

BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS EN SUELOS CON ALTO CONTENIDO DE SULFATO

Oscar H. Pucci, Carlos Barrionuevo, Ana L. Pozas, Adrián Acuña y Graciela N. Pucci

C.E.I.M.A.

Facultad de Ciencias Naturales - Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

ceima@unpata.edu.ar

Resumen

Una de las problemáticas ambientales notorias en Comodoro Rivadavia es el incremento en la concentración salina de los suelos. A ella puede agregarse la contaminación involuntaria o accidental por petróleo, sus derivados o residuos de la industria extractiva. La experiencia indica que en suelos no salinos de la patagonia puede haber una excelente biodegradación.

Para conocer la respuesta de suelos con alto contenido salino y sin contaminación previa con hidrocarburos, se diseñaron biorreactores en fase sólida a escala de laboratorio, con suelos salinizados contaminados experimentalmente con gasoil, determinando el consumo de oxígeno como medida de utilización de los hidrocarburos.

El resultado de esta experiencia indica que los hidrocarburos de ese origen fueron utilizados siguiendo una ecuación: consumo de oxígeno = $0,0575 T^3 - 7,1722 T^2 + 291,1 T - 537,13$. La ordenada en el origen se presenta porque la curva de crecimiento de la comunidad tiene un período de adaptación de aproximadamente 2 días y medio. La fase exponencial del crecimiento abarca desde ese tiempo, hasta aproximadamente los 30 días, en que la curva de crecimiento de la comunidad bacteriana presente entra en fase estacionaria. Como conclusión podemos decir que las comunidades bacterianas de suelos con alto contenidos de sulfato, existentes en la zona de Comodoro Rivadavia, y que no tienen una adaptación previa a los hidrocarburos, pueden eliminar este tipo de contaminación en períodos relativamente cortos.

INTRODUCCIÓN

La eliminación de la contaminación de hidrocarburos producidos por derrames accidentales de la industria petrolera utilizando microorganismos es la forma más económica, eficiente y menos agresiva para el medio ambiente.

Los suelos Patagónicos son suelos pobres en nutrientes con condiciones climáticas adversas que en muchos puntos se suma un aumento de la salinidad.

El petróleo y las distintas fracciones de su destilación, nafta, kerosene, gasoil, aceites y residuos tienen hidrocarburos de distintas características. Las naftas poseen hidrocarburos livianos tóxicos de la membrana celular, formada por moléculas de C_2 a C_{12} y ciclohexanos con punto de ebullición inferior a los $180^\circ C$ para la nafta liviana y para la nafta pesada es de hasta $205^\circ C$. Los grupos principales son la parafinas (n-parafinas, cicloparafinas, alquil-ciclo-hexano, parafinas ramificadas), oleofinas y aromáticos. El kerosene es una fracción intermedia de la destilación (punto de ebullición de $205-260^\circ C$) que tiene menos hidrocarburos livianos que van desde el carbono 12 al 18

(parafinas normales 23%, ramificadas 16%, monociclo 32% y diciclo 16%) y algunos aromáticos (mononucleares 15% y dinucleares 3%), lo que la hace menos tóxica que la nafta, pero más tóxica que el gasoil. El gasoil es la fracción (punto de ebullición de 260-315°C) que posee una biodegradación buena, por estar formada de moléculas en su amplia mayoría lineales de 12 átomos de carbono en adelante no tóxicas, aunque posee trazas de elemento como el naftaleno. Los aceites lubricantes (punto de ebullición superior a 400°C) tienen de 24 hasta 60 átomos de carbono dependiendo del aceite, está constituido por parafinas normales, ramificadas, diciclo parafinas e hidrocarburos aromáticos. Los residuos poseen un punto de ebullición superior a los 600°C.

