

**BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS:
INFLUENCIA DE LA FERTILIZACIÓN
EN EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN**

Oscar Héctor Pucci, Sandra Velázquez, Héctor Alvarez, Silvia Peressutti y
Mabel Bak

CEIMA - FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA

MEDIO AMBIENTE Y SEGURIDAD

Gerónimo Maliqueo 164 - 9000 Comodoro Rivadavia - Chubut

Te 0297-4471732

e-mail ceima@unpata.edu.ar

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 además de la composición de la comunidad bacteriana. La bibliografía cita diversas proporciones de nutrientes como las más efectivas, pero estas proporciones varían ampliamente y las diferentes cantidades influyen significativamente en el costo del proceso, no sólo por el precio de ellos sino también por su influencia en la velocidad de degradación, lo que implicaría un mayor tiempo de proceso.

En este trabajo se efectuaron pruebas de laboratorio que determinaron la proporción óptima de fertilizantes necesaria para suelos de la Patagonia central, caracterizados por su bajo contenido de nutrientes. Además se ensayaron diferentes compuestos nitrógenados que permitirían su uso en suelos con distinto grado de salinidad sin incrementar la misma. Los resultados indican que la incorporación de nutrientes en baja proporción es más efectiva que el agregado en altas concentraciones, como el denominado shock de nutrientes.

El conocimiento obtenido en este ensayo permite iniciar un proceso de biorremediaciones con bajas concentraciones de nutrientes mientras se efectúa un ensayo para determinar las cantidades óptimas necesarias según el suelo y contaminante a tratar.

INTRODUCCIÓN

Existen diferentes métodos para eliminar residuos contaminados con petróleo y sus derivados, incluidos los residuos generados en la producción, transporte y refinación.

De todos ellos los que tienen la categoría de naturales por 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.

Queda en discusión si pueden asignarse a la categoría de naturales los suelos tratados con microorganismos manipulados genéticamente o introducidos a partir de fuentes no relacionadas con el hábitat a tratar.

En trabajos anteriores (1,6,7,8,9) hemos demostrado la utilidad de los métodos biológicos como herramientas para minimizar el impacto ambiental de los hidrocarburos en el medio ambiente, con costos razonables.

Se ha documentado profusamente la influencia de las condiciones ambientales y del hábitat en los procesos de biodegradación, estos documentos informan sobre posibilidades de biodegradación en circunstancias y lugares geográficos determinados, algunos sistemas proponen extrapolar los resultados publicados a condiciones diferentes tanto sea climáticas como edáficas y biológicas.

Se ha demostrado (2,3,4,5) que la incorporación al sitio a biorremediar de nutrientes nitrógenados y fosforados incrementa la velocidad de eliminación de compuestos hidrocarbonados. Muchos autores han propuesto diferentes concentraciones y proporciones de estos nutrientes.

Es una realidad que los suelos de las diferentes regiones están habitados por comunidades de variada composición cuali-cuantitativa y con características nutricionales diferentes 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 bacteria degradadoras de hidrocarburos y por consiguiente disminuyendo la biodegradación.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el compuesto químico y las concentraciones más efectiva a ser utilizada como nutrientes en un proceso de biorremediación en suelos patagónicos.

DESARROLLO

Características del suelo contaminado en estudio:

El suelo contaminado utilizado en este estudio proviene de una zona semiárida del norte de la Patagonia. Este suelo se caracteriza por presentar notoriamente una muy baja relación entre carbono, nitrógeno y fósforo (C:N:P), siendo este valor de 100 : 0,0049 : 0,0011.

El residuo presente en el suelo posee un alto contenido de asfaltenos (32,55%) y relativamente bajo porcentaje de hidrocarburos alifáticos (38,8 %), siendo éstos últimos, sólidos a 37°C indicando que están dentro de las parafinas de más de 20 átomos de carbono, lo que lo hace un residuo con una velocidad de degradación relativamente baja. La concentración final en el sistema (6,27%) está dentro de los valores considerados óptimos para biodegradación.

Los valores de pH y humedad son adecuados para una buena biodegradación.

El número de bacterias es relativamente bajo si se lo compara con suelos para agricultura, pero se encuentran dentro de los valores habituales en zonas semiáridas.

