

POSIBILIDADES DE BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS EN PRESENCIA DE METALES PESADOS

Oscar Héctor Pucci¹, Nadia Jodor¹, Graciela Natalia Pucci¹,
Volker Riis² y Wolfgang Babel²,

¹CEIMA-Facultad de Ciencias Naturales-Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco
Comodoro Rivadavia – Argentina ceima@unpata.edu.ar

²Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH Leipzig -Alemania

Resumen

Las contaminaciones cruzadas hidrocarburos-metales pesados presentan una complicación adicional al potenciarse las toxicidades de ambos contaminantes.

La presencia de cantidades importantes de plomo, cobre, cromo, cinc y níquel, tienen un marcado efecto inhibitorio sobre el desarrollo bacteriano.

En este trabajo se estudió un suelo con contaminación cruzada de hidrocarburos y los metales pesados indicados más arriba (que presentan concentraciones significativas), en biorreactores en fase sólida. Se diseñaron sistemas que comprendían, solo al residuo, al residuo adicionado de gasoil, y al uso de quelantes de metales pesados para disminuir su biodisponibilidad. Los metales pesados fueron los presentes en el suelo.

Introducción

Las Contaminaciones del medio ambiente se agravan cuando los contaminantes se suman, especialmente si pertenecen a categorías diferentes como hidrocarburos y metales pesados.

La eficiencia de los métodos biológicos en reducir la contaminación por hidrocarburos alifáticos, aromáticos y algunos destilados del petróleo, bajo condiciones poco propicias, ha sido ampliamente comunicada (Pucci et al., 2000; Pucci et al., 2002), otros componentes del petróleo pueden ser eliminados por métodos biológicos pero no son eficientes en cuanto a la velocidad por lo que se los considera no aptos para el tratamiento biológico. (Pucci y Pucci, 2003).

La relación entre los microorganismos y los metales pesados tienen muchas facetas, la resistencia a los segundos por parte de los primeros indican que pueden coexistir bajo ciertas circunstancias. En todos los casos, salvo en los procesos de precipitación biológica, el uso de microorganismos no permite eliminar los metales pesados del medio.

Un medio apto para la eliminación de metales pesados es la fitorremediación, que en general es una bioacumulación del metal pesado en raíces o follaje de plantas, no todas las plantas resisten concentraciones importantes de hidrocarburos. Por lo que el paso previo de la biorremediación es una condición acertada para el saneamiento del lugar y la incineración de suelos contaminados por hidrocarburos y metales pesados, si bien elimina a los primeros, transforma al suelo en escoria y no puede efectuarse una fitorremediación sino que hay que proceder a un costoso lavado del suelo.

En el presente trabajo se estudio las posibilidades y límites que tiene la biodegradación de hidrocarburos en suelos y barros que también tienen contaminación por metales pesados.

Desarrollo

Las determinaciones de las características del ecosistema fueron comunicadas en trabajos anteriores. (Pucci et al., 2000; Riis et al., 2002; Pucci y Pucci, 2003).

Las determinaciones de metales pesados se efectuaron por absorción atómica o ICP. (Riis et al., 2002).

Los análisis de HC son los descriptos en trabajos anteriores. (Pucci et al., 2000; Riis et al., 2002; Pucci y Pucci, 2003).

Características del hábitat:

Las características del hábitat indican que desde el punto de vista de su aspecto físico es posible una buena degradación. En el aspecto químico, sobresale la alta concentración de sulfato y de magnesio y la excesiva cantidad de hierro 27,5 g% y la presencia de los metales pesados, todos considerados muy tóxicos, podrían ser causa de un bajo nivel de biodegradación o anularla. El contenido de nutrientes nitrogenados es adecuado. El contenido de hidrocarburos es alto y su composición por cromatografía en columna indica una composición factible para la biorremediación. (Tabla 1)

La comunidad bacteriana heterotrófica está en niveles habituales de suelos contaminados, indicaría una posibilidad cierta de una buena eliminación de los hidrocarburos.

Tabla N° 1: Características físicas-químicas y microbiológicas del sistema estudiado.

1.A. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS:		
humedad (%)	25,5	
ph	7,4	
residuo orgánico (%)	10,16	
residuo inorgánico (%)	89,84	
densidad aparente (g/ml)	0,96	
densidad real (g/ml)	1,71	
porosidad	0,44	
capac. retención de agua (gh ₂ o/g suelo)		
1.b. contenido de aniones y cationes:		meq / kg
carbonatos (ppm)	0	0
bicarbonatos (ppm)	422	6,92
sulfatos (ppm)	1691	35,23
cloruros (ppm)	618	17,43
calcio (ppm)	429	21,45
magnesio (ppm)	195	16,25
bario (ppm)	130	1,90
cadmio (ppm)	9,3	0,17
manganeso (ppm)	1700	61,82
plomo (ppm)	234,5	2,27
cinc (ppm)	273	8,40
níquel (ppm)	55,6	1,88
hierro (%)	27,5	1478,5
cobre (ppm)	141	4,48
cromo (ppm)	165,5	9,55
sodio (ppm)	2584	112,35
potasio (ppm)	109,8	2,75
1.c. contenido de nutrientes:		
amonio (ppm)	6,44	
nitratos (ppm)	24,4	
fosfatos (ppm)	no detectado	
urea (ppm)	4,67	
1.d. contenido de hidrocarburos:		
hc. totales (%)	7,15	
hc. alifáticos (%)	44,34	
hc. aromáticos (%)	28,93	
hc. asfálticos (%)	26,73	
1.e. contenido de microorganismos (ufc/g):		
bacteria aerobias totales	6,2 x 10 ⁶	
bacterias degradadoras de hc.	1,1 x 10 ⁶	

Acción de los metales pesados en el desarrollo bacteriano:

La influencia de los principales metales pesados sobre el desarrollo de las bacterias se muestra en la tabla N° 2. El cromo tiene un efecto inhibidor que se incrementa con la concentración.