En este estudio se trabajó con suelos naturalmente salinos del oeste de Comodoro Rivadavia, que no habían sufrido contaminación previa con hidrocarburos, para determinar el potencial de la comunidad autóctona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis físico-químico:

Las determinaciones de aniones y cationes solubles (sodio, potasio, sulfatos, carbonatos, bicarbonatos, calcio, magnesio y cloruros) así como la determinación de pH, se realizan a partir de un extracto de suelo con agua destilada, en una relación de 1: 2,5. (11)

pH: Determinación potenciométrica con electrodo de vidrio. (12)

Sulfatos: Método turbidimétrico basado en la precipitación de los iones sulfato en medio ácido. (15)

Carbonatos y bicarbonatos: Método volumétrico basado en la titulación con ácido clorhídrico valorado 0,1 N utilizando fenoftaleína y heliantina como indicadores. (8)

Calcio: Complejometría con EDTA a pH 12 utilizando murexida como indicador. (2)

Magnesio: Complejometría con EDTA a pH 10 utilizando negro de eriocromo T como indicador. (2)

Cloruros: Según método de Mohr. (3)

Amonio y Urea: Método colorimétrico basado en la reacción del amoníaco, libre y/o liberado por hidrólisis de la urea, con fenol e hipoclorito en medio alcalino dando como resultado un complejo coloreado, el Azul de Indo fenol que es leído en el espectrofotómetro a 540 nm (método de uremia de laboratorios Wiener).

Nitritos: Método colorimétrico basado en la diazotización del ácido sulfanílico con iones nitrito para luego copular con 1-naftilamina. (6)

Nitratos: Método basado en la nitración del alcaloide brucina en presencia de ácido sulfúrico (7).

Fosfatos: Método colorimétrico basado en la reacción entre el fósforo inorgánico y el molibdato en medio ácido para dar fosfomolibdato, que es reducido por el ácido ascórbico a azul de fosfomolibdeno. El exceso de molibdato se elimina con una solución de arsenito/citrato y el complejo coloreado formado se mide en espectrofotómetro a 620 nm (equipo de determinación de fosfatemia de Laboratorios Wiener).

Residuo orgánico e inorgánico: Colocar una porción de suelo en un crisol y calentar en un mechero hasta que cese el desprendimiento de humo.

Calentar el crisol en una mufla a 450°C durante 48 hs. hasta obtención de peso constante. Se calcula la materia orgánica y por diferencia la materia inorgánica. (13)

Humedad: Método gravimétrico (9).

Capacidad de retención de agua: Método según García Trejo, A. (10).

Densidad aparente: Según Allison, L. et al. (1)

Densidad real: Según Allison, L. et al. (1).

Porosidad: Según Allison, L. et al. (1).

Determinación de Hidrocarburos/ Caracterización del residuo

Extracción: Se realizó en un extractor de tipo Soxhlet con tricloroetano como solvente de extracción, los hidrocarburos extraídos son cuantificados gravimétricamente.

Separación de las fracciones de hidrocarburos: Los hidrocarburos obtenidos son separados en distintas fracciones por cromatografía en columna de silicagel. Como solvente de elusión se utilizaron 250 ml.

de Hexano, 150 ml. de Benceno y 150 ml. de Cloroformo-Metanol 1:1, las fracciones se tomaron de 25 ml. y se evaporaron hasta obtención de un residuo seco. El contenido de cada fracción se determinó gravimétricamente. (5)

Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPH)

Método turbidimétrico basado en la extracción de hidrocarburos desde el suelo utilizando una mezcla de alcoholes, que al mezclarlo con agua destilada, se produce una turbidez proporcional a la concentración del hidrocarburo; es medida en espectrofotómetro a 585 NM., (Norma EPA/600/R-01/060). (4, 16, 17).

Cinética de la mineralización:

El seguimiento del proceso de biodegradación se realizó midiendo la producción de Dióxido de Carbono, durante sesenta y cinco días, como una medida de la mineralización del hidrocarburo.

La utilización de un hidrocarburo puede ser monitoreada midiendo el dióxido de carbono producido como resultado de la mineralización de la fuente carbonada. Dicha determinación resulta además, una medición indirecta del crecimiento bacteriano.