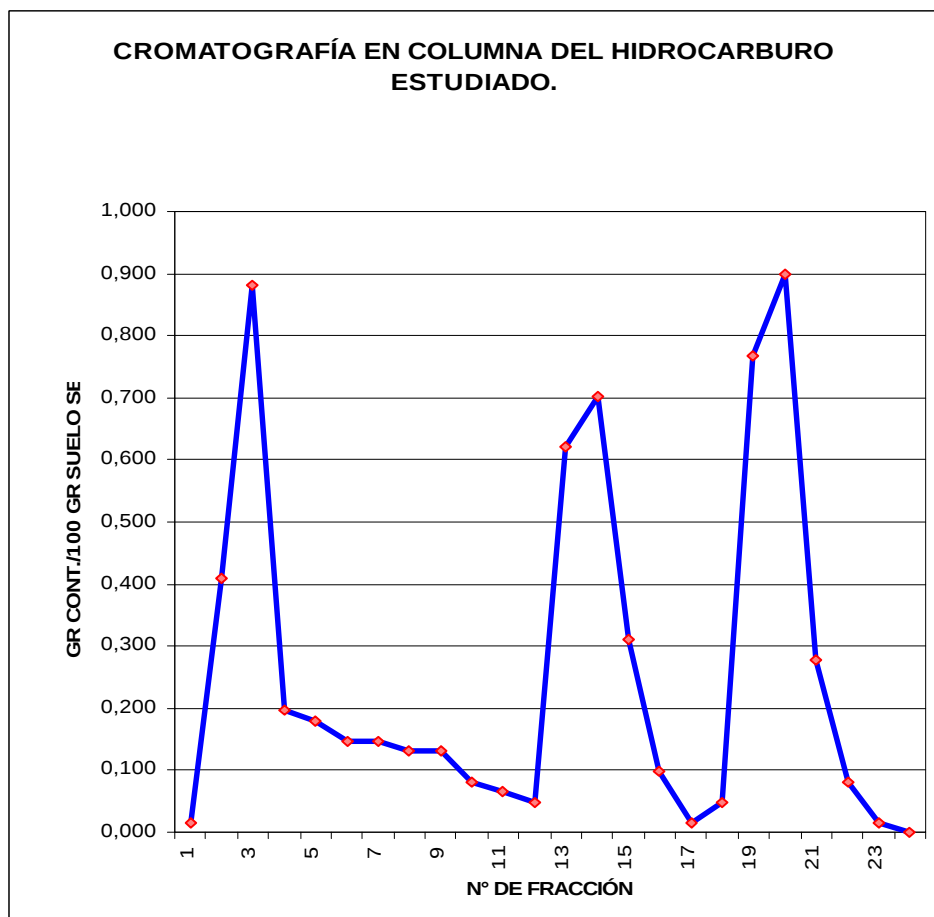
En la tabla 1 se muestran las características del suelo contaminado

TABLA 1

DETERMINACIÓN	VALORES
HUMEDAD (%)	16,38
pH	7,40
HIDROCARBUROS (g/100gr suelo seco)	6,27
ALIFÁTICOS (%)	38,80
AROMÁTICOS (%)	28,65
ASFALTENOS (%)	32,55
ALIFÁTICOS (g/100 gr. de suelo)	2,43
AROMÁTICOS (g/100 g de suelo)	1,80
ASFALTENOS (g/100 g de suelo)	2,04
NITRATOS (ppm)	1,30
NITRITOS (ppm)	no detectado
UREA (ppm)	0,00
AMONIO (ppm)	1,80
NITROGENO TOTAL mg / kg	3,10
FOSFATOS (ppm)	0,72
BACTERIAS AEROBIAS (UFC/g)	$1,09 \times 10^7$
B.D.HIDROCARBUROS (UFC/g)	$3,10 \times 10^6$
HONGOS (UFC/g)	$2,16 \times 10^5$

La composición del residuo contaminante fue determinada por cromatografía en columna y el perfil resultante se muestra en el gráfico N°1.

Gráfico N° 1.



Se utilizaron en total 12 fermentadores en fase sólida donde se variaron las relaciones entre C:N:P (100:10:1; 100:5:1; 100:1:0,1 y 100:0,1:0,01) y el compuesto de nitrógeno utilizado (cloruro de amonio, nitrato de amonio y urea). El ensayo fue llevado a cabo a temperatura ambiente (23 +/- 5 °C).

El seguimiento del proceso de biodegradación se realizó midiendo la producción de dióxido de carbono como una medida de la mineralización del hidrocarburo que constituye la única fuente de carbono disponible.

El tiempo de duración de la experiencia fue de 63 días para el ensayo de nitrato de amonio y urea como nutrientes, y de 89 días para el cloruro de amonio.

