

Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos



*Por Oscar Héctor Pucci, Director del CEIMA,
con la colaboración de la Bioq. Mabel A. Bak, la Lic. Silvia R. Peressutti,
la Bioq. Silvia G.E. Belchior y el Dr. Héctor M. Alvarez*

La biodegradación de petróleo es una alternativa económica para resolver el problema de la contaminación accidental de hidrocarburos en ambientes acuáticos y terrestres.

Su eficiencia se incrementa si se utilizan primero métodos que recuperen el petróleo utilizable y luego se trata el suelo contaminado con una adecuada tecnología que permita el óptimo desarrollo de comunidades microbianas autóctonas y bacterias con capacidades especiales de degradación de hidrocarburos.

En lo posible, estas bacterias deben ser obtenidas del sitio a remediar o sitios similares para evitar la falta de adaptación al medio ambiente.

Estos microorganismos son aislados a partir de sitios contaminados, cultivados en el laboratorio, y posteriormente inoculados en el área a tratar.

Este método de biorremediación es altamente efectivo, especialmente cuando se lo utiliza en conjunto con una bioestimulación adecuada (mediante el agregado de nutrientes inorgánicos, agua y aireación).

Oscar Héctor Pucci es Licenciado en Bioquímica (1974), Farmacéutico de la UNPSJB (1987) y Doctor en Bioquímica (1992). Es Profesor Titular de Microbiología General en la UNPSJB y Director del Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada (CEIMA) de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de la Patagonia.

Actualmente dirige 5 tesis doctorales en el área de microbiología aplicada y biorremediación y es director por Argentina del proyecto Biocenosis Bacteriana de Suelos Contaminados con Petróleo en el marco del convenio de Cooperación Argentino-Alemán de medio ambiente. Ha colaborado y colabora con la industria petrolera en trabajos y desarrollos de temas de biodegradación y biocorrosión.



Eliminación de residuos

La explotación petrolera, tanto en su actividad industrial como a través de accidentes, produce desechos constituidos principalmente por hidrocarburos. La eliminación de estos contaminantes constituye una preocupación constante. Nuestro país se ha adherido al Convenio de Basilea, que propone como válidas las siguientes acciones para eliminar residuos:

- Recuperación, reciclado o reutilización del residuo.
- Depósito del residuo en el interior o sobre el suelo (cumpliendo determinadas condiciones).
- Tratamiento biológico del suelo (biorremediación).

- Tratamientos biológicos que lleven a productos finales inocuos.
- Incineración.
- Depósitos permanentes.

De esta lista resumida de actividades, la biorremediación en cualquiera de sus modalidades, es un proceso natural que lleva a producción de biomasa, dióxido de carbono y agua. A su vez, se generan productos remanentes que no son contaminantes, así como también pueden permanecer sin biodegradar compuestos provenientes de los hidrocarburos con estructura muy compleja, similar al ácido húmico. Estos últimos compuestos, que se fijan a las partículas de suelo por su alta insolubilidad, son productos no riesgosos.

Biodegradación / Biorremediación

Hay un grupo de términos que se refieren a la acción de los microorganismos como elementos útiles para la limpieza del medio ambiente y que es necesario definir:

Biodegradación: acción de los microorganismos sobre compuestos químicos llevándolos a sus constituyentes.

Biotransformación: modificación de compuestos orgánicos sin llegar a mineralizarlos.

Mineralización: degradación de compuestos orgánicos a dióxido de carbono.

Biorremediación: proceso que utiliza microorganismos para eliminar contaminantes o tóxicos naturales o xenobóticos del suelo o agua.

Landfarming: biorremediación por aplicación repetida de contaminantes en suelos debidamente acondicionados.

Bioestimulación: incluye la incorporación de oxígeno, agua y nutrientes minerales. Se usa en aguas subterráneas y en suelos.

Como en todo proceso biológico, el éxito de la biorremediación depende de una serie de características que las podemos resumir en las siguientes:

- 1) **Características del contaminante:** composición, solubilidad, propiedades tóxicas para los microorganismos.
- 2) **Características del hábitat:** tipo de suelo, disponibilidad de agua, cantidad de sales, pH, presencia de fuentes de nitrógeno, presencia de fósforo, etcétera.
- 3) **Características de los microorganismos:** número de bacterias, perfil de biodegradación de hidrocarburos, capacidad de adaptación a las condiciones ambientales como tolerancia a la desecación, adaptación al pH, relaciones con otros microorganismos presentes en el suelo, acción de depredación de otros seres vivos que comparten el mismo hábitat.
- 4) **Tecnología utilizada:** biorremediación aplicada, biorremediación

intrínseca, biorremediación asistida, biorremediación con inoculación, landfarming, biorremediación en fase sólida, etcétera.