El hierro a 500 ppm o más inhibe el desarrollo y a 250 ó menos no ejerce efecto significativo sobre la comunidad.

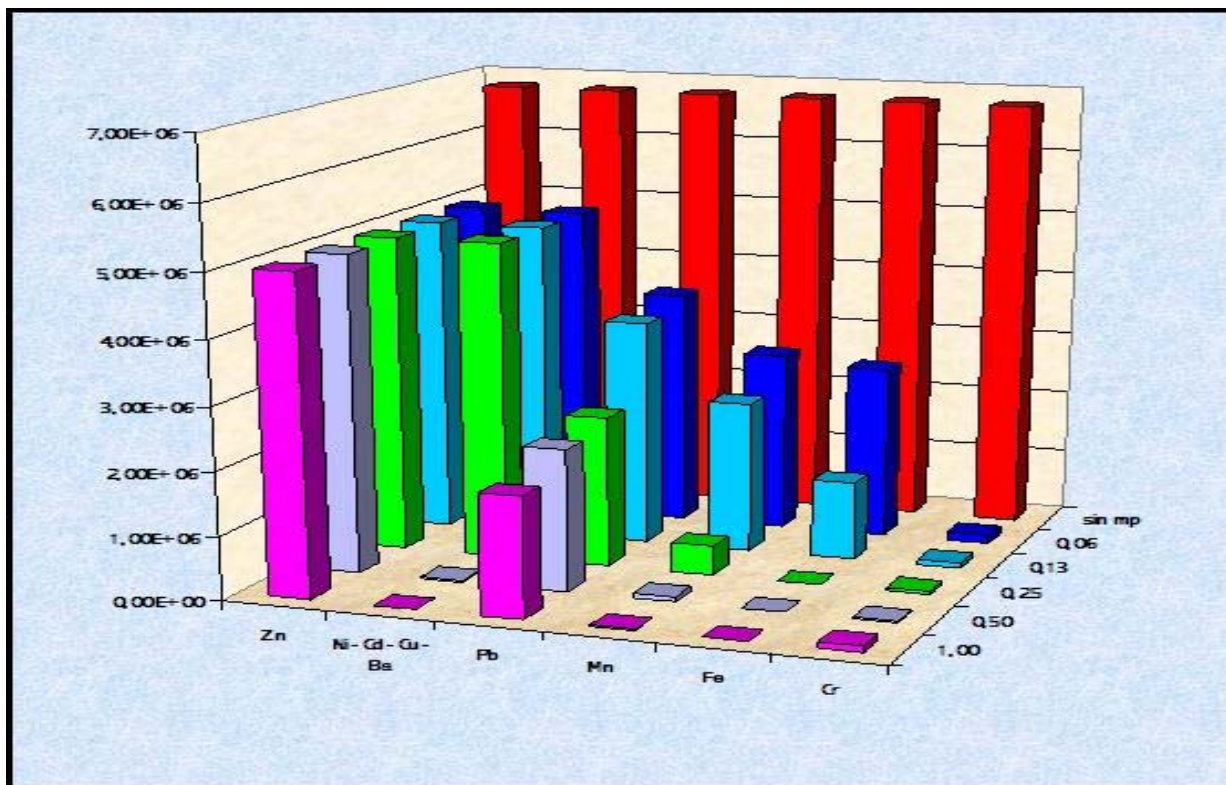
El plomo no parece ejercer una acción inhibitoria, pero al haber realizado estas determinaciones en medios sólidos puede haber interacciones entre los componentes del medio y el plomo, no dejándolo totalmente biodisponible. El cinc no ejerce efecto sobre la comunidad.

El manganeso si bien no tiene una toxicidad declarada, concentraciones superiores a 425 ppm. Tienen un efecto inhibitorio leve.

La mezcla al Ni Cd Cu Ba (55:9:140:30) inhibe en forma total el desarrollo de la comunidad. Reduciendo la concentración a la mitad, permite el desarrollo del orden de 10^4 colonias/gr. Y una concentración de 25% prácticamente no ejerce influencia en el número de bacterias.

Este ensayo demuestra que la comunidad extraída del suelo estudiado tiene sensibilidades diferenciales frente a los cationes ensayados en medios gelificados con agar y en ausencia de suelo, esta aclaración tiene suma importancia debido a que se trata de la comunidad cultivable, que es la más activa desde el punto de vista metabólico, y que en este ensayo están ausentes componentes del suelo que pueden modificar la acción de los metales pesados.

Figura 1: influencia de la concentración los metales pesados en el desarrrollo de bacterias en medio de cultivo R2A



Perfil de degradación de hidrocarburos (capacidad de eliminación de hidrocarburos individuales o mezclas:

En base a los resultados del ensayo anterior se efectuaron experiencias de perfiles de degradación de la comunidad extraída frente a hidrocarburos en presencia y ausencia de metales pesados (tabla N° 2) utilizando las concentraciones de Ni: Cd: Cu: Ba (27:4,5:70:15) y cromato (40 mgr de cromo).