En principio, el dióxido de carbono liberado del sistema productor se fija en hidróxido de sodio y el carbonato formado se titula con ácido clorhídrico.

Éste es un método volumétrico basado en la titulación de carbonatos y bicarbonatos utilizando ácido clorhídrico de normalidad conocida. En una primera etapa se valora la muestra usando fenoftaleína como indicador hasta el viraje de rosado a incoloro, correspondiendo el volumen del ácido empleado a la transformación de carbonatos en bicarbonatos. En una segunda etapa se titulan los bicarbonatos con heliantina como indicador hasta viraje del incoloro al anaranjado, titulando de esta forma los bicarbonatos. (18)

Se utilizaron en total seis sistemas por duplicado en fase sólida donde se variaron las fuentes de Cu. Esta serie de sistemas constan de: a.- Frascos de boca ancha, color caramelo, en el que se dispone la muestra de suelo en estudio, de 100 gr., con tapón de cierre hermético. b.- Frasco colector, es un tubo de ensayo, estéril, de 10 ml de capacidad, conteniendo de 2 a 5 ml de hidróxido de sodio 3N. c.- Se les adicionó a cada sistema: Humedad

Fuente de Carbono: nafta, kerosene, gas-oil, aceite lubricante, peptona, glucosa.

Fuente de Fósforo: Fosfato monopotásico, en distintas concentraciones.

Fuente de Nitrógeno: Nitrato de amonio.

Se realizó un sistema en donde se ensaya la mineralización intrínseca de la comunidad.

Todo ensayo fue llevado a cabo a temperatura ambiente. (23+/-5°C).

Determinación de la población bacteriana:

Los recuentos de microorganismos y aislamientos de bacterias degradadoras de hidrocarburos se efectuaron a partir de suspensiones de 10 gr. de muestra y 100 ml. de agua destilada estéril, con agitación en vortex.

En todos los casos los resultados se expresan en unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco (ufc/gr. suelo).

MEDIO R₂A: Extracto de levadura 0.5 g, peptona proteasa 0.5 g, casamino ácido 0.5 g, glucosa 0.5 g, almidón 0.5 g, piruvato de sodio 0.3 g, fosfato ácido di sódico 0.3 g, sulfato de magnesio decahidratado 5 g, agar-agar 14 g, agua destilada 1000 ml.

MEDIO BASE MINERAL (MM): Cloruro de sodio 5 g, fosfato ácido di sódico 0.5 g, fosfato monopotásico 0.5 g, sulfato de amonio 1 g, sulfato de magnesio decahidratado 0.2 g, nitrato de amonio 1 g, agua destilada 1000 ml, pH 7, al cual se le agrego 30 microlitros de petróleo- gasoil por

diseminación en superficie. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121°C antes de ser utilizados.

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121°C antes de ser utilizados.

Enumeración de bacterias degradadoras en medio sólido:

Permite el desarrollo de todas las bacterias sin las competencias que se producen en medio líquido.

Se sembró cada placa por diseminación en superficie, se las mantuvo a temperatura ambiente (23 +/- 5°C) durante todo su estudio. (14)

RESULTADOS DISCUSIÓN

Características del ecosistema:

El ecosistema en estudio es un suelo con alta salinidad obtenido de un área de forestación que de forma natural se cubrió de sal después de grandes lluvias que inundaron la zona. Los parámetros fisicoquímicos corresponden a un suelo de patagonia con relativa baja humedad y un pH elevado. El contenido de aniones y cationes muestra una salinidad muy elevada, con predominio de sulfatos casi dos veces y media que el contenido de cloruro, esto produce una fuerza iónica muy elevada que tiene influencia sobre el desarrollo bacteriano. No todos los aniones y cationes se encuentran en forma soluble, pues la presencia de carbonato, sulfato con calcio y magnesio hace que parte de ellos estén como precipitado. En la tabla 1 están las características fisicoquímicas y contenido de aniones y cationes. En la tabla 2 se indican los valores de aniones y cationes solubles, después de los procesos naturales de precipitación. En base a estos resultados se diseñaron los medios líquidos para el cultivo de bacterias tanto heterótrofas como bacterias que utilizan hidrocarburos como única fuente de carbono y energía.