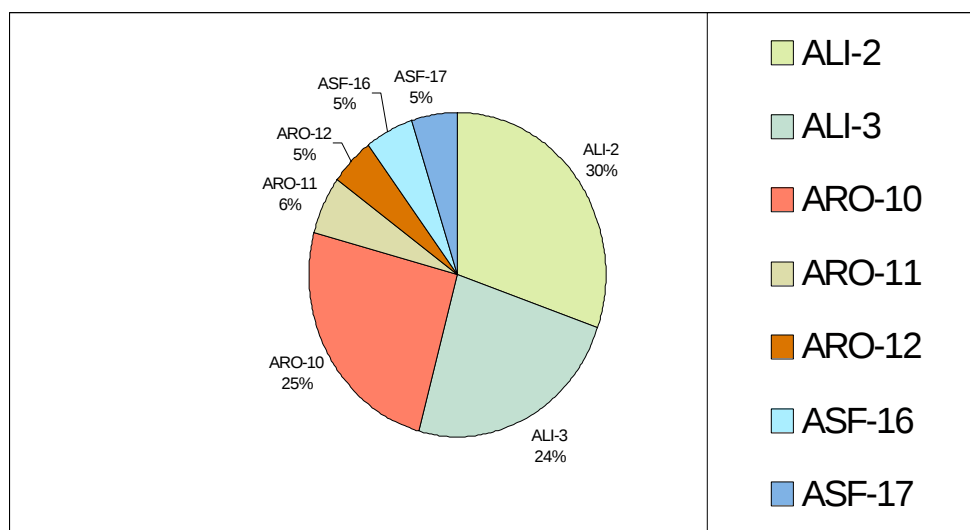
Debido a las características del residuo fue necesario efectuar un ensayo de biodegradabilidad en base a las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna, en este caso por la pequeña cantidad de hidrocarburo disponible para los ensayos se utilizó el método de producción de biomasa.

Resultados:

Ensayo de biodegradabilidad

El ensayo de biodegradabilidad mostró que todas las fracciones del residuo pueden ser utilizadas como fuente de carbono para la comunidad microbiana proveniente del suelo contaminado, aunque las utilizaciones relativas son diferentes. En el gráfico 2 se muestran los valores obtenidos:

Gráfico N° 2



La biodegradabilidad de la fracción alifática fue la mayor con un 54% seguida de la fracción aromática (mono y poliaromáticos) con un 34% y por último la fracción que corresponde a asfaltenos y compuestos polares con sólo un 10%, esto nos indica que la comunidad bacteriana tiene una capacidad de biodegradación buena, pero que a los 60 días las biodegradaciones difieren mucho en su eficiencia en la utilización de las tres fracciones principales del residuo del petróleo.

