

INHIBICIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POR METALES PESADOS

Volker Riis¹, Wolfgang Babel¹, Graciela Natalia Pucci² y Oscar Héctor Pucci²

¹Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH - Leipzig -Alemania

²CEIMA - Facultad de Ciencias Naturales - Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco - Comodoro Rivadavia - Argentina

La resistencia a la toxicidad de los metales pesados por parte de las bacterias es un hecho bien documentado, al igual que la degradación de hidrocarburos.

En este trabajo se estudió el efecto del mercurio, cromo, cadmio, níquel, plomo y cinc sobre una comunidad extraída de suelo con contaminación cruzada de metales pesados e hidrocarburos. La experiencia se llevó a cabo en biorreactores líquidos y la cinética de degradación se determinó por consumo de oxígeno.

Los resultados muestran que si bien la degradación de hidrocarburos en medios líquidos es posible, los metales pesados ejercen diferentes acciones inhibitorias de acuerdo con la concentración y el metal de que se trate.

De los metales ensayados las acciones más inhibitorias corresponden a mercurio > cromo > cobre > cadmio > níquel > plomo > cinc.

Los resultados difieren de otra experiencia efectuada en fermentadores en fase sólida en que la acción inhibitoria no fue significativa, debido posiblemente a la acción secuestrante de las sustancias húmicas y a la interacción con los diferentes aniones que limitan la biodisponibilidad de los metales pesados.

Introducción

Lo sitios usados por la industria metalúrgica frecuentemente están contaminados con metales pesados y aceite de mineral. Este tipo de contaminación se presenta en áreas donde se producen derrames y el suelo ya contiene metales pesados o en sitios donde hay contaminaciones frecuentes con aceites de carter usados.

Hay suficiente literatura sobre la influencia de metales pesados (h.m.) sobre las actividades microbianas (por ejemplo respiración, luminescencia, incorporación de timidina y fijación de N₂) y también en el desarrollo de cepas individuales y comunidades (Giller et al., 1998). Sin embargo, es poco conocido el impacto de h.m. en la degradación de compuestos riesgosos. Reber (1992) ha determinado las capacidades degradativas de comunidades bacterianas de tierra para 20 compuestos aromáticos. El Cobre y níquel redujeron el número de sustancias utilizadas y la diversidad de bacteriocenosis. Kuo y Genther (1996) investigó el efecto de Cd, Cu, Hg y cromo en la degradación anaerobia de 2-clorofenol, 3-clorobenzoato, fenol y benzoato por los consorcios bacterianos de los sedimentos. La

dehalogenación, degradación de compuestos aromáticos y metanogénesis exhibieron sensibilidades diferentes a los iones de metal agregados. Degraffenreid y Shreve (1998) informó la degradación de tricloretileno por *Pseudomonas picketti* PK01 bajo condiciones de reducción de nitrato. En presencia de 5 ppm Cd, la biodegradación disminuyó en un 69%. Fijalkowska et al. (1998) investigaron la degradación de antraceno, fenantreno y pentacloro fenol por cepas aisladas en la presencia de Pb y Zn. La alta resistencia evidenciada sería debido a la precipitación del Pb^{2+} por el fosfato y sulfato presente en el medio. Smreczak et al. (1999) informó un aumento de la persistencia de hidrocarburos poliaromáticos después del agregado al suelo de Zn, Pb y Cd, ésta se acompañó con una disminución en las actividades microbianas. Sokhn y col (2001) encontraron que la degradación de fenentreno y la respiración microbiana disminuía con altas concentraciones de cobre.

En este trabajo se estudió la influencia de metales pesados en la degradación en biorreactores en fase líquida de combustible diesel (gasoil) por una comunidad autóctona extraída de una tierra contaminada con el aceite de mineral y los metales pesados, en ausencia de suelo.

Materiales y métodos:

El suelo estudiado tenía contaminación cruzada de hidrocarburos (tipo aceite lubricante) y metales pesados, los parámetros analíticos se expresan en la tabla 1.

