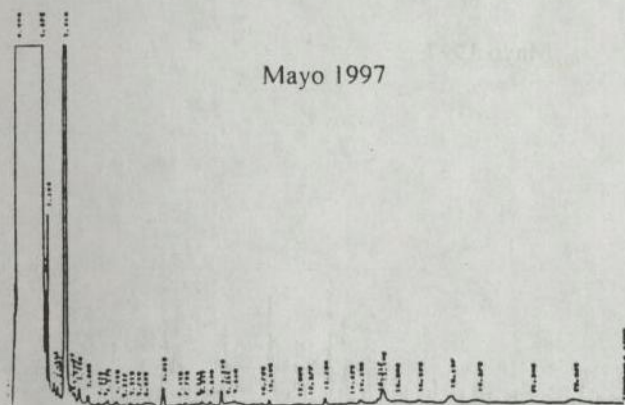


Figura 6. Disminución del porcentaje de hidrocarburos totales en suelo determinados por IR por efecto del tiempo y la fertilización.

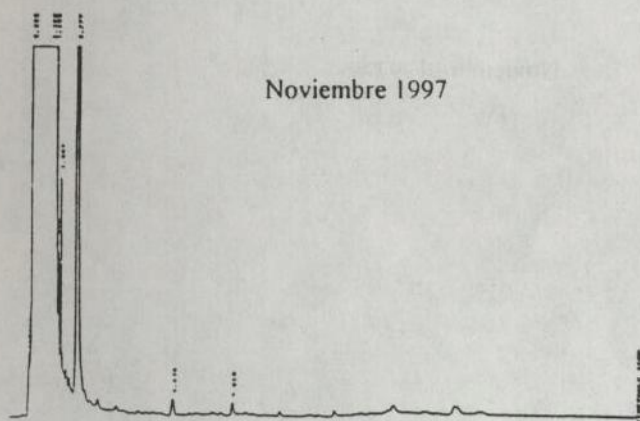
Noviembre 1996



Mayo 1997

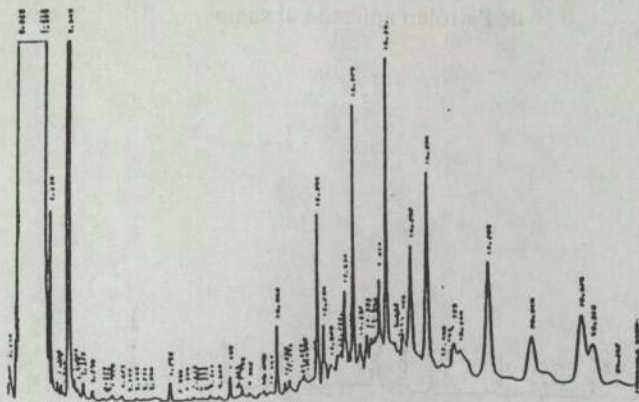


Noviembre 1997

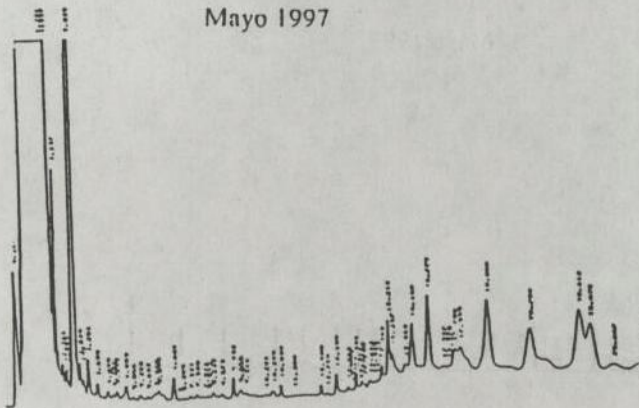


123

1.95 % de Petróleo aplicado al suelo
Noviembre 1996



Mayo 1997



Noviembre 1997

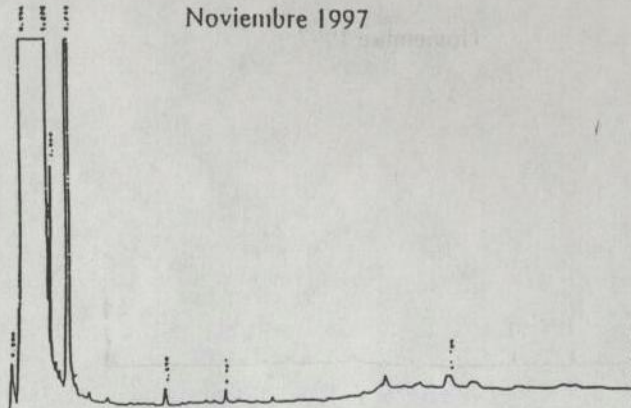


Figura 8. Cromatogramas obtenidos a partir de extracciones de hidrocarburos en muestras de suelo sin fertilizar y contaminadas con 1.95 % de hidrocarburo para noviembre 1996, mayo 1997 y noviembre 1997.

3.9 % de Petróleo aplicado al suelo

Noviembre 1996