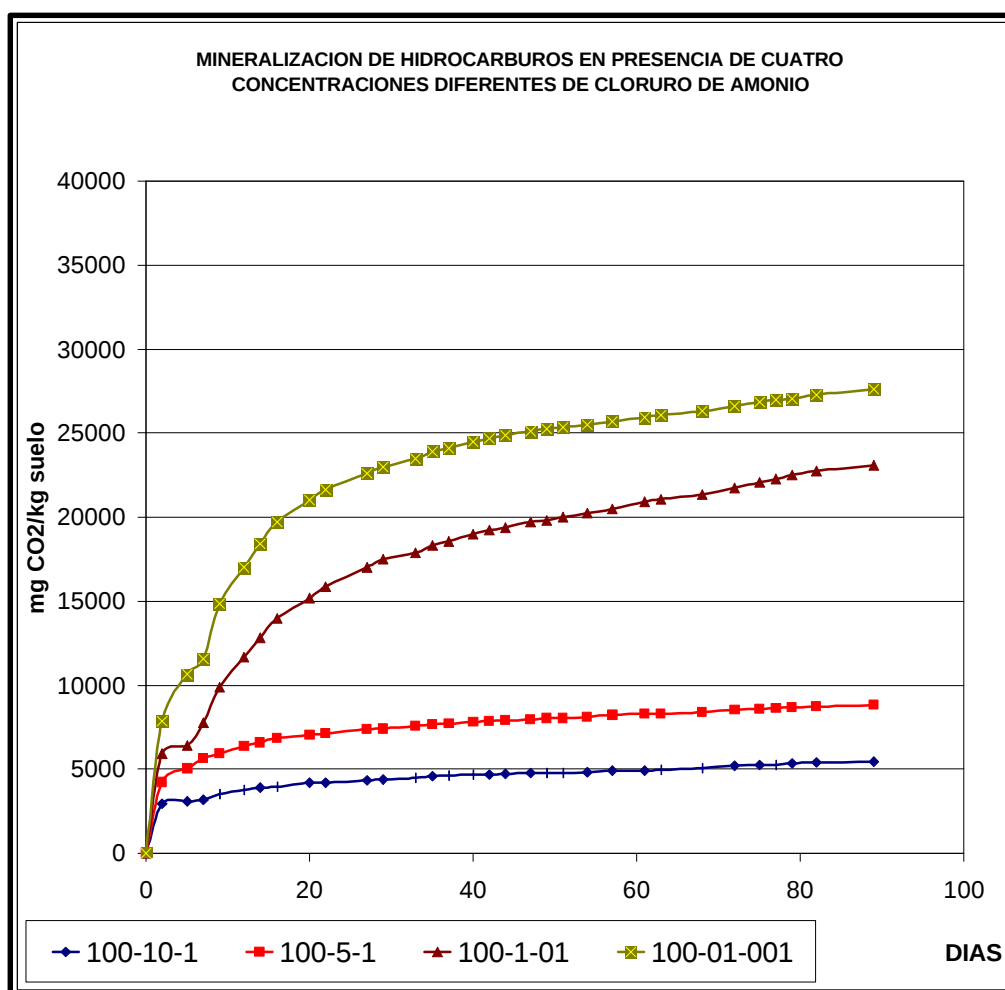
Utilización de cloruro de amonio

El cloruro de amonio es un compuesto de bajo precio (en grado industrial), de fácil obtención y es usado con mucha frecuencia como

compuesto de nitrógeno en medios de cultivo con muy buen resultado. Tiene como inconveniente para su uso en el medio ambiente que el anión cloruro se incorpora al suelo aumentando su salinidad, modificando la fuerza iónica del mismo con el consiguiente efecto fisiológico adverso sobre las poblaciones bacterianas.

En el gráfico 3 se muestran las curvas obtenidas en los ensayos de mineralización con este nutriente. En el mismo se aprecia que la concentración más efectiva es 100 : 0,1 : 0,001 seguida de la relación 100 : 1 : 0,1.

Gráfico N° 3: Mineralización de hidrocarburos con cuatro concentraciones del cloruro de amonio.



Podría suponerse que a mayor cantidad de nutrientes inorgánicos, específicamente fuentes de nitrógeno y fósforo debería incrementarse el desarrollo bacteriano y el consumo consecuente de la fuente de carbono. En este ecosistema, con cloruro de amonio, se observa un fenómeno inverso, si la cantidad de nutrientes inorgánicos es muy alta la utilización del

hidrocarburo es mínima, incrementándose la misma cuando disminuye la relación C:N:P, este resultado puede atribuirse al ión cloruro.

Entre los días 2 y 5 se produce una disminución en la velocidad de mineralización, que se da en todos los sistemas y que correspondería al agotamiento de hidrocarburos de fácil utilización y la adaptación del sistema biológico a la nueva composición del residuo.