A estos cuatro aspectos debemos agregar los métodos analíticos para el control de la biorremediación y el marco jurídico en el cual trabajaremos.

Características del contaminante

Las características del contaminante que tienen importancia en una biorremediación son:

a) **Estado físico.** Se debe considerar el estado del contaminante (si es líquido o sólido), así como también es importante conocer su solubilidad en agua, ya que las bacterias sólo utilizan nutrientes solubles en agua.

b) **Concentración.** Cuando la concentración del hidrocarburo es muy baja no alcanza a inducir la acción enzimática que conlleve a la eliminación del mismo. Por otra parte, cuando la concentración del hidrocarburo es muy alta, alguno de sus componentes puede alcanzar niveles tóxicos, produciendo la inactivación de la actividad bacteriana. Algunos de los hidrocarburos del petróleo que resultan tóxicos para las bacterias son de bajo punto de ebullición y desaparecen por evaporación a los pocos días del derrame. Las concentraciones moderadas de petróleo son las más fácilmente degradadas y pueden variar según el tipo de suelo y la variedad de microorganismos que estén presentes en él.

c) **Solubilidad de los hidrocarburos.** Tiene una importancia fundamental pues en muchos casos la velocidad de biodegradación de hidrocarburos es mayor que la velocidad de disolución. En tales casos la biodegradación se encuentra limitada por la velocidad de disolución. El agregado de surfactantes no siempre es beneficioso, debido a que alguno de ellos tienen efecto detergente sobre las membranas biológicas produciendo la muerte de las bacterias que interesan en biodegradación.

d) **Componentes químicos del petróleo.** Desde el punto de vista químico, los componentes del petróleo son innumerables. Sin embargo, mediante técnicas analíticas relativamente sencillas como la cromatografía en columna, podemos separarlos en tres grupos con características propias, que tienen importancia para el seguimiento de la biodegradación. Estos son: los hidrocarburos alifáticos, los aromáticos y los polares o asfaltenos. La importancia de los grupos nombrados es dada en su facilidad decreciente de biodegradación.

Destino de los hidrocarburos en suelos

En el Cuadro 1 se muestran los posibles destinos de los hidrocarburos en un suelo. De todas las posibilidades, la acción biológica, en condiciones aeróbicas, es la que produce la mayor acción en la eliminación de los contaminantes.



Facilidad de biodegradación

Los hidrocarburos alifáticos lineales de peso molecular medio son los más fácilmente degradables, le siguen los alcanos ramificados, los aromáticos de bajo peso molecular y los alcanos cíclicos. Los hidrocarburos poli aromáticos (PAH) que son los más peligrosos desde el punto de vista humano, tienen un mayor grado de dificultad para ser degradados. Los asfaltenos son moléculas muy complejas y se degradan con mucha dificultad, siendo la fracción más recalcitrante a este tipo de tratamiento. Estos últimos tienden a permanecer en el medio ambiente como tales, o modificados de forma tal que se asemejan a

compuestos húmicos presentes normalmente en el suelo. Otra característica de este grupo es su limitada solubilidad, siendo por lo tanto compuestos prácticamente inertes.

Características del ambiente donde se desarrolla la biodegradación

El medio ambiente es una de las variables que determina la posibilidad de que se produzca o no la biodegradación. Los mares, ríos, lagos, lagunas y napas de agua forman los ecosistemas acuáticos que pueden ser contaminados por petróleo o sus derivados y tienen características diferentes de los ecosistemas terrestres, que son los que trataremos aquí. En los ecosistemas terrestres tiene mucha importancia una serie de factores físicos que pueden limitar y hasta anular un proceso de biorremediación:

a) Temperatura. Este parámetro tiene importancia especialmente en los hábitat extremos donde las temperaturas pueden ser muy altas o muy bajas. En tales casos, la biodegradación no sería significativa en términos de aplicación práctica. En trabajos realizados en la Patagonia se ha demostrado que no existe gran diferencia entre los valores de mineralización de hidrocarburos o petróleo entre 4 y 25 °C, si bien a esta última temperatura la mineralización fue mayor. En el mismo trabajo se determinó que la capacidad de biodegradación fue superior cuando se utilizaron comunidades bacterianas que cuando se analizaron cepas aisladas.

