

BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS, INFLUENCIA DE LA FERTILIZACIÓN EN EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Oscar Héctor Pucci, Fernanda Pérez Krenek, Graciela Natalia Pucci

C.E.I.M.A.

Facultad de Ciencias Naturales - Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco
Comodoro Rivadavia – Argentina

Resumen:

La biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos se ha mostrado como una metodología efectiva, de relativo bajo costo y de gran aceptación social. Estos procesos están altamente influenciados por parámetros ambientales y por la estructura de la comunidad bacteriana.

En este trabajo se efectuaron pruebas de laboratorio que determinaron la proporción óptima de fertilizantes necesaria para suelos de la Patagonia, caracterizados por su bajo contenido de nutrientes.

Los resultados indican que la incorporación de nutrientes en baja proporción es más efectiva que el agregado en altas concentraciones. Altas concentraciones del ion nitrato causarían un período de adaptación mayor que otras fuentes de nitrógeno, a pesar de ello el nitrato de potasio tendría la mayor eficiencia en mineralización; y el porcentaje de biodegradación más alto de hidrocarburos de C₁₂ a C₃₀. La relación C:N:P más efectiva para todas los compuestos ensayados es 100:1:0.1

Palabras Claves:

- Biorremediación - Fertilización - Nutrientes

Introducción:

Existen diferentes métodos para eliminar residuos contaminados con petróleo y sus derivados. De todos ellos, los que tienen la categoría de naturales para la recuperación de las áreas contaminadas, son los biológicos, que utilizan microorganismos, principalmente bacterias obtenidas por selección natural, de poblaciones bacterianas, de suelos contaminados con hidrocarburos.

Es una realidad que los suelos de las distintas regiones, están habitados por comunidades de variada composición cuali-cuantitativa y con características nutricionales distintas inducidas por el hábitat en que se desarrollan.

Los suelos de la Patagonia tienen un marcado déficit de nitrógeno y de fósforo y las comunidades bacterianas presentes en estos sitios se encuentran altamente adaptadas a estas condiciones ambientales. La incorporación de nutrientes en altas concentraciones puede provocar un efecto adverso al deseado, disminuyendo el número de bacterias degradadoras de hidrocarburos o su actividad y por consiguiente, la biodegradación.

La bibliografía cita diversas proporciones de nutrientes como las más efectivas, pero estas proporciones varían ampliamente, y las distintas cantidades influyen significativamente en el costo

del proceso, no solo por el precio de ellos, sino también por su influencia en la velocidad de degradación, lo que implicaría un mayor tiempo de proceso.

El objetivo del trabajo será determinar el fertilizante inorgánico y las proporciones óptimas de fertilizantes para que en un suelo de la Patagonia central, caracterizado por su bajo contenido de nutrientes, se produzca un proceso de biorremediación eficiente.

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)

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

Carbonato y bicarbonato: 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)

Cloruro: 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).

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

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

Fosfato: 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 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 el bicarbonato con heliantina como indicador hasta viraje del incoloro al anaranjado, titulando de esta forma los bicarbonatos. (18)

Se utilizaron en total trece sistemas en fase sólida donde se variaron las relaciones entre C: N: P y el compuesto nitrogenado. Esta serie de sistemas constan de:

Frascos de boca ancha, color caramelo, en el que se dispone la muestra de suelo en estudio, de 100 g., con tapón de cierre hermético.

Frasco colector, es un tubo de ensayo, estéril, de 10 ml de capacidad, conteniendo de 2 a 5 ml de hidróxido de sodio 3N.

Se les adicionó a cada sistema:

Humedad

Fuente de Carbono: Gas oil estéril

Fuente de Fósforo: Fosfato monopotásico, en distintas concentraciones

Fuente de Nitrógeno: Se trabajo con distintos compuestos y concentraciones: Nitrato de amonio, sulfato de amonio, nitrato de potasio y urea. Las concentraciones de C: N: P utilizadas fueron: 100:10:1, 100:1:0.1 y 100:0.1:0.05

También se realizó un sistema en donde se compara la mineralización intrínseca de las bacterias, el que fue restado a los valores de las otras mineralizaciones.

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/g. suelo).

Se realizó, luego, diluciones decimales apropiadas a partir del sobrenadante.

Los medios de cultivo utilizados fueron:

-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.