Tabla 1. Los parámetros analíticos del suelo

Propiedades de fisicoquímicas			
humedad (%)	25.5	La densidad aparente (el g/ml)	0.96
pH	7.4	La densidad real (el g/ml)	1.71
material orgánico (%)	10.2	La porosidad	0.44
Cationes y aniones (ppm)			
amonio	6.4	cobre	141
magnesio	195	plomo	235
calcio	429	cromo (como el cromato)	166
bario	130	sodio	811
manganeso	1700	potasio	38
hierro	42000	carbonato/bicarbonato	422
cinc	273	Sulfato	1691
cadmio	9.3	cloruro	618
mercurio	< 2	nitrato	24.4
níquel	55.6	fosfato	< 5
Hidrocarburos, totales (%)			7.15
Saturados (%)			44.3
Aromáticos (%)			28.9
Asfaltenos + polares (%)			26.7

Los experimentos de degradación se llevaron a cabo con suspensiones celulares de microorganismos extraídos de la tierra. El medio de cultivo utilizado fue MES

(morfolinetano sulfónico + las sales minerales, pH 6,8) se adicionó con h.m. en las concentraciones < 1 mM. Se agregó 215 mg gasoil por frasco. El proceso de degradación se determinó por medio del consumo de oxígeno en U1 Respirometer (el IBUK Abwassertechnik Königsbrunn, Alemania). Todos los experimentos se llevaron a cabo dos veces o por triplicado. La concentración residual de gasoil luego de los ensayos fue determinada por espectrometría infrarrojo por método DIN 38409-H18.

Resultados

Degradación en barro.

Biodegradación en presencia de barro con y sin el agregado de Cu^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} se informa en la Tabla 2.

Tabla 2. La degradación de aceite mineral *) después de 4 semanas.

Medio MES + suelo + gasoil	El aceite mineral degradado	Porcentaje de degradación
sin agregar los metales pesados	732 mg	59.0%
+ 0.2 mM de cada metal	743 mg	60.0%
+ 0.5 mM de cada metal	727 mg	58.6%

Las diferencias en el grado de degradación están dentro del rango del error del método analítico usado. Teniendo presente que el tiempo del proceso fue 4 meses, el grado de degradación es considerable. El fracaso de la inhibición de las altas concentraciones de metales pesados (0,2 y 0,5 mM) se deberían a que no están biodisponibles en presencia de la tierra o barro. Habría posibilidades que justifiquen el resultado, a) precipitación por aniones incompatibles, b) adsorción o intercambio catiónico con la matriz de suelo y c) enmascarado por agentes quelantes.

Esto está de acuerdo con lo propuesto por Baldrian et al. (2000), quién no encontró el efecto en la degradación de PAH en tierra que contiene 10 a 100 ppm Cd o Hg. Smreczak et al. (1999) sólo encontró un efecto inhibitorio débil en la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos después del agregado altas concentraciones de Zn, Pb y Cd a un suelo.

Investigaciones de biodisponibilidad

Se determinaron las porciones solubles de h.m. del suelo usando diferentes agentes quelantes (Tabla 3). Con la excepción de EDTA, las biodisponibilidad eran más baja que 7.0%. El EDTA fue el mejor extractante, aunque debe tenerse en cuenta que se fijan fuertemente los cationes al complejante.

Tabla 3. Comparación de la concentración total de metales pesados y la fracción soluble (extractable)

El método del extracto	Analítico el método	CrO42	Mn2+	Ni2+	Cu2+	Zn2+	Cd2+	Pb2+
		-						
La digestión con HNO3 / el microonda	ICP-AES	El volumen total en la tierra (el ppm (						
		306	2099	97	150	407	21)	208
		La cantidad extraída (% (						
El agua	ICP-MS	(0	0.003	0.006	0.005	0.002	0.01	(0
1 M NH4NO3 pH 4.9		< 0.02	0.02	0.05	< 0.04	0.01	< 3	< 0.10
CAL2) pH 4.1		0.06	2.0	2.0	3.4	5.0	7.0	< 0.10
0.1 M EDTA-Na2 pH 4.4		< 0.02	10.1	4.8	12.7	10.6	18.5	8.3
0.1 Na-citrato de M pH 5.0	ICP-AES	0.05	5.7	3.1	7.1	4.3	7.0	0.11
0.1 M TRIS pH 7.4		< 0.02	0.003	< 0.03	0.05	0.007	< 3	< 0.10

1) determinó por RFA 2) el acetato/lactato del Calcio (cada 0.05 M + 0.3 ácido acético de M)

La porción soluble de h.m. en el medio de MES antes y después de agitar con las muestras de la tierra se presenta en la tabla 4. Las concentraciones disminuyen en forma significativa después de agitar las soluciones con suelo.