b) Humedad. Los suelos poseen una propiedad denominada capacidad de retención de agua. Este factor tiene importancia pues da una idea del contenido de agua que se encuentra retenida en el espacio poroso del suelo. El valor en el que se produce una mayor biodegradación es aquel correspondiente a una capacidad de saturación de agua de alrededor del 50%, indicando que hay una proporción casi igual de agua y aire en los poros. Es importante aclarar que la

presencia de agua es imprescindible para la biodegradación, pues sin ella no es posible la vida de los microorganismos. Cuando un suelo se encuentra anegado, se saturan todos sus poros con agua y debido al metabolismo bacteriano, que consume el oxígeno presente, se transforma en un ambiente anaerobio. En estas condiciones es imposible la biodegradación pues es necesaria la presencia de oxígeno en los pasos iniciales de la oxidación de los hidrocarburos.

c) Oxígeno. La presencia de oxígeno es absolutamente necesaria para el paso inicial de la biodegradación de los hidrocarburos, tanto alifáticos como aromáticos. Este paso se lleva a cabo por enzimas oxigenadas que son dependientes del oxígeno molecular. Para mantener la presencia de oxígeno es necesario el laboreo del suelo contaminado, pues el consumo del oxígeno debido al desarrollo bacteriano aeróbico es considerable.

d) Características del suelo. No todos los suelos se comportan de igual manera durante los procesos de biodegradación, siendo los suelos arcillosos los más dificultosos para una rápida disminución de la cantidad de hidrocarburos. Las características del suelo que más influyen en este proceso son las siguientes: textura, capacidad de retención de agua, tamaño de los poros (que se encuentra influenciado por los porcentajes de arcilla y arena que contiene el suelo).

Factores ambientales químicos del suelo

Los factores químicos del suelo que poseen mayor influencia sobre la biodegradación son los siguientes: calidad y cantidad de nutrientes inorgánicos presentes, contenido de materia orgánica y presencia de cobertura vegetal con la posibilidad de formar micorrizas, o asociaciones de raíces con bacterias que actúen simbióticamente en el proceso de biodegradación. Todos estos parámetros son más fácilmente controlables que otros factores ambientales, y de hecho son los que

se consideran en la biodegradación asistida o bioestimulación.

Características de la microbiota

La microbiota está integrada por bacterias, hongos y algas. En los procesos de biorremediación en suelos, las bacterias cumplen un rol fundamental, pues son las que mineralizan la mayor parte de los hidrocarburos del petróleo. La actividad de los hongos tiene importancia, principalmente, en relación a aquellos compuestos que no son degradados por las bacterias. La importancia de las bacterias radica en una serie de cualidades que se enumeran a continuación:

- Pequeño tamaño
- Amplia distribución
- Amplia superficie de contacto con el hábitat
- Alto potencial de actividad metabólica
- Maleabilidad genética
- Alta tasa de crecimiento
- Los microorganismos producen sólo reacciones termodinámicamente posibles

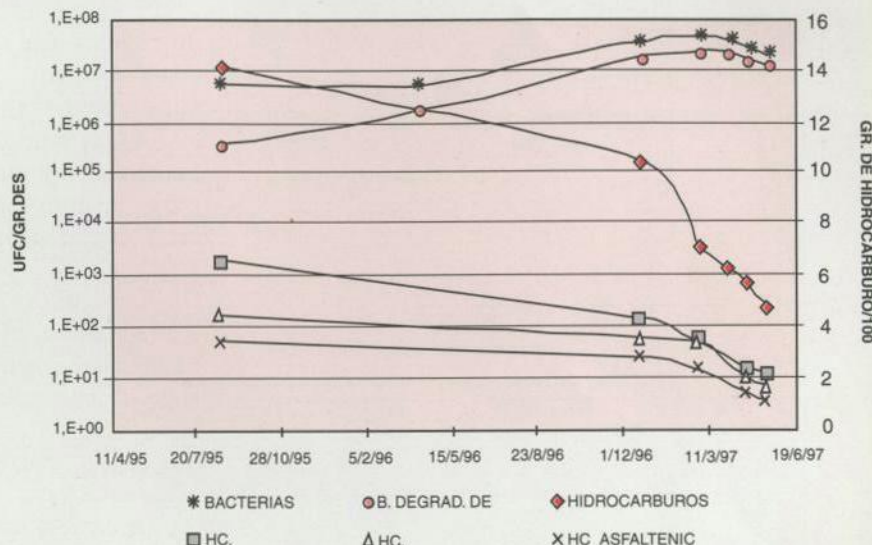
Los factores involucrados en la biodegradación que dependen de los microorganismos son de dos tipos: uno se relaciona con la cantidad y calidad de las bacterias en sí mismas y el otro con el conjunto de las diferentes especies bacterianas y de su cambio a través del tiempo. Estos factores se describen a continuación:

Cantidad y calidad de los microorganismos

- perfil de biodegradación de la comunidad
- perfil de degradación de cepas determinadas
- velocidad (cinética) de degradación
- resistencia de los microorganismos a las condiciones climáticas (deshidratación, temperatura, condiciones edáficas)

Biocenosis del suelo contaminado

- interacciones entre microorganismos
- capacidad de selección efectuada



por los hidrocarburos sobre los microorganismos

- condicionamiento mutuo entre los integrantes de la comunidad bacteriana y los hidrocarburos presentes en cada etapa

Ventajas y desventajas de la biorremediación

Es un proceso que presenta muchas ventajas y algunas desventajas. A continuación se enumeran las mismas.

Ventajas

- Es un proceso natural.
- Puede ser usado para la completa eliminación de una gran variedad de compuestos orgánicos.
- La mayor parte de los compuestos orgánicos considerados tóxicos pueden ser transformados en inocuos.
- Uno de los productos principales es la biomasa que no es considerada peligrosa por las regulaciones vigentes.
- Las variantes "in situ" producen la remediación sin necesidad de excavaciones y movimientos de tierra.

Desventajas

- No todos los compuestos xenobióticos son susceptibles de una rápida y completa biorremediación.
- Necesita controles frecuentes para corregir los problemas que pueden presentarse en la biorremediación.
- Requiere:
 - hábitat propicio.
 - biota activa sobre el contaminante.
 - concentración y calidad apropiada de nutrientes.

Seguimiento de la biorremediación

El seguimiento de la biorremediación tiene una importancia fundamental para resolver los problemas que puedan presentarse durante su realización. Las determinaciones que nos informan sobre este proceso son las siguientes:

- Enumeración de bacterias degradadoras de hidrocarburos y bacterias aeróbicas heterótrofas.
- Perfil de degradación de la comunidad.
- Perfil de degradación de cepas.
- Cantidad de petróleo en el suelo.
- Fracciones de petróleo.
- Concentración de nutrientes y su relación con el proceso.
- Actividad microbiana (cinética).

La enumeración de bacterias informa sobre la factibilidad de la continuación de la biodegradación. Especialmente la relación entre las bacterias degradadoras de hidrocarburos y las aeróbicas heterótrofas. Si la relación está cercana a cero el proceso se ha detenido; en relaciones cercanas a 1 la biodegradación se encuentra activa.

Los perfiles de degradación de hidrocarburos permiten conocer la potencialidad de degradación de la comunidad bacteriana y de cepas individuales. Conociendo estos datos pueden formularse inoculaciones de cepas autóctonas seleccionadas para corregir probables deficiencias de la comunidad autóctona.

La cuantificación de los hidrocarburos totales (por método extractivo-gravimétrico) mide el grado de limpieza que se va consiguiendo.

Una de las determinaciones que nos informan sobre el final de una biodegradación aceptable de petróleo crudo es el fraccionamiento cromatográfico en columna del residuo. La experiencia de varios procesos de

biodegradación indica que cuando se presenta una composición de residuos particular, la biodegradación efectiva en un tiempo aceptable no es posible (ver caso práctico).