De los hidrocarburos ensayados, el kerosén, el gasoil el pentadecano normal y el hexadecano normal se utilizan prácticamente sin diferencias tanto en presencia como en ausencia de metales pesados.

Hay hidrocarburos los utiliza la comunidad extraída en ausencia de metales pesados, pero la presencia de metales pesados disminuye o elimina su utilización

Otros hidrocarburos, que no se presentan en la tabla 2, no se utilizaron por la comunidad extraída ni en ausencia ni en presencia de metales pesados (ciclohexano, cyclohexanona, benceno, tolueno, xileno, naftaleno, antraceno, fenantreno y compuestos polares.

La presencia de metales pesados tiene un efecto importante especialmente sobre los hidrocarburos más conflictivos, como lo son el pentano y hexano, tóxicos de membranas celulares bacterianas.

Tabla N° 2: Perfil de degradación de hidrocarburos por la comunidad del suelo en presencia y ausencia de metales pesados

Hidrocarburo	MBM	TM Cr	TM NCC
petróleo crudo	++	w	-
nafta	++	w	+
kerosén	++	++	++
gasoil	++	++	++
parafina	+	w	w
aceite lubricante	+	w	w
n-pentano	++	-	w
n-hexano	++	-	w
n-heptano	-	-	w
n-octano	+	-	w
n-pentadecano	+	++	++
n-hexadecano	+++	++	++
pristano	+++	+	++
residuo *)	+	-	w

*) hidrocarburos extraídos del suelo contaminado

MBM: Medio Base Mineral; TM Cr: TRIS medium + Cr

TMNCC: TRIS medium + Ni + Cu + Cd

+++ turbidez abundante; ++ turbidez moderada.; + turbidez baja; w turbidez muy baja. - turbidez imperceptible.

Influencias en la cuantificación de metales pesados,:

La cuantificación de metales pesados en suelos depende del método de extracción que se use. Sólo los métodos drásticos permiten conocer la cantidad total. Estos métodos no están presentes en la naturaleza, los comparables a ellos serían los que se efectúan con NO_3NH_4 1 M a pH 4,85, cal (acetato y lactato de C a pH 4,1, EDTA 0,1 M a pH 4,4, Citrato de Na 0,4 M a pH 5,0, o Tris 0,1 M a pH 7,4. Ninguno de estos métodos puede poner en evidencia la cantidad total de metales pesados (Ver tabla N° 3).

Este ensayo pone en evidencia la dicotomía que se produce entre la cantidad real y la que está disponible para ejercer la acción tóxica, especialmente sobre bacterias que para que ejerzan su acción tanto nutrientes como tóxicos tienen que ser solubles en agua y en un rango de pH que permita la vida.

Tabla N° 3: Extracción de metales pesados en suelos por diferentes métodos extractivos:

Método de Extracción	CrO_4^{2-}	Mn^{2+}	Ni^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Cd^{2+}	Pb^{2+}
	Contenido Total en suelo [ppm]						
Digestión con HNO_3 / microondas	306	2099	97	150	407	< 10	208
	416	2680	117	244	638	2	258
	Cantidad Extraída [%]						
Agua	$\cong 0$	0.003	0.006	0.005	0.002	0.01	$\cong 0$
1 M NH_4NO_3 pH 4.85	< 0.02	0.02	0.05	< 0.04	0.01	< 5	< 0.10
CAL ¹⁾ pH 4.1	0.06	2.0	2.0	3.4	5.0	7.5	< 0.10
M EDTA- Na_2 PH 4.4	< 0.02	10.1	4.8	12.7	10.6	18.5	8.3
0.1 M Na-citrato pH 5.0	0.05	5.7	3.1	7.1	4.3	7.5	0.11
0.1 M TRIS pH 7.4	< 0.02	0.003	< 0.03	0.05	0.007	< 5	< 0.10

¹⁾ calcio acetato/lactato (cada uno 0.05 M + 0.3 M ácido acético)

Ensayos de biodisponibilidad de metales pesados:

La pérdida de la inhibición por metales pesados en el suelo es obviamente un asunto de falta de biodisponibilidad. Ellos existen en precipitados o están complejados en la matriz del suelo (por adsorción o intercambio catiónico) o enmascarados por agentes complejantes. En este trabajo hemos determinado la porción soluble de metales pesados del suelo de usando diferentes agentes (tabla 4). La fracción soluble en agua pura es menor a 0,01%.

Tabla N° 4: Solubilidad de metales pesados en diferentes medios nutritivos y suspensiones de suelo. Se adicionó 40 ppm níquel, 70 ppm cobre y 5 ppm cadmio a los medios con excepción de 20 mM MES medium, al cual se agregaron 29 ppm Ni, 32 ppm Cu and 5,6 ppm Cd (0.5 mM cada uno).

Medio	Suelo	Capacidad de intercambio catiónico	Níquel	Cobre	Cadmio
		[mval/100 g d.m.]	% del valor teórico		
10 mM TRIS ¹⁾	-----	-----	72	23	19
50 mM TRIS ¹⁾	-----	-----	91	97	119
10 mM MES ¹⁾	-----	-----	82	34	44
20 mM MES ¹⁾	-----	-----	85	45	82
Sólo para comparar: MM-UFZ ¹⁾ contiene 10 mM buffer fosfato pH 7.0			75	5.8	6.5
50 mM TRIS	Compost	26.6	7.1	0.9	12
20 mM MES			10	2.5	23
50 mM TRIS	Suelo de Acería	19.1	11	8.7	5.6
20 mM MES			22	4.3	29
50 mM TRIS	Suelo agrícola	8.88	19	7.1	8.2
10 mM MES			7.4	0.8	16
20 mM MES			47	4.4	55

¹⁾ en caso de formación de precipitados suaves se determinó la concentración en el filtrado.