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:

Características del suelo contaminado en estudio: El suelo contaminado utilizado en este estudio proviene de una zona semiárida de la Patagonia.

Tabla 1a: Composición físico química y de nutrientes del suelo estudiado.

DETERMINACIÓN	VALORES
HUMEDAD %	6.96
pH	7.40
DENSIDAD REAL gr./ml.	2.26
DENSIDAD APARENTE gr./ml.	1.14
POROSIDAD	0.49
MATERIA ORGÁNICA %	15.20
CAP. RETENCIÓN DE AGUA %	5.4
CLORURO ppm	34.42
CARBONATO ppm	No detectado
BICARBONATO ppm	63.24
FOSFATO ppm	5.46
CALCIO ppm	13.94
MAGNESIO ppm	4.23
SULFATO ppm	1288.7
NITRITO ppm	0.12
NITRATO ppm	49.8
AMONIO ppm	0.21
UREA ppm	0.30

Determinación de la población bacteriana:

El crecimiento de las cepas en los distintos medios fue:

Tabla 1 b:

	R ₂ A	MM + Petróleo Gasoil
Bacterias Heterótrofas (ufc/g de suelo)	1.10 ⁶	2.10 ⁶

Hidrocarburos totales:

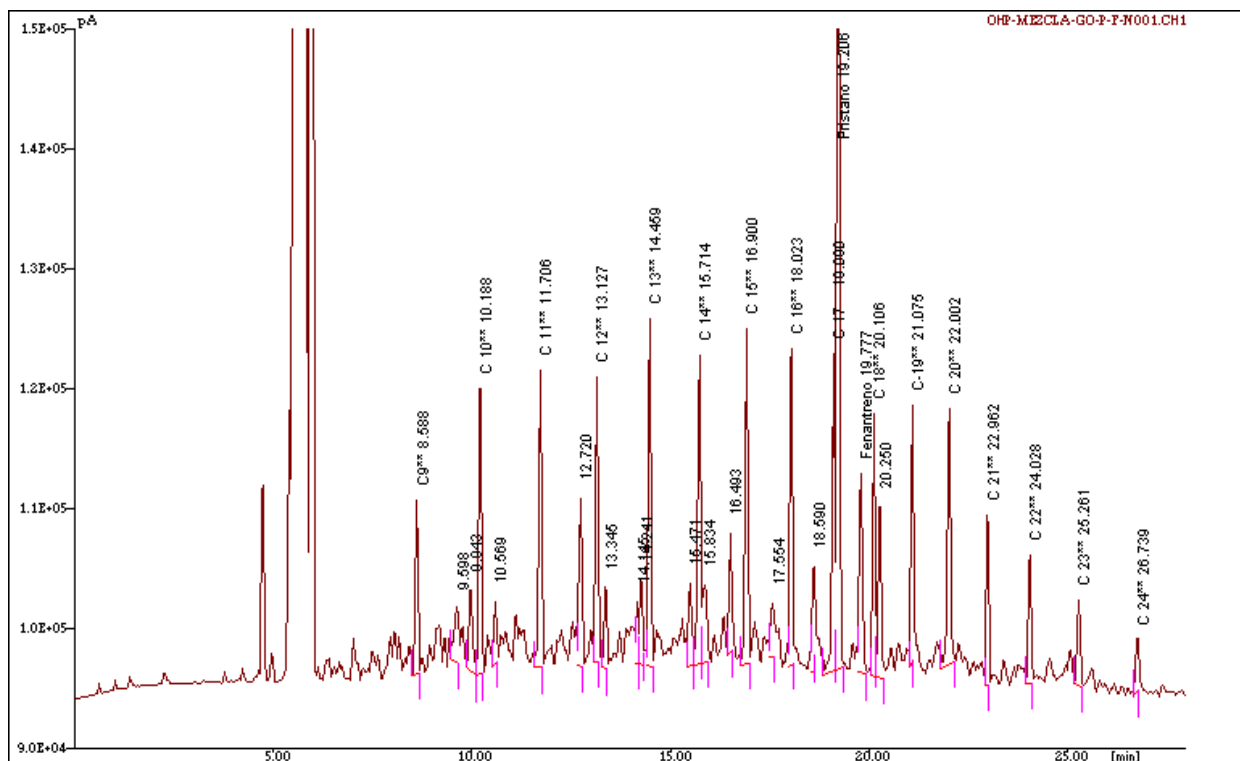
Tabla 2: Porcentajes de biodegradación con diferentes fuentes y concentraciones de nitrógeno.