Los metales pesados disueltos en agua no están necesariamente biodisponibles, pueden formar complejos.

Se determinaron los metales pesados libres (biodisponibles) en diferentes medios, agua de poros del suelo por cromatografía de intercambio catiónico. La mayoría de los valores estaban por debajo de 50%. La porción libre aumentó con la concentración. Los valores mayores se obtienen principalmente en la concentración más alta usada (0.08 mM). Las posibles formas en que se encuentran los metales pesados en suelos se ejemplifican en la figura 1.

Tabla 4. Las porciones solubles de Ni, Cu y Cd en 20 mM MES medium
La concentración agregada: 0.5 mM de cada elemento

La tierra	capacidad de intercambio catiónico	Níquel	Cobre	Cadmio
	(el mval/100 g d.m.)	% de valor teórico		
./.	./.	851)	481)	821)
		después de agitar con la tierra		
La tierra cultivable	8.9	47	4.4	55
Compost	26.6	10	2.5	23
Siderca ensucian	19.1	22	4.3	29

1) en el caso de desaire nublar, se analizaron los filtrados; d.m. ... dry mass

Figura 1. Formas en que pueden presentarse los metales pesados en la tierra

Cantidad total de metales pesados			
No solubles: - Precipitados (SO ₄ =; PO ₄ =-; CO ₃ =) - Unidos al ácido húmico. - Adsorbidos a la matriz de suelo - No biodisponibles.	Solubles En agua y Biodisponibles	Solubles en agua por quelación: - Edta - Tris - Ácido cítrico - Exudados radiculares	
		Metales complejados	
		Complejos lábiles	Complejos estables (no biodisponibles)

En contraste con los resultados obtenidos en suelos y barros, los experimentos con las bacterias extraídas en presencia de Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} y cromato revelaron una inhibición importante. El consumo de oxígeno (una medida de degradación) exhibió diferencias significativas que dependen de la cantidad de metal soluble. Se presentan las cinéticas en las Figuras 2 a 4. Zn y Pb no inhibieron la degradación gasoil a concentraciones iguales o menores de 0.5 mM. Los otros metales inhibieron la degradación casi completamente a concentraciones mayores de 0.2 mM, y el mercurio produjo inhibición a 0.02 mM. A las concentraciones más bajas la degradación sólo empezó después de una fase de retraso más larga.

La figura 2 muestra el consumo de oxígeno durante la degradación gasoil a las diferentes concentraciones de una mezcla de Cu/Ni/Zn. La comunidad no desarrolló ninguna actividad con 0.2 mM de cada elemento: la concentración de 0.05 mM producía una inhibición de más de 90%.

El proceso de degradación para gasoil en la presencia de cobre se muestra en Fig. 3. La degradación fue lenta en concentraciones de 0.1 y 0.2 mM Cu. El consumo de oxígeno continuamente incluso aumentó después de 2.000 hs. (83 días) de degradación. En la presencia de 0.2 mM sólo comenzó después de una fase de retardo de 18 días. El consumo de oxígeno a concentraciones de 0.5 mM fue menor que el testigo sin sustrato (gasoil).

El proceso de degradación en la presencia de cromato (Figura 4) se comportó diferentemente que con cobre. Salvo a la concentración más alta (0.1 mM) que inhibió el consumo de oxígeno presentó biodegradación de gasoil. La toxicidad de los metales pesados sobre la comunidad usada disminuye en el orden $\text{Hg}^{2+} > \text{CrO}_4^{2-} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. Esto está parcialmente de acuerdo con lo comunicado por Codina et al. (2000), quien encontró para *Saccharomyces cerevisiae* y una cepa de *Pseudomonas fluorescens* el siguiente orden de inhibición: $\text{Hg}^{2+} > \text{CrO}_4^{2-} > \text{Cd}^{2+} \cong \text{Cu}^{2+} \cong \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$.