Con excepción del EDTA, en los demás casos las porciones fueron menores al 10%. El EDTA es un excelente formador de complejos y es capaz de extraer más metales pesados, pero debe tenerse en cuenta que los metales fuertemente complejados tampoco son biodisponibles. la toxicidad del metal puede disminuirse por adición de EDTA.

En ensayos adicionales de biodisponibilidad de metales pesados hemos determinado la porción soluble de los mismos en diferentes medios y la cantidad que se recupera luego de agitarlos con muestras de suelo (tabla N° 4). Hay una disminución significativa

Un problema importante al preparar los medios de cultivo minerales que contiene metales pesados es la necesidad de fosfatos como condición para el desarrollo bacteriano. Los fosfatos de metales pesados son escasamente solubles (la formación de precipitados es casi inevitable). Por ello la cantidad de fosfato se reduce al mínimo, esto agrega otra limitación a la utilización de hidrocarburos por parte de las bacterias.

El uso de complejantes para solubilizar metales pesados presenta resultados diferentes de acuerdo a la molécula de que se trate y a la concentración usada. En la tabla N° 5, se expresan (solubilidades) las extraídas con EDTA TRIS y MES de medio de cultivo y de tres diferentes tipos de suelo.

Inhibición por metales pesados de la utilización de hidrocarburos por la comunidad extraída en medio líquido.

A partir de esos estudios de disponibilidad de los metales pesados se diseñó un sistema de biodegradación en medio líquido que se estudió durante 1.800 horas (75 días). Las curvas de degradación se presentan en la figura 2.

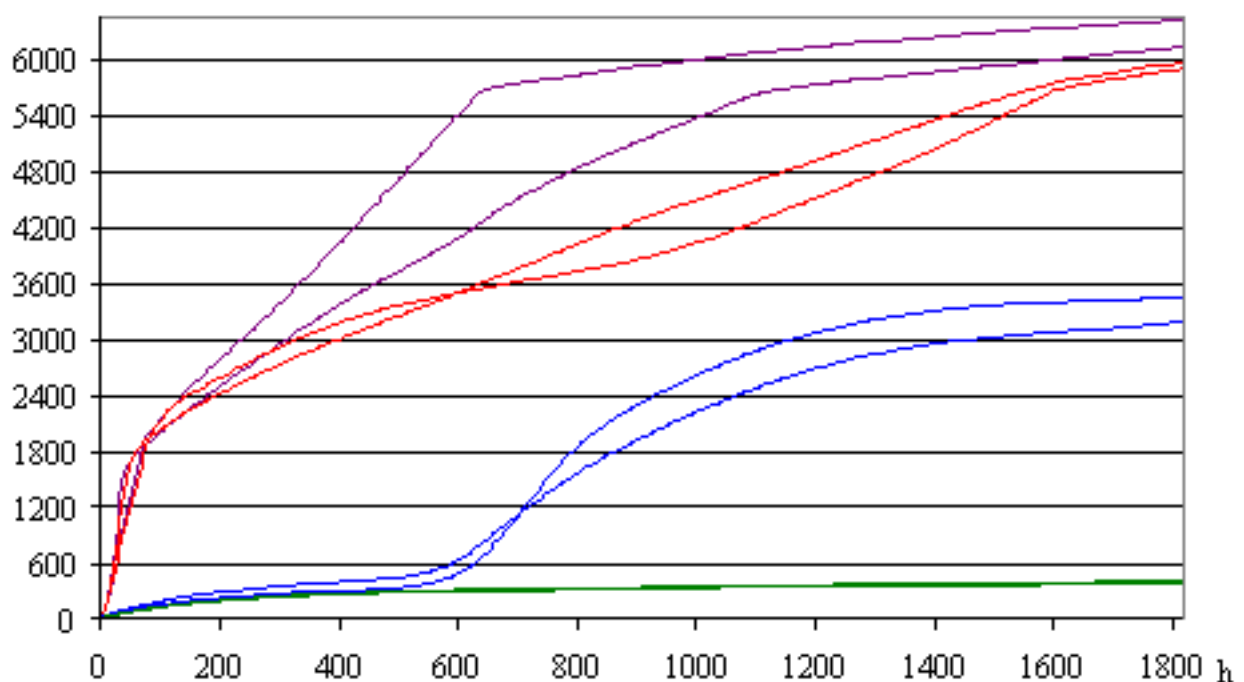
Por medio del sistema de respirometría, se determinó la inhibición de la respiración que producía una mezcla de níquel, cobre y cadmio (27:70:4,5 ppm) en tres concentraciones, la indicada, reducida a la mitad y reducida a un cuarto, en la figura 2 se exponen los resultados de la concentración + EDTA inhibe la respiración de la comunidad extraída, la concentración media produce una inhibición moderada pero con una fase de retardo de aproximadamente 600 horas.

El consumo de oxígeno del medio de cultivo sin metales pesados y cromato tiene un comportamiento similar.