Sistema	Hidrocarburos totales iniciales (ppm)	Hidrocarburos totales finales (ppm)	Porcentaje de degradación (%)
Nitrato de Amonio (100:10:1)	22318	8135	63.5
Nitrato de Amonio (100:1:0.1)	22318	5478	75.5
Nitrato de Amonio (100:0.1:0.05)	22318	5015	77.5
Sulfato de amonio (100:10:1)	22318	7143	68.0
Sulfato de amonio (100:1:0.1)	22318	2242	90.0
Sulfato de amonio (100:0.1:0.05)	22318	4366	80.4
Nitrato De Potasio (100:10:1)	22318	5363	76.0
Nitrato De Potasio (100:1:0.1)	22318	3732	83.3
Nitrato de Potasio (100:0.1:0.05)	22318	1766	92.1
Urea (100:10:1)	22318	7837	64.9
Urea (100:1:0.1)	22318	3944	82.3
Urea (100: 0.1: 0.05)	22318	7143	68.0

Caracterización del residuo:

En la figura 1 se observa la composición del residuo determinada por cromatografía gaseosa, nótese la presencia de un alto porcentaje de pristano y fenantreno.

Figura 1: Cromatografía gaseosa del hidrocarburo agregado



Cinética de degradación de hidrocarburos:

Figura 2: Nitrato de amonio en tres concentraciones:

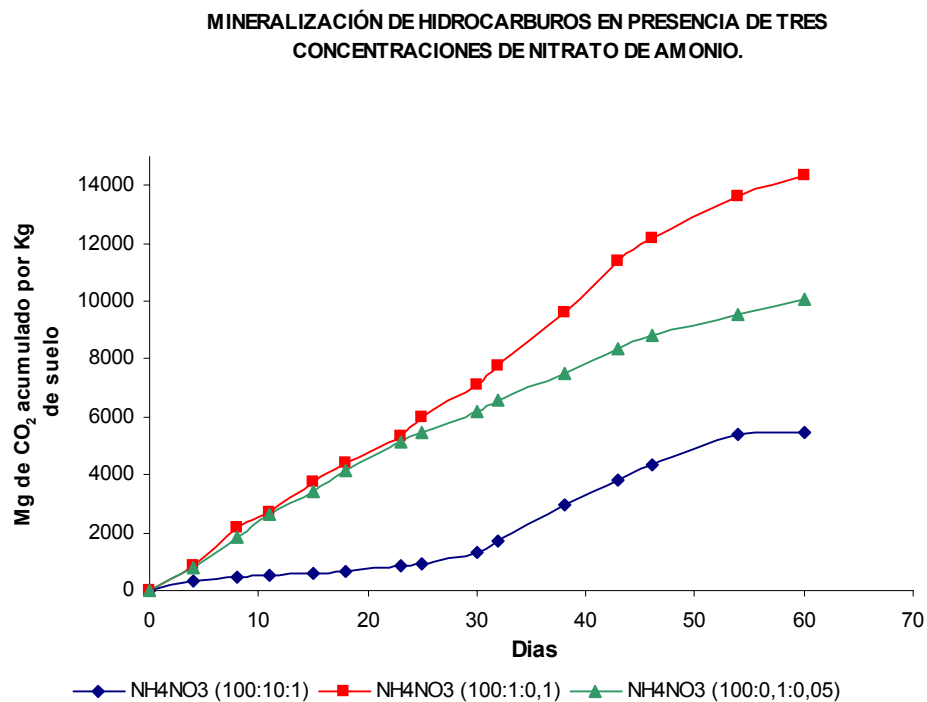


Figura 3: Sulfato de amonio en tres concentraciones:

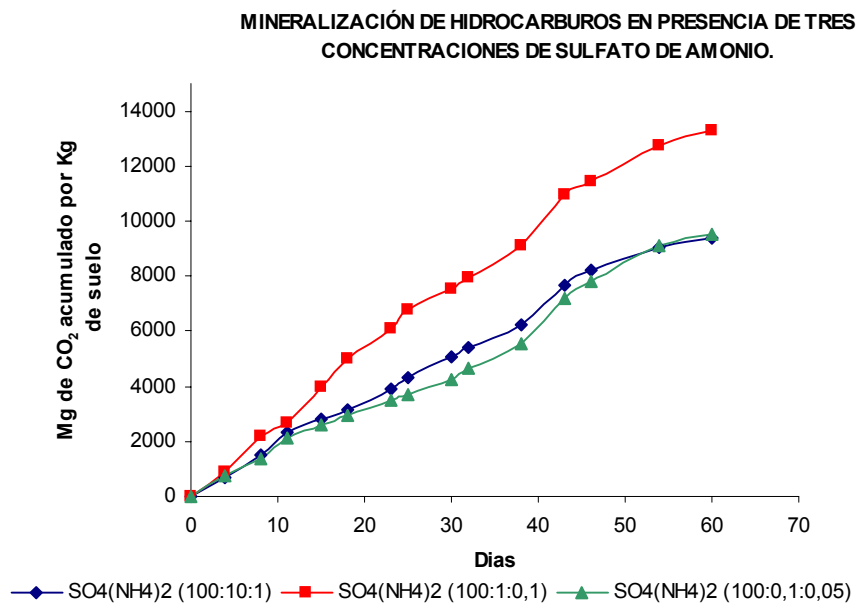


Figura 4: Nitrato de potasio en cuatro concentraciones:

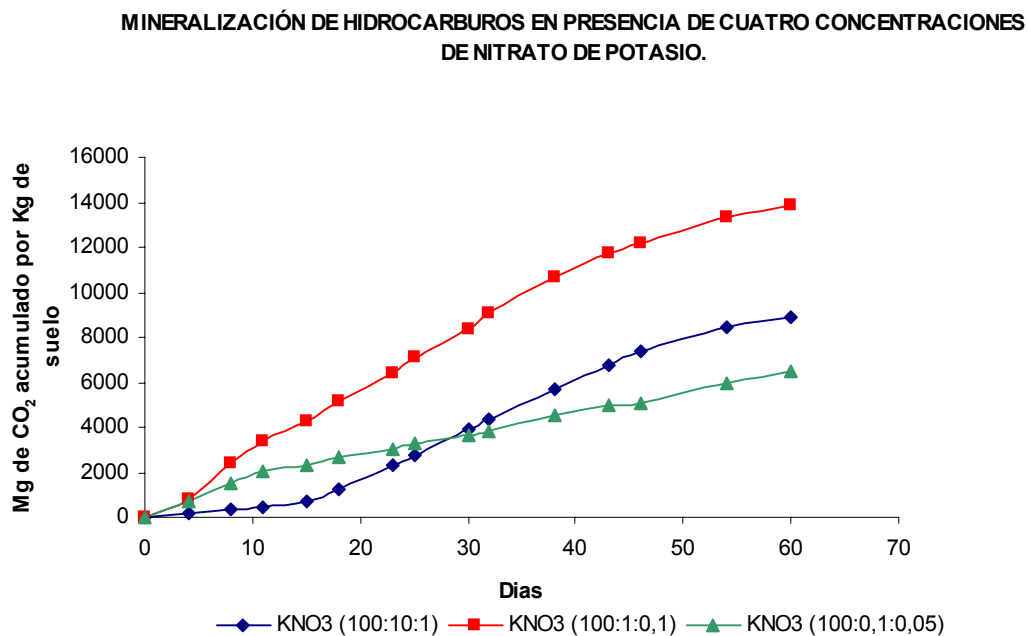


Figura 5: Urea en tres concentraciones:

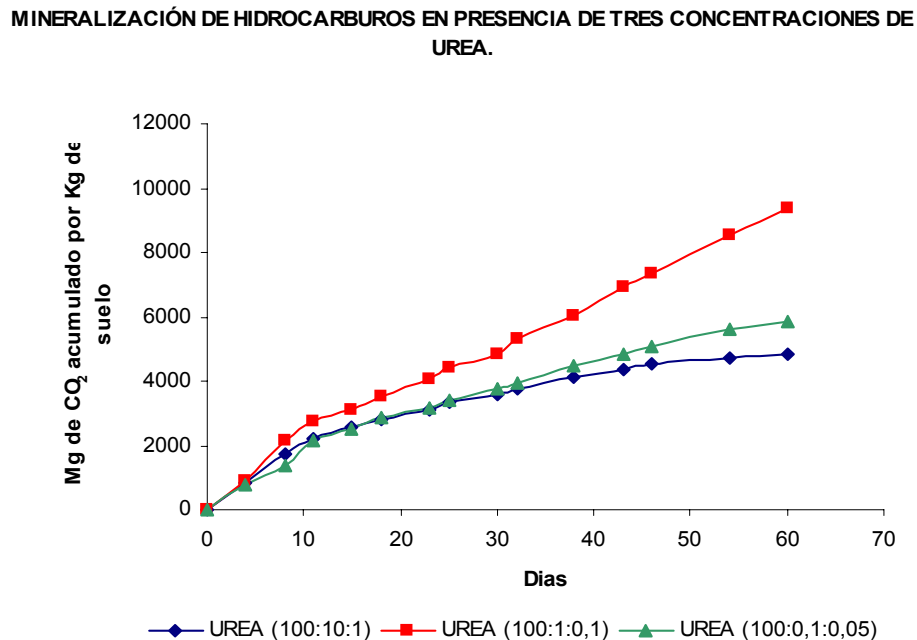


Figura 6: Mineralización con cuatro fuentes de Nitrógeno, con relación 100:10: 1 , 100:1: 0.1 y 100:0.1:0.05

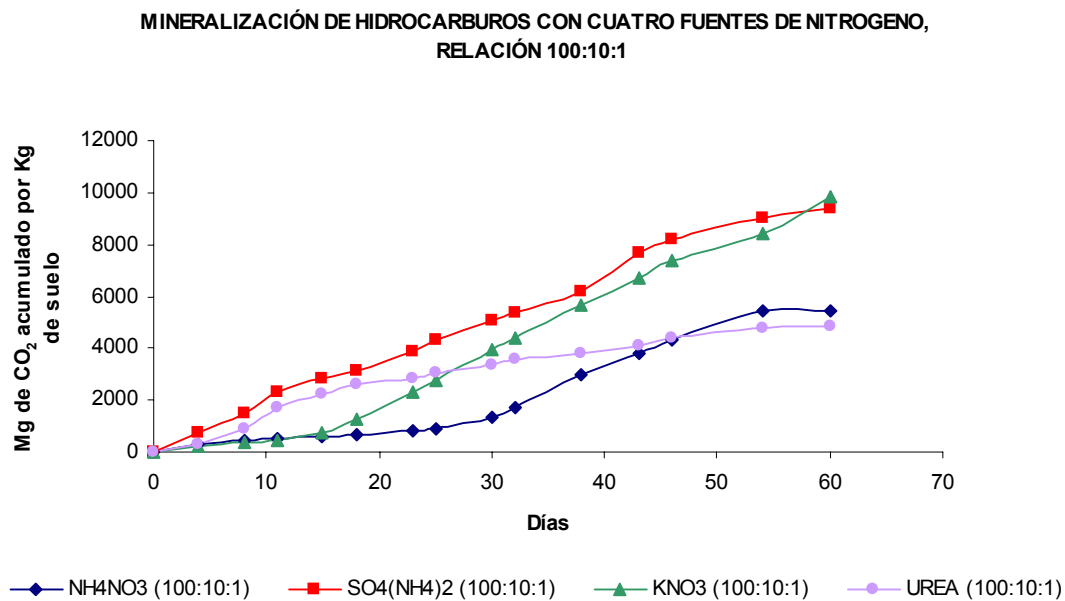


Figura 7: Mineralización con cuatro fuentes de Nitrógeno, con relación 100:1: 0.1