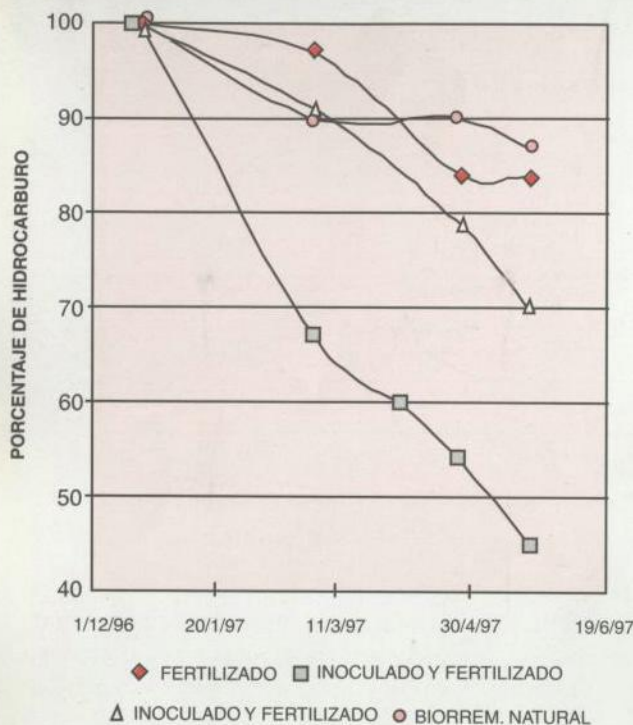
Criterios sobre el final de la biodegradación

- La biodegradación "in situ" no es total por la complejidad de asfaltenos y resinas.
- Un criterio ideal de finalización es cuando desaparece todo el hidrocarburo derramado.
- Otro criterio puede ser cuando se restablece el equilibrio microbiológico inicial o similar al inicial.
- Un criterio factible es cuando sólo se tienen parafinas de alto peso molecular, y hemos transformado la mayor cantidad de asfaltenos y resinas en compuestos fijos. Cuando esto se logra el cromatograma del residuo muestra un aspecto reconocible (trazado en negro del Gráfico 3).

Estudio de un caso práctico de biorremediación en un suelo patagónico

Se expondrá un caso práctico de biorremediación a campo que tenía una extensión aproximada de una hectárea y media. El suelo estaba constituido principalmente por arcilla y arena con un grado importante de áreas no cubiertas por vegetación. Esta última se presentaba en islas un po-

GRÁFICO 2. Variación en el contenido de hidrocarburos totales correspondiente a los cuatro sitios tratados.



co elevadas y en general eran escasas las plantas arbustivas en esos sectores. En las fotos 1 y 2 se muestra el aspecto producido por el derrame.

Debido a aspectos técnicos, la biorremediación se efectuó en dos etapas: la primera de ellas en forma general y en la segunda se efectuó un control mucho más específico en 4 modalidades de biorremediación:

- Biorremediación con aireación y humidificación.
- Biorremediación con aireación, humi-

los recuentos bacterianos, tanto de bacterias totales como degradadoras, y en el contenido de hidrocarburos, desde el relevamiento inicial (agosto de 1995) y durante ambas etapas del estudio realizado.

Durante todo el tratamiento de biorremediación, se efectuó un monitoreo periódico tanto de los nutrientes inorgánicos como del contenido de humedad y del pH (datos no mostrados), con el objeto de mantener las condiciones óptimas que permitieron

dificación y agregado de nutrientes.

- Biorremediación con aireación, humidificación e inoculación con una cepa seleccionada, autóctona.
- Biorremediación con aireación, humidificación, agregado de nutrientes e inoculación con una cepa seleccionada, autóctona.

Los resultados obtenidos en el seguimiento de la biorremediación se presentan en el Gráfico 1. En el mismo pueden observarse las variaciones ocurridas en

incrementar la velocidad de biodegradación de hidrocarburos.

En el primer período, desde febrero de 1996 a diciembre de 1996, se efectuó una biorremediación en la que sólo se mezcló el suelo con el residuo y se adicionaron nutrientes y agua en dos oportunidades durante todo esta etapa. Este biotratamiento se llevó a cabo nueve meses después del derrame, ocurrido en mayo de 1995, lo que permitió la volatilización de los componentes más livianos del contaminante. El resultado que se obtuvo fue una degradación del 25% de los hidrocarburos totales presentes en el suelo analizado, que puede considerarse escasa en relación al tiempo transcurrido. En este período, la mayor disminución de hidrocarburos correspondió a la fracción alifática, seguido en orden decreciente por la degradación de aromáticos y, finalmente, los hidrocarburos polares o asfaltenos constituyeron los más resistentes a la biodegradación.

En respuesta a la contaminación por hidrocarburos, se produjo un incremento en el desarrollo microbiano. Las bacterias aeróbicas y degradadoras de hidrocarburos aumentaron en uno y dos logaritmos, respectivamente, con respecto a la muestra inicial de suelo no contaminado.