Este resultado remarca la importancia de la biodisponibilidad ya que en estos medios la disponibilidad de los metales pesados es del 100%.

Figura N° 2: Respiración de la comunidad extracta del suelo en presencia de Ni, 27 ppm; Cu:70 ppm; Cd 4,5 ppm, usando maltenos (petróleo desasfaltado) como fuente de carbono y energía.

mgO₂/l

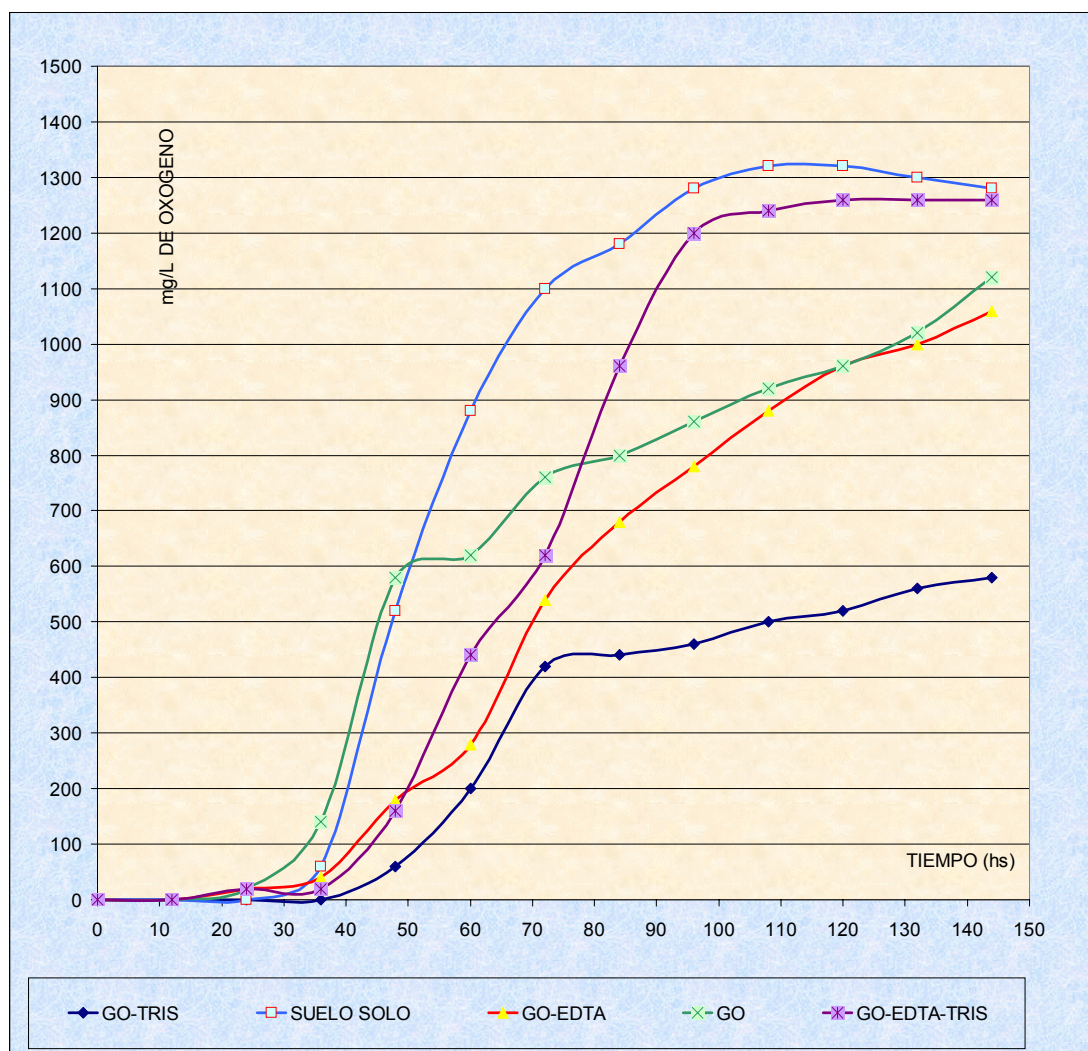


Acción de los agentes quelantes sobre la cinética de degradación de HC:

Otro inconveniente que presentan estas comunicaciones dobles es que los agentes que pueden disminuir la biodisponibilidad de metales pesados como Tris y Edta tienen un efecto inhibitorio en la comunidad como lo demuestra el ensayo de la figura 2. En el que se ensayo cinco posibilidades todas contenían suelo con HC y HM, a cuatro se les agregó gasoil y a tres

de estos últimos se le agrego gasoil y con agregado de tris, edta y tris + edta. En un período de 150 horas se muestra una inhibición por efecto de los quelantes. (Figura N° 3).

Figura N° 3: Es estudio de la biodegradación se efectúo sobre el suelo contaminado con hidrocarburos y metales pesados con el agregado de gasoil por el método de consumo de oxígeno (OxiTop®).



A partir de las placas de recuento de bacterias que utilizan como fuente de carbono y energía al petróleo – gasoil, se aislaron treinta y tres cepas que fueron sometidos a pruebas de tolerancia a los metales pesados en medio líquido, con disponibilidad total de los metales pesados. Los resultados se indican en la Tabla N° 5.