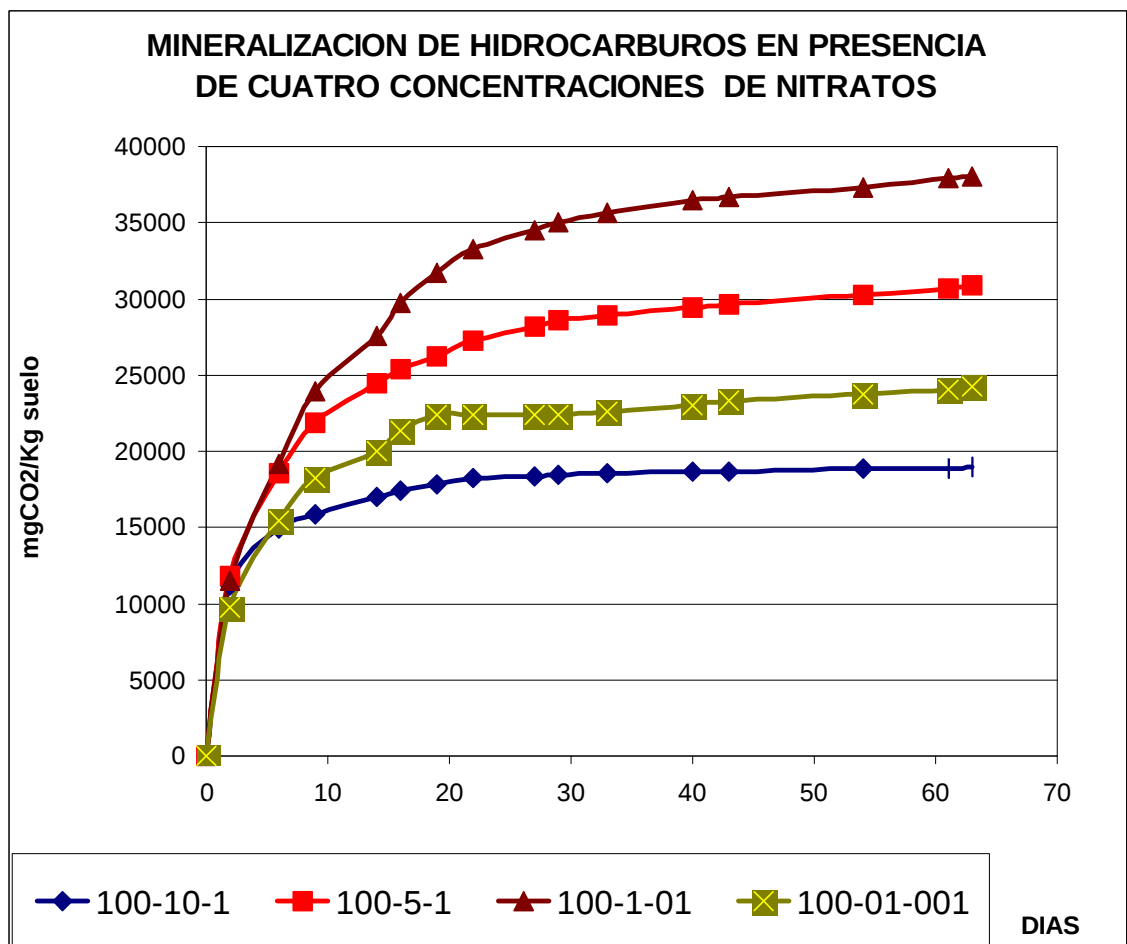
Utilización de nitrato de amonio

El nitrato de amonio es un compuesto que evitaría los inconvenientes de la incorporación de cloruro al suelo y en este caso ambos, anión y catión tienen utilidad como nutrientes. El nitrato de amonio es un compuesto que se usa en medios de cultivo con un costo mayor que el cloruro de amonio. El resultado de las diferentes proporciones tiene características similares a la del cloruro de amonio. La mineralización a partir de este compuesto es superior a la del cloruro de amonio.

En este caso el período de transición entre los hidrocarburos fácilmente degradables y el resto, no es tan marcado.

La concentración más eficiente es 100:1:0,1 seguida por la 100:5:1, la 100:0,1:0,01 y por último la 100:10:1

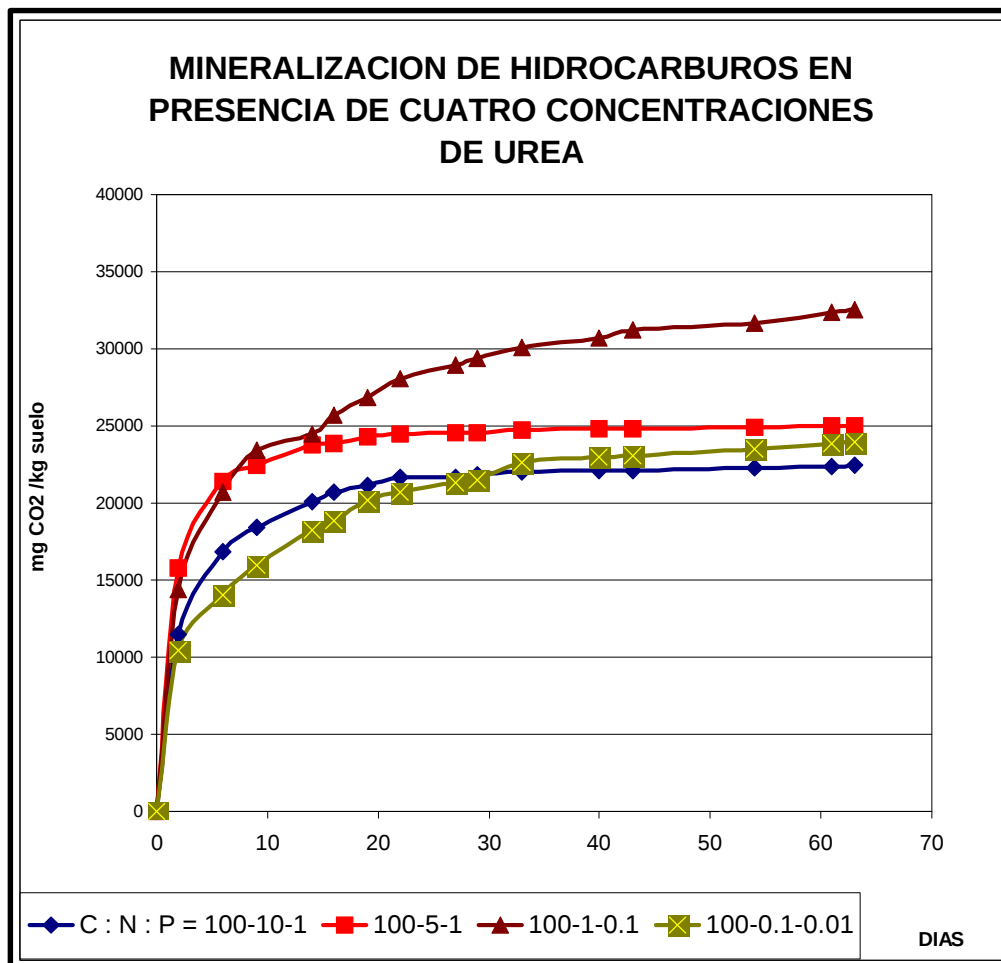
Gráfico N°4: : Mineralización de hidrocarburos con cuatro concentraciones de nitrato de amonio.