Figura 2 Consumo de oxígeno durante la utilización de gasoil como fuente de carbono y energía en presencia de cobre, níquel y cinc, curva en rojo corresponde a gasoil sin la presencia de metales pesados, la verde a concentraciones de 0,02 mili Molar (mM) de cada uno, la azul a concentraciones de 0,2 mM las otras dos corresponden a blanco de inoculo sin gasoil y a blanco de gasoil sin inóculo. El tiempo (eje x) está expresado en horas.

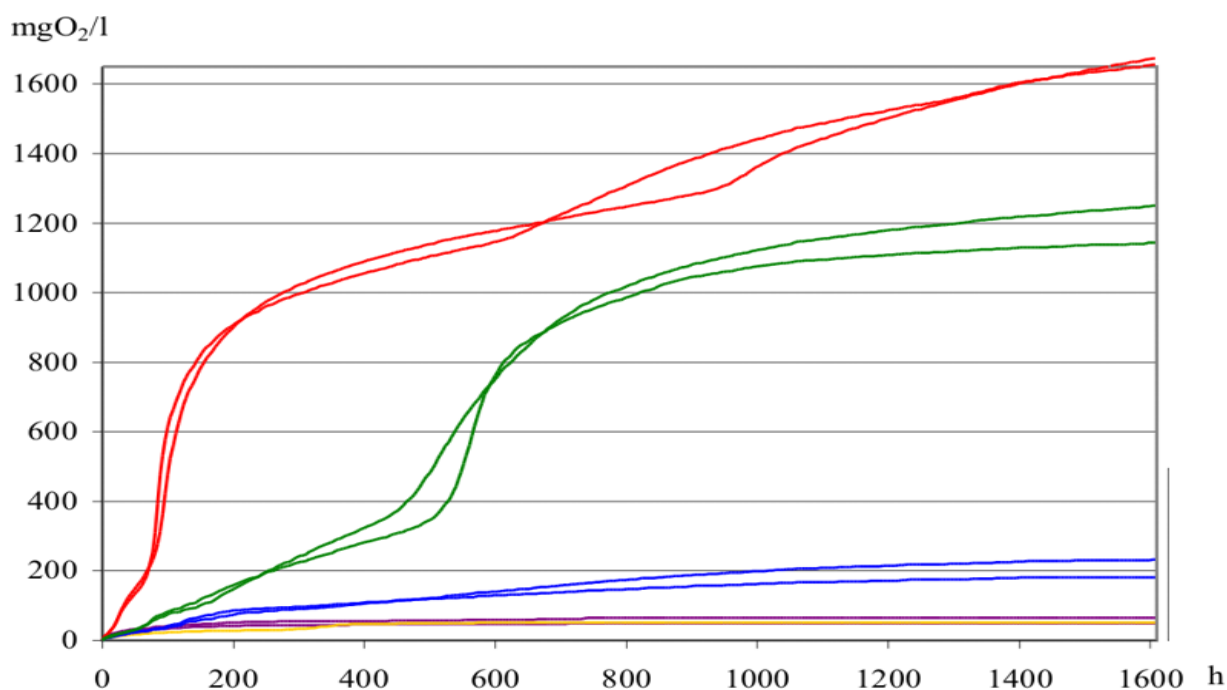


Figura 3 Consumo de oxígeno durante la utilización de gasoil como fuente de carbono y energía en presencia de cobre, las curvas en rojo corresponden a gasoil con 0,1 mM del metal pesados, la azul a concentraciones de 0,2 mM de cobre, las violetas corresponden a blanco de inoculo sin gasoil y las verdes a 0,5 mM de cobre. El tiempo (eje x) está expresado en horas.