Las cepas tienen una marcada diferencia de sensibilidad a los metales pesados, en algunos casos toleran concentraciones altas de algún metal y no desarrollan en la concentración mínima de los otros como el caso de la cepa 16. Muchas de estas bacterias pertenecen al grupo de Pseudomonas fluorescentes, que la mayoría de ellas son consideradas patógenos oportunistas.

La conclusión de este ensayo indica que no es posible utilizar una cepa con resistencia múltiple a los metales pesados, capacidad de degradar hidrocarburos y que no sea sospechosa de ser patógeno oportunista.

Tabla N° 5.

cepa	Cobre [ppm]	Niquel [ppm]	Cromato [ppm]	Cadmio [ppm]
1	60	5	-	32
3	15	-	-	32
4	60	-	-	8
13	15	-	-	2
14		-	-	8
16	120	-	-	
19	30	5	-	16
20	60	-	-	8
22	60	5	-	16
E1	0	20	45	16
E2	60	20	22	32
E3	30	20		32
E4	15	40	90	16
E5	60	5		
E7	60	80	22	+32
E8	30	20	22	+32
E9	60	20	22	+32
E12	60	40	22	16
E14	30	20	44	16
BC5	60	5	-	32
BC8	30	5	-	32
BC10	30	5	22	8

Si bien todos los ensayos de biodisponibilidad y degradación en medio líquido en presencia de metales pesados aumentan nuestro conocimiento sobre la acción de contaminaciones dobles, la realidad está marcada por múltiples factores que solo pueden considerarse en ensayos con sistemas completos.

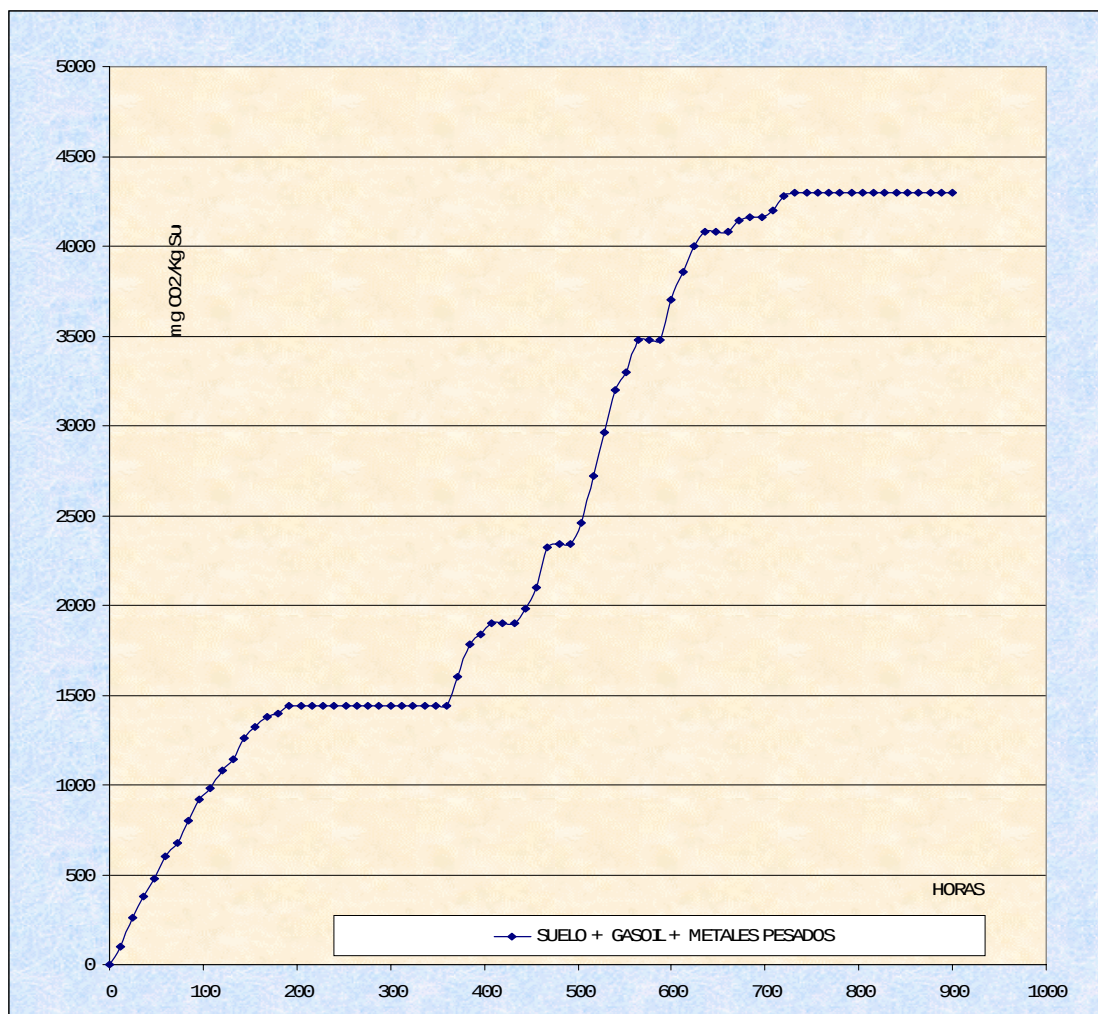
Biodegradación en biorreactores sólidos usando suelos con contaminación doble (hidrocarburos y metales pesados)

Se estudió la cinética de biodegradación del suelo contaminado por método respirométrico (utilizando sistema OxiTop ®) y analizando periódicamente, por cromatografía gaseosa la composición de hidrocarburos.