Tabla 1: caracterización fisicoquímica y contenido de aniones y cationes del ecosistema

CARACTERÍSTICAS DEL ECOSISTEMA:

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS:

HUMEDAD (%)

8.3

PH

9.2

RESIDUO ORGÁNICO (%)

3.7

RESIDUO INORGÁNICO (%)

96.3

DENSIDAD APARENTE (g/ml)

1.17

DENSIDAD REAL (g/ml)

0.62

POROSIDAD %

38.7

CAP. DE RET. DEL AGUA (%)

54.7

CONTENIDO DE ANIONES Y CATIONES:

ppm

mEq

Calcio (ppm)

5201

259.531

Magnesio (ppm)

1197

98.478

Sodio

15380

668.987

Potasio

2789

71.330

Carbonatos (ppm)

115

3.833

Bicarbonatos (ppm)

467

7.656

Sulfatos (ppm)

33943

707.146

Cloruros (ppm)

14016

394.928

Sulfuros (ppm)

No detectado

0.000

Tabla 2: Aniones y cationes biodisponibles

REAL NO PRECIPITADO

Aniones y Cationes

ppm

meq/lt.

CLORUROS

14016

395.37

CARBONATOS

0

-

BICARBONATOS

467

7.66

SULFATOS

21460

447.08

CALCIO

0

-

MAGNESIO

1149.930

94.64

SODIO

15380

671.62

POTASIO

2789

71.51

HIERRO

0

-

FUERZA IÓNICA

2.74

En medios de cultivo con alta concentración de sales (respetando las concentraciones originales y no teniendo en cuenta la precipitación por incompatibilidad de sales) la población que utiliza gasoil como fuente de carbono y energía es del orden de 10^7 , Los microorganismos que son capaces de desarrollar con metatoluenato o una mezcla de metatoluenato y benzoato, ambos intermediarios en el metabolismo de los hidrocarburos aromáticos son del orden de 10^3 , ambos valores tiene una importante significación en los procesos de biorremediación, y se presentan como una característica de importancia pues la comunidad tendría la capacidad de degradar los componentes mayoritarios del petróleo aún en condiciones de saturación de sales en el agua de los poros de la matriz del suelo (tabla 3).

En medios de cultivo con concentración salina corregida por las precipitaciones se repiten los valores, salvo para el gasoil que disminuye en un orden de magnitud.