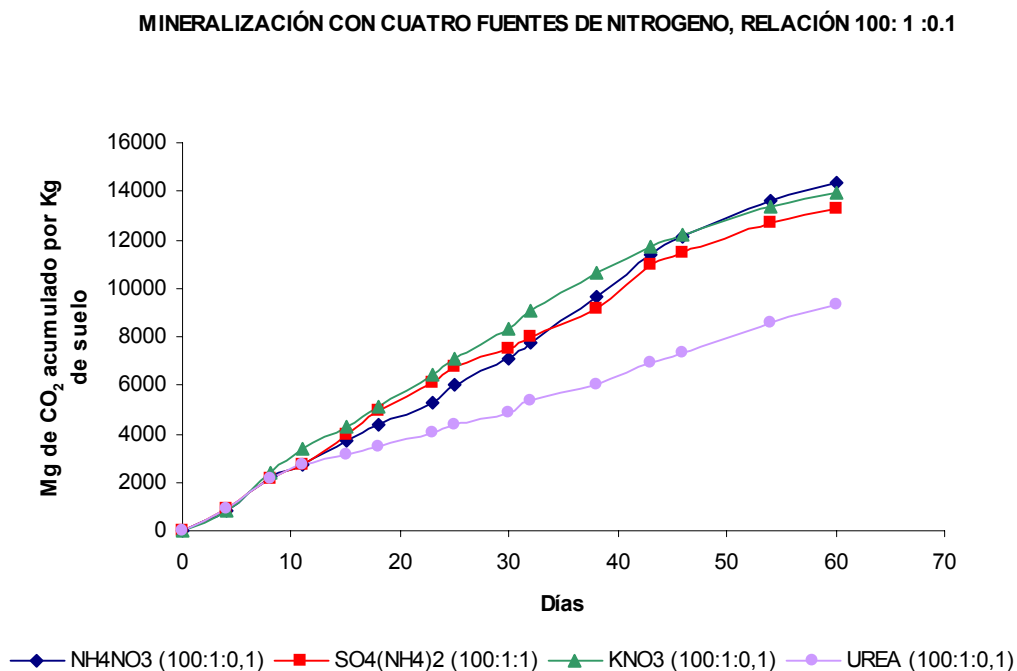
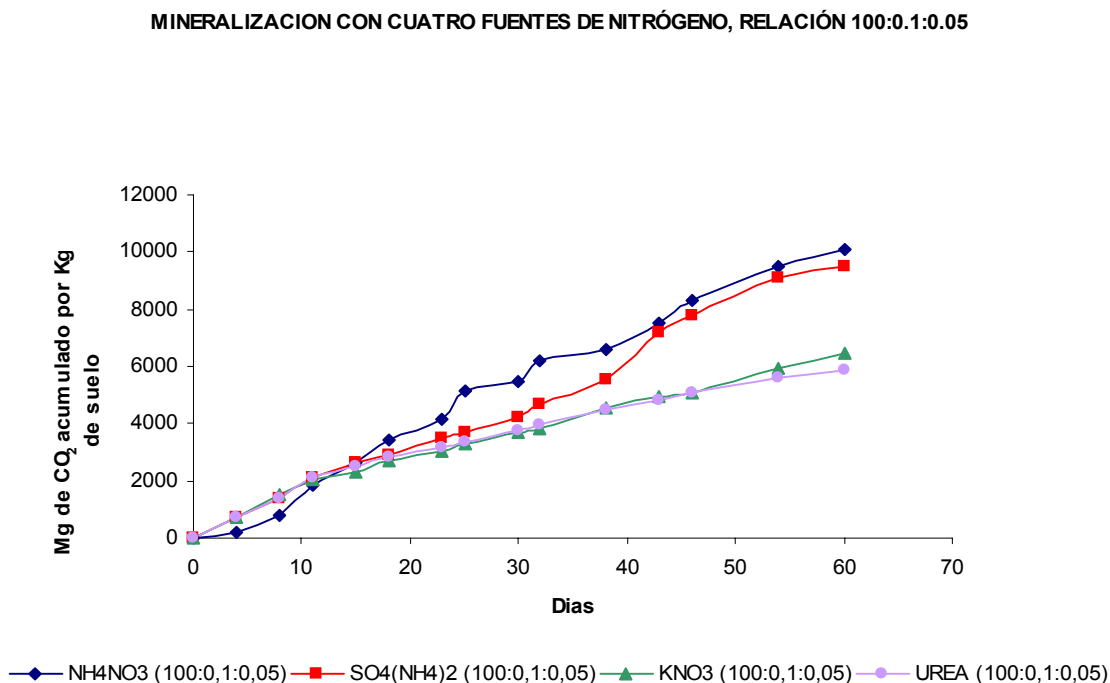