La cinética de degradación tiene dos fases muy marcadas, sin una fase de retardo. La primera de 0 a 200 horas (8 días aproximadamente) correspondería a utilización de los hidrocarburos presentes en el suelo y con un consumo de oxígeno algo inferior a 1500 mg O₂/kg suelo. Y la

otra entre las 400 y 700 horas (16 y 29 días aproximadamente) que correspondería al gasoil. Esta última es multiauxica. A partir de allí la comunidad entra en fase estacionaria y el consumo de oxígeno es de 4350 mg/kg suelo.

Figura N° 4: Cinética de degradación en biorreactores sólidos de suelos contaminados con hidrocarburos y metales pesados.



En la figura N° 6 se muestra el cromatograma testigo, antes de iniciar el proceso de biodegradación. La preparación de la muestra es compleja y se determinan los hidrocarburos saturados, cíclicos y aromáticos no polares. El grupo de compuestos polares y asfaltenos deben ser eliminados previo a la cromatografía gaseosa. En la figura N° 7 a los 10 días y en la figura N° 8 a los 30 días del proceso.

Figura N° 6: Composición de los hidrocarburos alifáticos del residuo a biodegradar

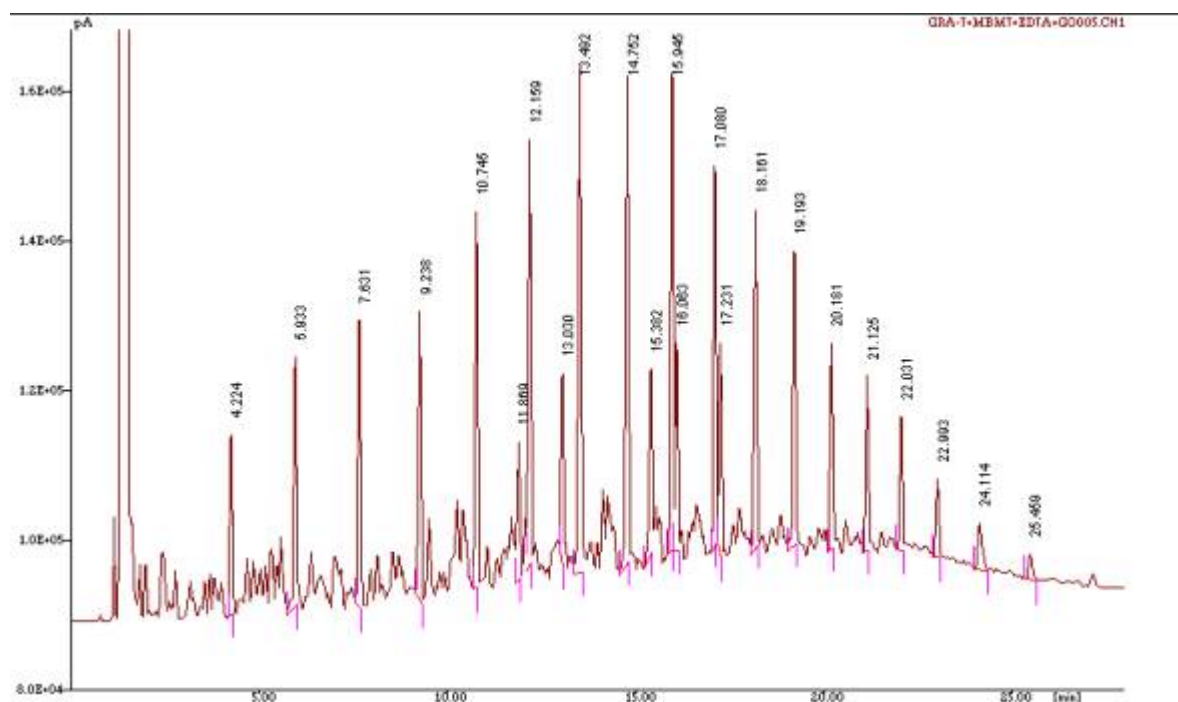


Figura n° 7: Hidrocarburos remanentes a los 10 días de biodegradación, durante la primera fase estacionaria del proceso.