Utilización de Urea

La urea es un fertilizante común en usos agrícolas y siendo totalmente utilizable por los microorganismos, y muy económico. Los resultados obtenidos con este compuesto muestran una velocidad de mineralización muy similar para tres relaciones que corresponden a 100:10:1; 100:5:1 y para 100:0,1:0,01. Existe una diferencia importante con la relación 100:1:0,1

Gráfico N° 5: : Mineralización de hidrocarburos con cuatro concentraciones de urea.



Comparación de los compuestos nitrogenados

El comportamiento comparativo de los tres compuestos nitrogenados en la relación 100:0,1:0,01 se presenta en el gráfico N° 5, y en la relación 100:1:0,1 en el gráfico N° 6. En el primero de estos gráficos se aprecia claramente que no hay diferencias muy significativas entre los tres nutrientes (cloruro de amonio, nitrato de amonio y urea) en esta relación. Sin embargo cuando se utilizan mayores concentraciones de nutrientes (gráfico N° 6) se observa un marcado incremento en la producción de dióxido de carbono, siendo el nitrato de amonio el nutriente más eficiente en el hábitat y las condiciones estudiadas.

Gráfico N°5: comportamiento comparativo de los tres compuestos nitrogenados (100 : 0,1 : 0,01)

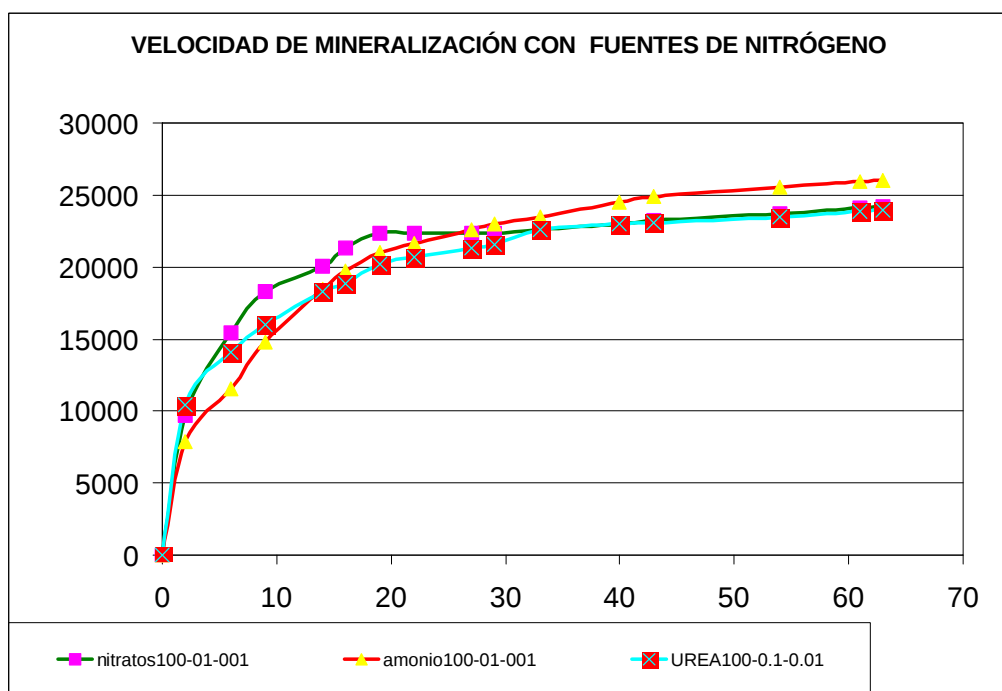


Gráfico N° 6

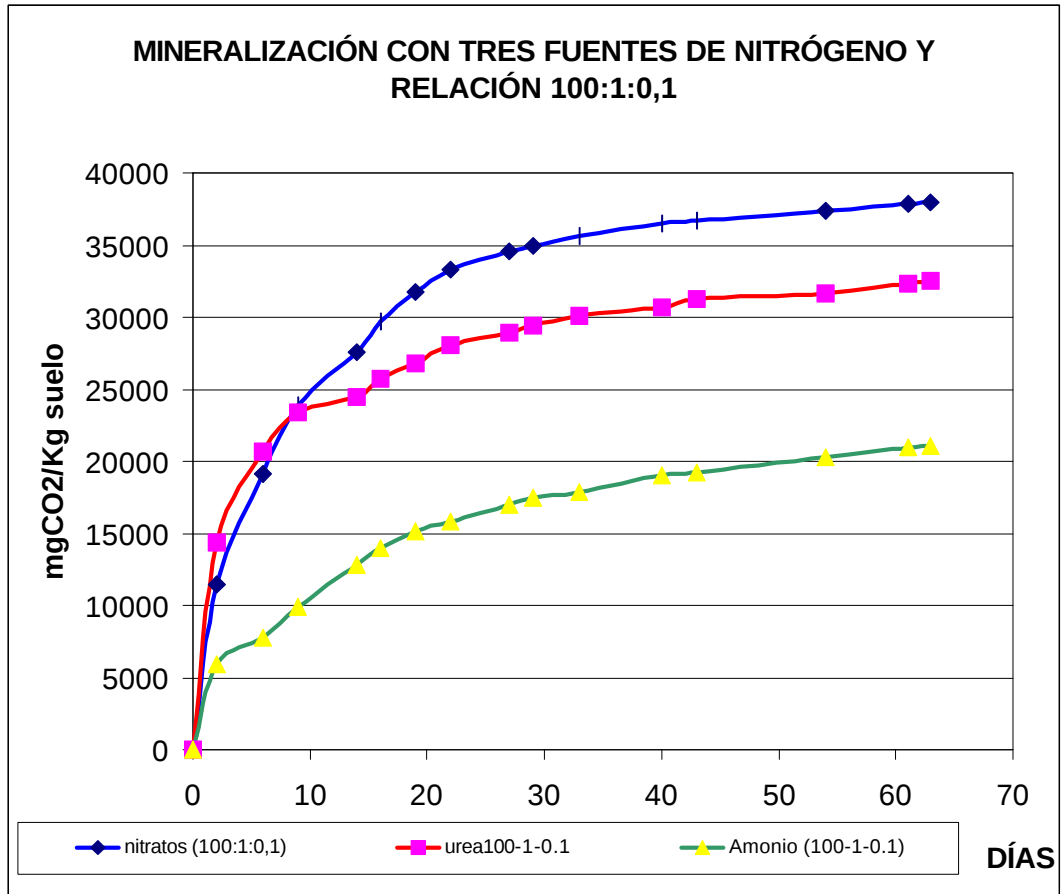
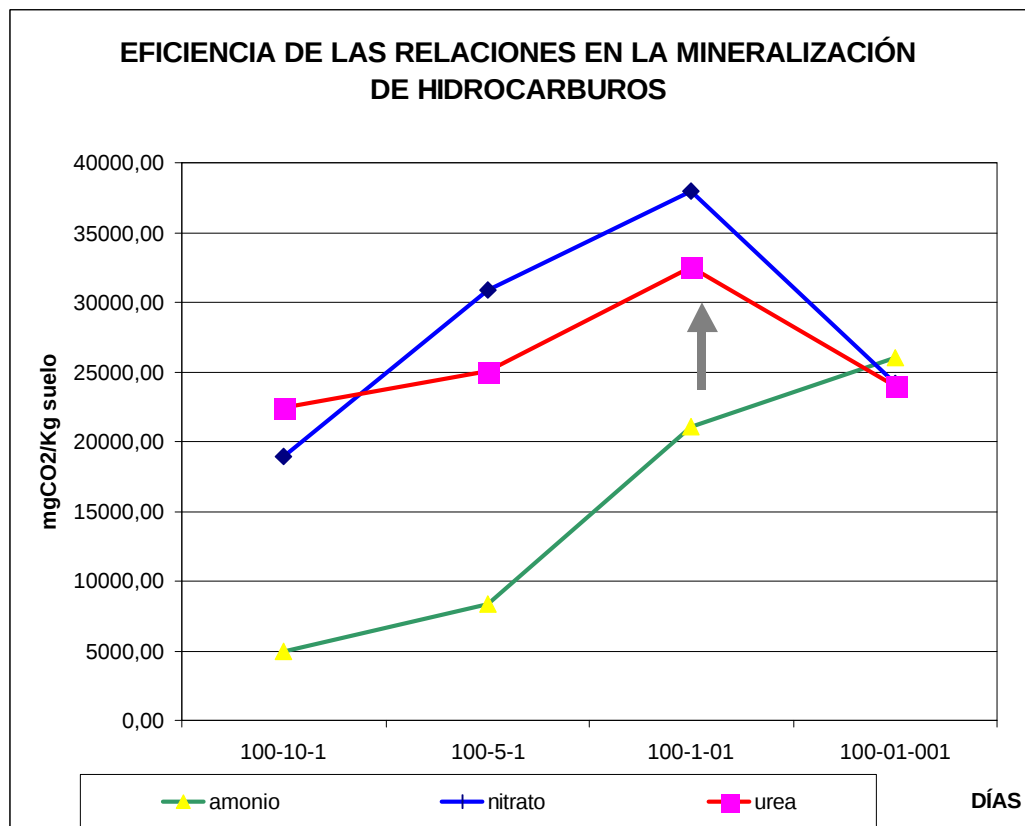