Tabla 3

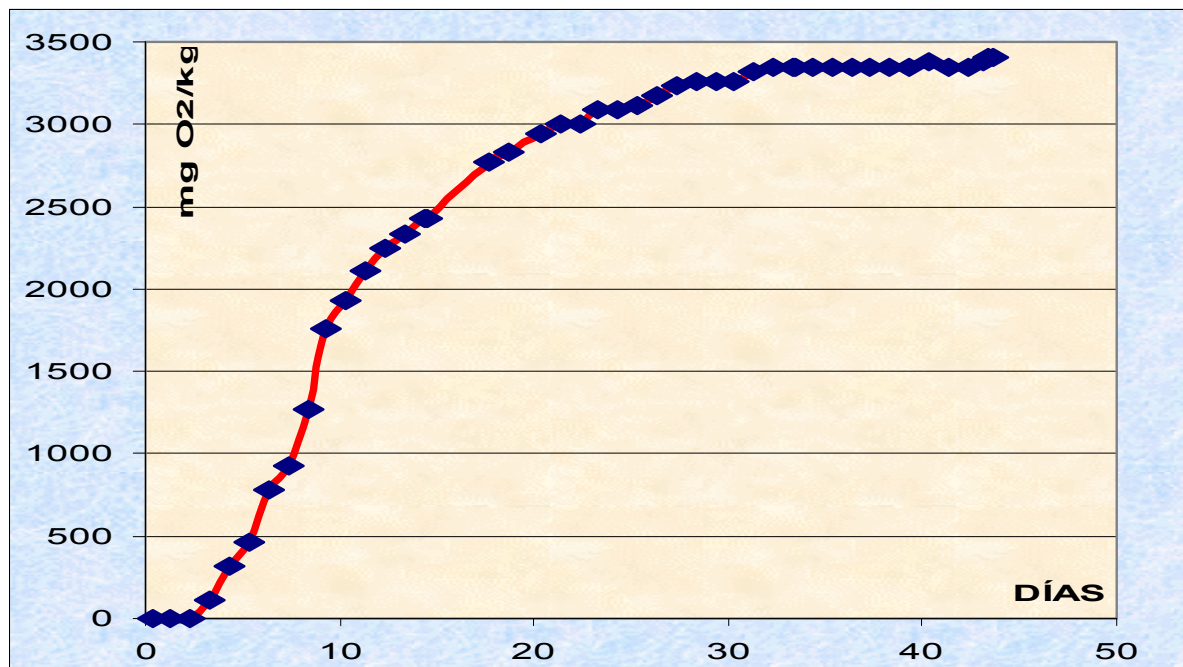
MBM (SAC)+GO	1,00E+07		MBM / P +GO	1,00E+06
MBM (SAC)+M-TO	1,00E+03		MBM / P +M-TO	1,00E+03
MBM (SAC)+BENZ-TO	1,00E+03		MBM / P +BENZ-TO	1,00E+03

Biodegradación de gasoil por la comunidad:

El ensayo de biodegradación por la comunidad se efectuó con el sistema OxyTop® que determina el consumo de oxígeno por presión negativa con secuestro simultaneo del dióxido de carbono, el resultado se presenta en la figura 1, la cinética de consumo de oxígeno muestra una fase de retardo (lag) de 3 días y una fase de crecimiento de aproximadamente 30 días para llegar a la fase estacionaria en aproximadamente 33 días. El consumo de oxígeno no puede extrapolarse directamente a la mineralización de los hidrocarburos del gasoil, pues una parte muy importante forma biomasa bacteriana que entra en la cadena alimentaria del suelo, por lo que el oxígeno respirado por la comunidad, utilizando gasoil como fuente de carbono y energía (en el orden de los 3500 mg/Kg suelo seco) es una buena performance, teniendo en cuenta que la comunidad no había tenido una selección previa con hidrocarburos.

El resultado de esta experiencia indica que los hidrocarburos de ese origen fueron utilizados siguiendo una ecuación: consumo de oxígeno = $0,0575 T^3 - 7,1722 T^2 + 291,1 T - 537,13$. La ordenada en el origen se presenta porque la curva de crecimiento de la comunidad tiene un período de adaptación de aproximadamente 2 días y medio. La fase exponencial del crecimiento abarca desde ese tiempo, hasta aproximadamente los 30 días, en que la curva de crecimiento de la comunidad bacteriana presente entra en fase estacionaria. Como conclusión podemos decir que las comunidades bacterianas de suelos con alto contenidos de sulfato, existentes en la zona de Comodoro Rivadavia, y que no tienen una adaptación previa a los hidrocarburos, pueden eliminar este tipo de contaminación en períodos relativamente cortos.

Figura 1: Oxidación de hidrocarburos por la comunidad.



Mineralización de destilados del petróleo:

Por la buena cinética de degradación de gasoil se efectuaron ensayos por duplicado de mineralización de nafta, kerosene, gasoil, aceite lubricante y como parámetros de comparación, mineralización intrínseca y mineralización de peptona y glucosa. En el caso de la nafta puede observarse un claro efecto inhibitor, que se debería al efecto de los componentes principales de este destilado del petróleo que lisan las membranas celulares de las bacterias que integran la comunidad presente en el suelo. El porcentaje de inhibición es del 34%.