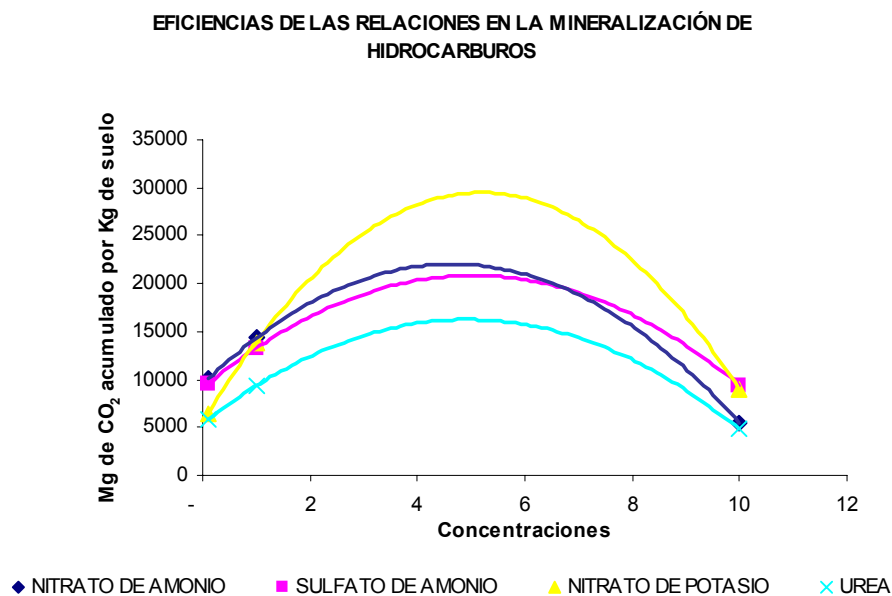
Figura 8: Mineralización con cuatro fuentes de Nitrógeno, con relación 100:0.1:0.05



Eficiencia de las relaciones en la mineralización de Hidrocarburos:

Se pueden apreciar las curvas de producción de dióxido de carbono por parte de la comunidad bacteriana. (Figura 9)

Figura 9: Concentración óptima de cada compuesto, mediante las líneas de tendencia.



Discusión:

El suelo en estudio tiene un largo antecedente de contaminación. El análisis físico-químico del hábitat nos indica que tiene buenas características para la biorremediación y una dotación bacteriana adaptada a la presencia de hidrocarburos, las enumeraciones de bacterias heterótrofas que crecen en R₂A y a expensas de hidrocarburos, tienen el mismo grado de magnitud, 10⁶ (Tabla 1 a y b), lo que reafirma el alto grado de adaptación de la comunidad.

La composición del hidrocarburo agregado contiene principalmente hidrocarburos de C₉ a C₂₂, con un elevado porcentaje de pristano y la presencia del hidrocarburo poliaromático fenantreno, compuestos que permitieron una buena cinética de degradación con los diferentes fertilizantes utilizados. (Figura 1)

El efecto del nitrato de amonio como fertilizante, lo muestra la figura 2, y se aprecian las tres curvas de cinética de mineralización donde claramente aparece la relación C:N:P (100:1:0.1) como la más efectiva en términos de velocidad. Para la mayor relación C:N:P (100:10:1) fue necesario una fase lag o de retardo ante el efecto adverso producido por la cantidad de nitrógeno agregado. Las otras dos relaciones no tienen fase de retardo, y, si bien en los primeros treinta días no hay diferencias significativas, a partir de ese tiempo se comienza a producir una diferencia considerable en su mineralización. La mineralización en términos de producción de CO₂ por kilogramo de suelo estudiado, equivalen a 1.75 gr. de hidrocarburo mineralizado con relación de C:N:P (100:10:1), a 4.60 gr. de la relación C:N:P (100:1:0.1), y a 3.23 gr. de la relación C:N:P (100:0.1:0.05), de estos datos y de los porcentajes de degradación se puede inferir que la mayor parte de los hidrocarburos produjo biomasa, ya sea en forma directa o por utilización del dióxido de carbono por otras bacterias.

La mineralización asistida con sulfato de amonio, lo demuestra la figura 3. En ninguna de las relaciones hay fase de adaptación o retardo; en este caso las relaciones de C:N:P (100:10:1) y (100:1:0.1) tienen valores muy semejantes siendo la más importante la relación C:N:P (100:1:0.1). La mineralización en términos de producción de CO₂ por kilogramo de suelo estudiado, equivalen a 3.00 gr. de hidrocarburo mineralizado con relación de C:N:P (100:10:1), a 4.25 gr. de la relación de C:N:P (100:1:0.1), y a 3.00 gr. de la relación C:N:P (100:0.1:0.05). Aquí también son aplicables las consideraciones efectuadas para el nitrato de amonio.