Gráfico N° 7



En el gráfico N° 7 se pueden apreciar las curvas de producción de dióxido de carbono a los 63 días de incubación por parte de la comunidad bacteriana, la flecha indica la concentración óptima de compuestos nitrogenados a agregar en el caso de nitrato de amonio y urea. En el caso del cloruro de amonio la curva de producción tiene una relación inversa con la concentración del ión cloruro que se agrega .

CONCLUSIONES VÁLIDAS EN LAS CONDICIONES DE ESTE ENSAYO

--Hay diferencias importantes en la producción de biomasa a partir de las fracciones principales de los hidrocarburos presentes en el petróleo o de sus residuos

--Todas las fracciones son utilizadas por la comunidad.

--El nitrato de amonio utilizado en una relación 100 : 1 : 0,1, resultó ser más eficiente (en un 80%) que el cloruro de amonio y en un 16% que la urea.

--El cloruro de amonio tiene un efecto adverso a la biodegradación en suelos no salinos, cuando es utilizado como nutrientes en altas concentraciones.

--En suelos con baja relación inicial de C:N:P el agregado de altas relaciones deprime la biodegradación.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Alvarez, H.M.; Bak, M.A.; Estevao Belchior, S.G.; Peressutti, S.R. Y Pucci, O.H. Biodegradación De Residuos Recalcitrantes Derivados Del Petróleo Con Una Cepa De Ochrobactrum Anthrophilum. Publicado En El Libro De Resúmenes. Sección M54. Xxxv Reunión Anual Sociedad Argentina De Investigación En Bioquímica Y Biología Molecular. SAIB 99. Mendoza, 09 Al 12 De Noviembre De 1999.
- 2--Delille, D., A. Basseres, and A. Dessommes. 1997. Seasonal variation of bacteria in sea ice contaminated by diesel fuel and dispersed crude oil. Microb. Ecol. 33:97-105.
- 3- Dibble, J.T., and R. Bartha. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. Appl. Environ. Microbiol. 37:729-739.
- 4- Hinchee, R.E., and M. Arthur. 1991. Bench scale studies of the soil aeration process for bioremediation of petroleum hydrocarbons. Appl. Biochem. Biotechnol. 28/29:901-906.
- 5- Jobson, A., F. D. Cook, and D.W.S. Westlake. 1972. Microbial utilization of crude oil. Appl. Microbiol. 23:1082-1089.
- 6- Pucci, O.H.; Bak, M.A.; Peressutti, S.R.; Estevao Belchior, S.R. Y Alvarez, H.M. "Biorremediación De Suelos Contaminados Con Hidrocarburos". Revista Petrotecnica - Isbn 0031-6598-Iap. 6:54-59. Diciembre De 1998.
- 7- Pucci, O.H.; Bak, M.A.; Peressutti, S.R.; Lisoni, C.; Quinteros, J.M.; Bassi, O. "Biodegradación De Petróleo En Suelos De La Patagonia Central". 2º Simposio De Producción De Hidrocarburos. Instituto Argentino Del Petróleo. Mendoza, 12 Al 16 De Junio De 1995.
- 8- Pucci, O.H.; Bak, M.A.; Peressutti, S.R.; H.M.; Wünsche, L.; Klein, L.; Härtig, L. In Situ Bioremediation Of The Highly Hydrocarbon Contaminated Area Cerro Dragon In Patagonia. Workshop En El Margen De La Cooperación Científica Y Tecnológica Entre Alemania Y Argentina. 118-126. La Plata, 6 Al 7 De Noviembre De 1997.
- 9- Pucci, O.H.; Peressutti, S.R.; Bak, M.A. And Alvarez, H.M. Procesos De Eliminación De Hidrocarburos En Ambientes Semi Áridos. Ingepet`99. Lll Seminario Internacional. Exploración Y Explotación De Petróleo Y Gas. Lima, Perú. 26 Al 29 De Octubre De 1999.