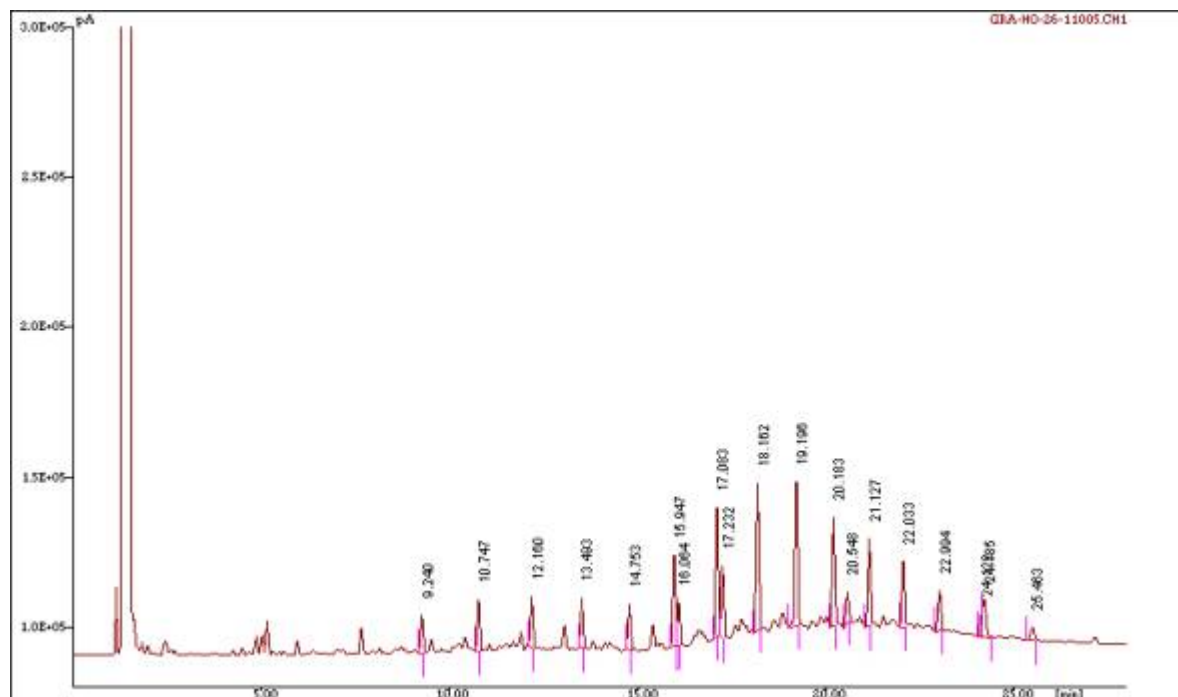
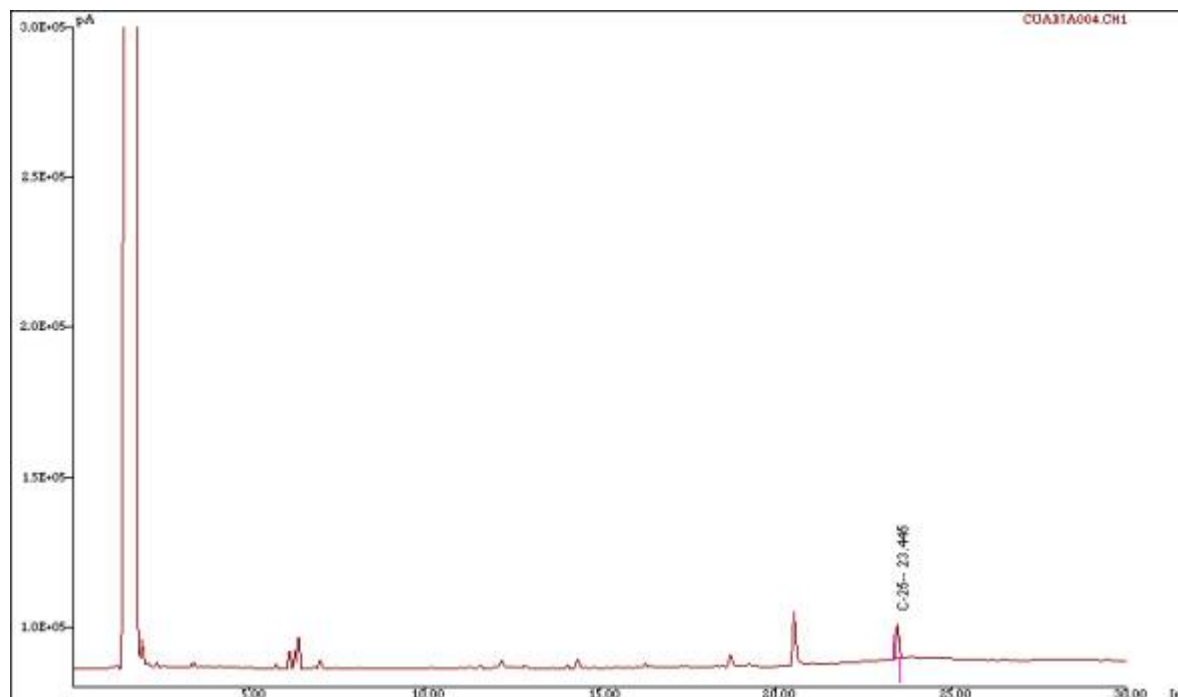


Figura n° 8: Hidrocarburos remanentes a los 30 días de biodegradación. La degradación de la fracción considerada es prácticamente total



CONCLUSIONES:

Los resultados muestran que:

- 1.- La biodegradación en suelos en presencia de metales pesados se realiza con un alto grado de eficiencia sobre los hidrocarburos totales del petróleo (que contienen de C9 a C30)
- 2.- Los agentes quelantes que disminuyen la biodisponibilidad de los metales pesados producen un efecto contrario al esperado inhibiendo en distinto grado la biodegradación.
- 3.- Cuando se aislaron cepas de comunidades, que degradaban hidrocarburos con alto grado de eficiencia, resultaron mucho menos efectivas en el tratamiento de hidrocarburos en presencia de metales pesados biodisponibles.

BIBLIOGRAFÍA:

Pucci, OH.; Bak, MA.; Peressutti, SR.; Klein, L; Härtig, C.; Alvarez, HM; Wünsche, 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, OH. 2002 "Influence of heavy metals on the microbial degradation of diesel fuel". Chemosphere, 49:559-568. 2002.

Pucci, GN. y Pucci, OH, 2003 "Biodegradabilidad de componentes de mezclas naturales de hidrocarburos previamente sometidos a landfarming". Revista Argentina de Microbiología, 35:62-68.