Tabla 4: Cantidad de dióxido de carbono producido en 65 días y porcentaje considerando 100% a la respiración intrínseca del suelo con el agregado de nitrato de potasio y fosfato.

Biorreactor	CO ₂ A los 65 días [mg/kg suelo]	% de producción de CO ₂ (*)
nitrato K/ fosfato	656	100
peptona-glucosa	5331	813
Nafta	431	66
Kerosene	2278	347
Gasoil	3818	582
Aceite	2064	315

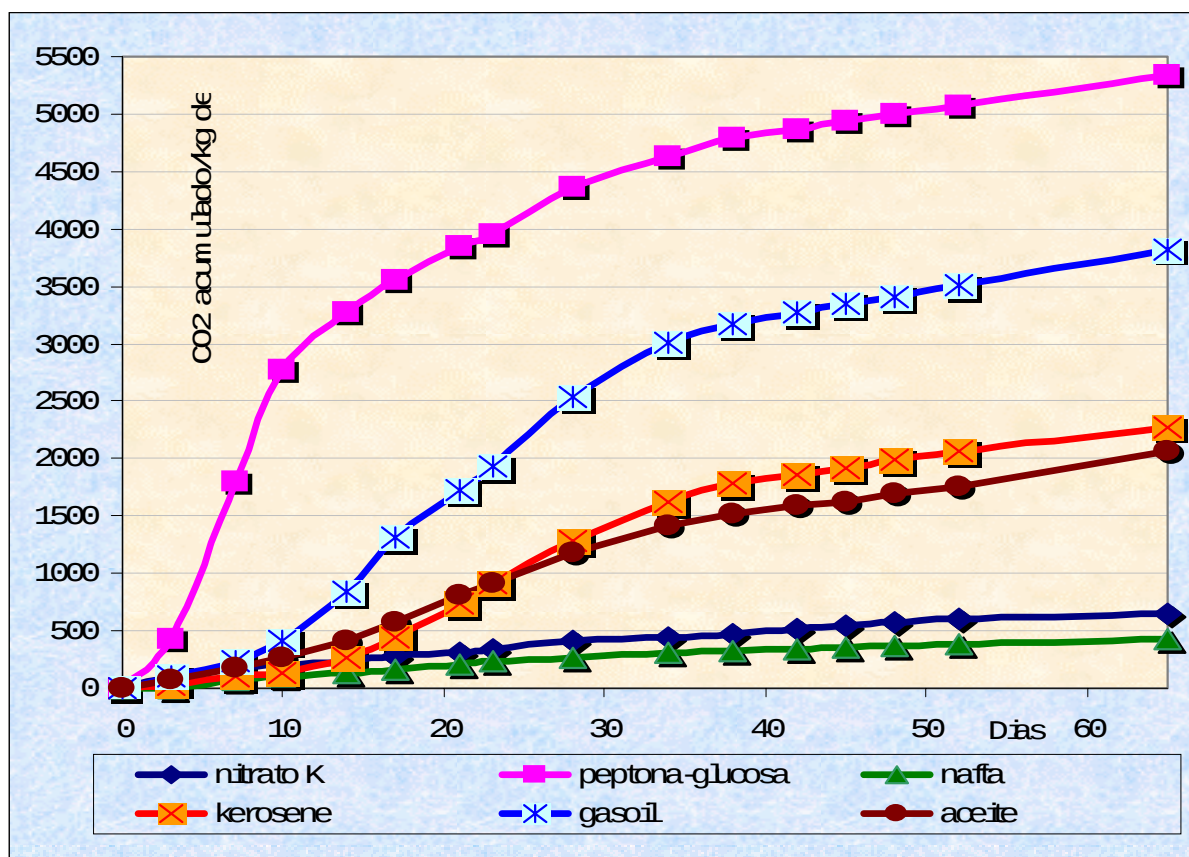
(*) considerando 100 % la respiración intrínseca.