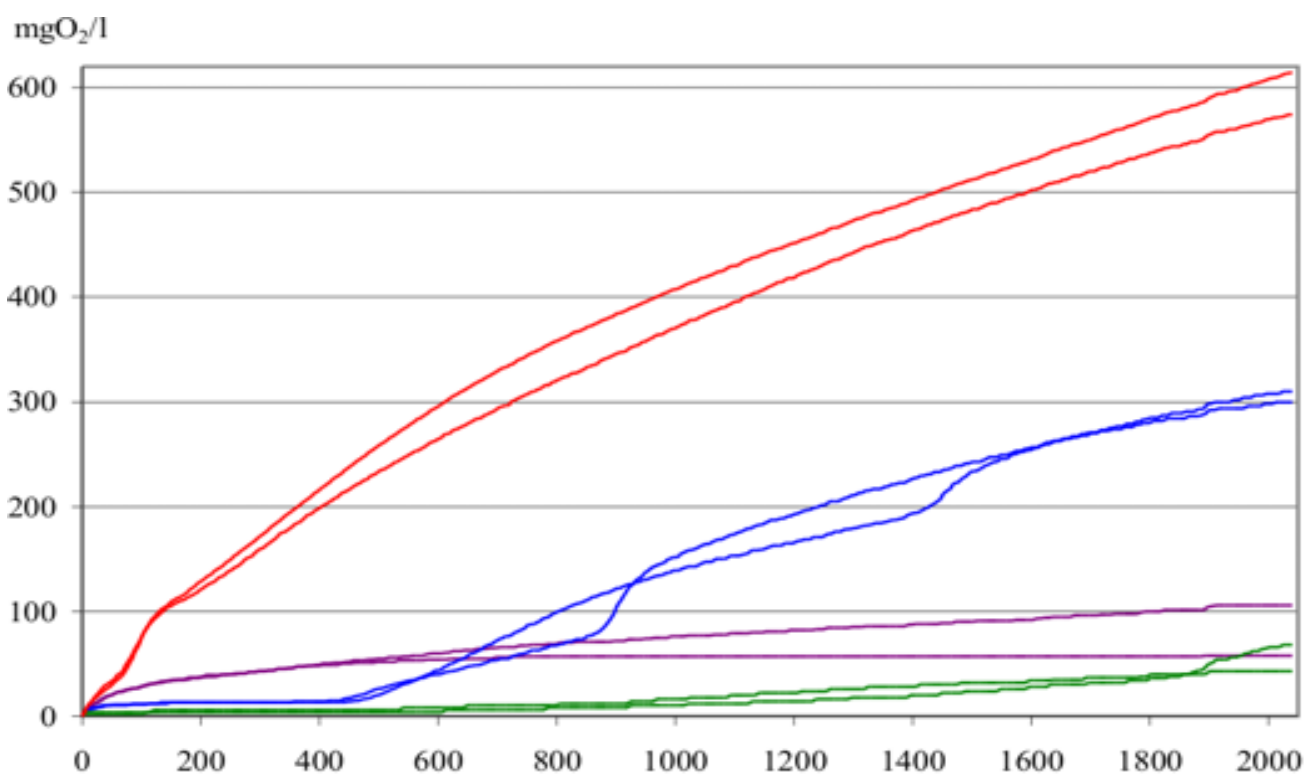
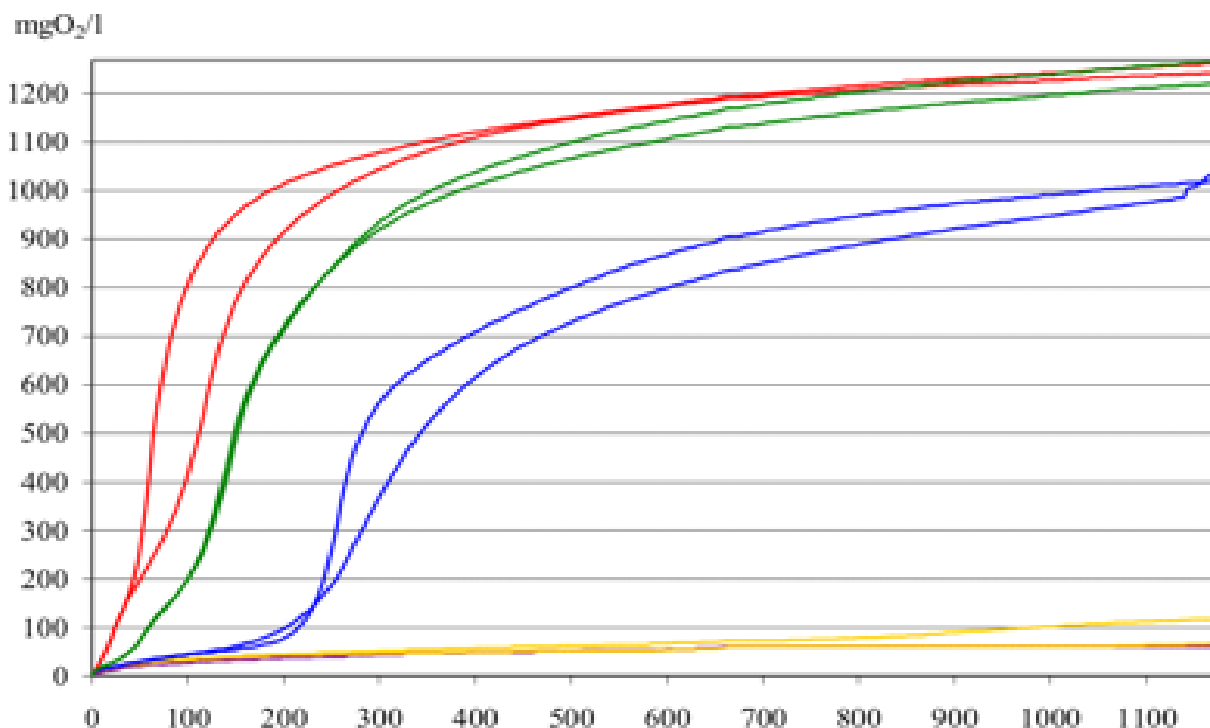