En la figura 4 se aprecian tres curvas de cinética de mineralización, con la utilización de nitrato de potasio, en donde la relación de C:N:P más efectiva es (100:1:0.1), seguida por la relación (100:10:1). También se puede observar que aquellas relaciones más concentradas presentan una fase de retardo, siendo que la otra, menos concentrada, no. La mineralización en términos de producción de CO₂ por kilogramo de suelo estudiado, equivalen a 2.85 gr. de hidrocarburo mineralizado con relación de C:N:P (100:10:1), a 4.47 gr. de la relación de C:N:P (100:1:0.1), y a 2.10 gr. de la relación C:N:P (100:0.1:0.05).

En la figura 5 se observan las tres curvas de mineralización correspondientes a la utilización de urea, donde se ve que ninguna de las tres curvas ha superado los 10000 mg de CO₂ por Kg. de suelo ensayado, siendo que las anteriores han llegado a casi 14000 mg de CO₂ producidos por Kg. de suelo ensayado. Así mismo, la relación más

efectiva es (100:1:0.1), seguido por la relación C:N:P (100:0.1:0.05) y por ultimo la relación más concentrada (100:10:1). Sin notarse en ninguna de las curvas fase de adaptación. La mineralización en términos de producción de CO₂ por kilogramo de suelo estudiado, equivalen a 1.54 gr. de hidrocarburo mineralizado con relación de C:N:P (100:10:1), a 3.00 gr. de la relación de C:N:P (100:1:0.1), y a 1.88 gr. de la relación C:N:P (100:0.1:0.05).

La figura 6 nos muestra las curvas de mineralización de cuatro fuentes de nitrógeno, con una relación de C:N:P (100:10:1). Si bien el nitrato de potasio presenta una fase de retardo, que implica una adaptación al ion nitrato, es la fuente de nitrógeno que en estas proporciones llega al mejor resultado, en términos de mg de CO₂ por Kg. de suelo, seguido por el sulfato de amonio, no siendo tan efectivos en esta concentración el nitrato de amonio y la urea. Se nota que las altas concentraciones de nitrato, serían las responsables de algún tipo de inhibición temporaria de los microorganismos, produciendo fases lag más extensas que con las otras fuentes; en el caso del nitrato de amonio se sumaría el alto contenido de nitrógeno total.

La figura 7 demuestra el comportamiento de la mineralización con cuatro fuentes de nitrógeno en una relación C:N:P (100:1:0.1). Dentro de los primeros diez días de estudio se obtienen los mismos resultados y a partir de ese momento, se marca una diferencia significativa, entre los compuestos más efectivos en esta relación, que son nitrato de potasio, nitrato de amonio, sulfato de amonio con valores similares, y el comportamiento correspondiente a la urea, que no es tan efectiva.

Las curvas correspondientes a cuatro fuentes de nitrógeno con relación de C:N:P (100:0.1:0.05) (Figura 8). Se ve que los compuestos que presentan mejores resultados en bajas concentraciones son nitrato de amonio y sulfato de amonio, no siendo así con nitrato de potasio y urea.

En el análisis de la posible producción de dióxido de carbono en relación a la concentración (Figura 9) el nitrato de potasio a una concentración del cinco por ciento en relación al carbono sería el más efectivo, los otros compuestos serían igualmente más efectivos en iguales concentraciones.

Conclusión:

1ª) Altas concentraciones del ion nitrato causarían un período de adaptación mayor a otras fuentes de nitrógeno.

2ª) a pesar de (1ª) el nitrato de potasio tendría la mayor eficiencia en mineralización; y el porcentaje de biodegradación más alto de hidrocarburos de C₁₂ a C₃₀.

3ª) La proporción más efectiva para todos los compuestos ensayados es 100:1:0.1

4ª) Los porcentajes de biodegradación de hidrocarburos de C₁₂ a C₃₀ ha sido muy elevada.

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. Microbiol.* 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 Analysis*. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany. Pág. 229-233.

Fresenius W, Quentin K, Scvneider (1988) *Water Analysis*. 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. Pág. 22-27.

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

Standard Methods for examinations of Water 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.