La mineralización de peptona–glucosa permite establecer la capacidad máxima de mineralización, o actividad de la comunidad bacteriana heterotrófica total del suelo, en las que están involucradas también las bacterias que mineralizan hidrocarburos, como se aprecia en la tabla 4, su valor es más de 8 veces superior a la mineralización intrínseca.

La acción de la comunidad sobre el gasoil es casi seis veces superior a la del suelo sin contaminar, confirmando los datos de respirometría, este éxito en la biodegradación se debe a la composición del gasoil, que en general carece de compuestos tóxicos para una parte importante de la comunidad mineralizadora de hidrocarburos.

El kerosene y el aceite lubricante tienen una posición intermedia con algo más de 3 veces la capacidad de producir dióxido de carbono que el suelo fertilizado sin el agregado de fuentes de carbono. Estos dos destilados del petróleo tienen hidrocarburos de menor número de átomos de carbono (kerosene) y de mayor número (aceite lubricante) que serían los que producen una mineralización más lenta.

Figura 2: Mineralización intrínseca, de peptona-glucosa, nafta, kerosen, gasoil, y aceite lubricante por la comunidad del suelo con alta salinidad.



CONCLUSIÓN:

La capacidad de mineralizar hidrocarburos de suelos con alta salinidad y sin contaminación previa (adaptación) a estos contaminantes puede considerarse como muy buena.

La eficiencia de la mineralización depende del hidrocarburo que se trate y la eficiencia disminuye de gasoil>kerosene>aceite lubricante, en el caso de la nafta, la comunidad ensayada no produce su mineralización en un período de 65 días.

BIBLIOGRAFÍA:

Allison L et al. (1993) Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos. Ed L A Richards. Editorial Limusa. Séptima edición. México. Pág. 25-26.

Allison L et al. (1993) Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos. Ed L A Richards. Editorial Limusa. Séptima edición. México. Pág. 100-101.

Allison L et al. (1993) Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos. Ed L A Richards. Editorial Limusa. Séptima edición. México. Pág. 105-106.

Dexil Corporation and Petroflag system (2001) Field measurement technologies for total petroleum hydrocarbons in soil. E.P.A. 600-R-01-092.

Dibble J, Batha R (1979) Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. Appl. Environ. Microbial. 37:729-739.

Fresenius W, Quentin K, Scvneider (1988) Water Analysis. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. Pág. 226-229.

Fresenius W, Quentin K, Scvneider (1988) Water Analisis. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. Pag. 229-233.

Fresenius W, Quentin K, Scvneider (1988) Water Analisis. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. Pág. 247-255.

García Trejo A (1981) Experimentos en microbiología de suelos. Ed. Compañía Editorial Continental S.A. Primera edición. México. Pág. 14.

García Trejo A (1981) Experimentos en microbiología de suelos. Ed. Compañía Editorial Continental S.A. Primera edición. México. Pág. 15.

García Trejo A (1981) Experimentos en microbiología de suelos. Ed. Compañía Editorial Continental S.A. Primera edición. México. Pág. 16.

García Trejo A (1981) Experimentos en microbiología de suelos. Ed. Compañía Editorial Continental S.A. Primera edición. México. Pág. 19.

García Trejo A (1981) Experimentos en microbiología de suelos. Ed. Compañía Editorial Continental S.A. Primera edición. México. Pag. 22-27.

Mills et al., 1978; Bogart and Hemmingsen, 1992, Wang and Bartha, 1994.

Standard Methods for examinations of Walter Wastewater, 1992, 18th edition. Parte 2320. Método B.

Standard test method for screening fuel in soils (2001) ASTM. D 5831-96.

Turbidimetric screening method for total recoverable petroleum hydrocarbons in soil (1998) Method 9074. Normas E.P.A.

O. H. Pucci. Comunicación Personal.