Figura 4 Consumo de oxígeno durante la utilización de gasoil como fuente de carbono y energía en presencia de cromo (Cr VI), curva en rojo corresponde a gasoil sin la presencia del metal pesado, la azul a una concentración de 0,05, la verde a concentraciones de 0,02 molar, la azul a concentraciones de 0,2Molar, las anmarillas corresponden a 0,1mM de cromo, El tiempo (eje x) está expresado en horas.



Conclusión:

- 1.- Sólo los metales pesados biodisponibles pueden tener influencia negativa en la biodegradación hidrocarburos.
- 2.- Los métodos que utilizan medios líquidos para determinar el potencial de biodegradación de comunidades frente a estos dos contaminantes no son útiles salvo que además de conocer la cantidad total de metales pesados se conozca lo que realmente esta biodisponible.
- 3.- Se puede inferir que el agregado de fosfato, el aumento de pH (dentro de límites tolerantes para la comunidad) produciría una disminución de la biodisponibilidad y un aumento de la eficiencia de la biorremediación.
- 4.- Levantando el pH (encalando) y agregando fosfato y humus puede reducirse las biodisponibilidad de metales pesados en gran medida. De esta manera puede ser exitosa una biodegradación en presencia de metales pesados.

Bibliografía

- Baldrian, P., Wiesche, C., Gabriel, J., Nerud F., Zadrazil, F., 2000. Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2471-2478.
- Codina, J.C., Cazorla, F.M., Pérez-García, A., De Vicente, A., 2000. Heavy metal toxicity and genotoxicity in water and sewage determined by microbiological methods. Environ. Toxicol. Chem. 19, 1552-1558.
- Degraffenreid, N., Shreve, G.S., 1998. The effect of cadmium on the kinetics of trichloroethylene biodegradation by *Pseudomonas (Burkholderia) picketti* PK01 under denitrifying conditions. Water Res. 32, 3398-3402.
- Fijalkowska, S., Lisowska, K., Dlugonski, J., 1998. Bacterial elimination of polycyclic hydrocarbons and heavy metals. J. Basic Microbiol. 38, 361-369.
- Giller, K.E., Witter E., McGrath S.P., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. Soil Biol. Biochem. 30, 1389-1414.
- Kuo, Ch.-W., Genther, B.R.S., 1996. Effect of added heavy metal ions on biotransformation and biodegradation of 2-chlorophenol and 3-chlorobenzoate in anaerobic bacterial consortia. Appl. Environ. Microbiol. 62, 2317-2323.
- Reber, H.H., 1992. Simultaneous estimates of the diversity and the degradative capability of heavy-metal-affected soil bacterial communities. Biol. Fertil. Soil 13, 181-186.
- Smreczak, B., Maliszewska-Kordybach, B., Martyniuk, S., 1999. Effect of PAHs and heavy metals on activity of soil microflora. NATO ASI Series 64 (Bioavailability of organic xenobiotics in the environment), 377-380.
- Sokhn, J., De Leij, F.A.A.M., Hart, T.D., Lynch, J.M., 2001. Effect of copper on the degradation of phenanthrene by soil micro-organisms. Letters Appl. Microbiol. 33, 164-168.