La segunda etapa se realizó a partir de diciembre de 1996 hasta mayo de 1997. En el Gráfico 1 se pueden observar las variaciones en los recuentos bacterianos y en el contenido de hidrocarburos, en el sitio fertilizado e inoculado. En esta segunda etapa el aumento del número de bacterias fue sólo de un logaritmo, tanto para bacterias aeróbicas como para bacterias degradadoras de hidrocarburos. A pesar de este aumento poco significativo de la población microbiana, la degradación de los hidrocarburos totales que se encontraban presentes al inicio de la segunda etapa se incrementó sustancialmente, alcanzando un valor del 55 % en un período de 6 meses. Esto demuestra que la población microbiana se adaptó a las condiciones ambientales, presentando potenciales de utilización de hidrocarburos que



permitieron la biodegradación de distintos componentes del petróleo.

En el resto de los sitios tratados (Gráfico 2) se obtuvieron los siguientes porcentajes de biodegradación: 13% en suelo sin fertilización ni inoculación, 16% en suelo con fertilización y 30% en el suelo inoculado. Como puede observarse estos valores fueron significativamente menores a los alcanzados en el suelo inoculado y fertilizado.

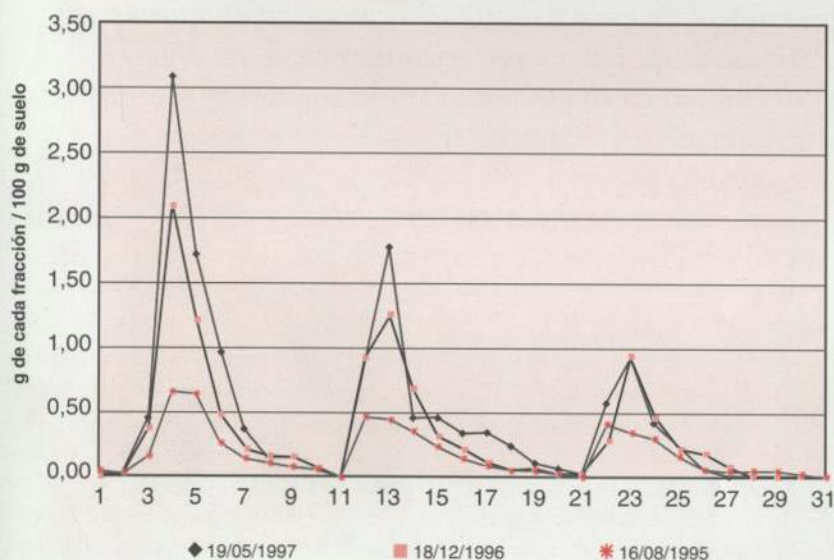
En el Gráfico 3 se muestra la variación en las tres fracciones de hidrocarburos (alifáticos, aromáticos y asfaltenos), durante la biodegradación ocurrida en el sitio inoculado y fertilizado. Se observa en el mismo, los resultados de las cromatografía en co-

curva corresponde a la muestra del mes de diciembre de 1996 (final de la primera etapa e inicio de la segunda), y en ella se observa una disminución

de hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Por último, la tercer curva muestra el contenido de las fracciones cuando finaliza el tratamiento de biorremediación, donde se evidencia que las mismas decrecieron hasta obtenerse porcentajes muy similares entre sí.

Se puede observar a través del tiempo, la susceptibilidad decreciente a la biodegradación de las tres fracciones estudiadas, siendo los hidrocarburos alifáticos la fracción más rápidamente degradable, seguida por los aromáticos y por último los hidrocarburos polares o asfaltenos.

GRÁFICO 3. En este gráfico podemos observar las variaciones a través del tiempo en el sitio fertilizado e inoculado de las tres fracciones estudiadas de petróleo. Los fracciones 1 a 11 corresponden a hidrocarburos alifáticos, las de 12 a 21 corresponden a hidrocarburos aromáticos y las de 22 a 31 corresponden a hidrocarburos polares (asfaltenos). La primera fracción en disminuir es la fracción alifática y también es la que disminuye en mayor proporción, le sigue la aromática y por último la de compuestos polares.



El CEIMA se dedica a temas de investigación en el área de microbiología del petróleo y se ha financiado hasta el presente con prestación de servicios técnicos y de investigación y desarrollo de empresas tales como YPF S.A., Tecpetrol S.A. Yacimiento El Tordillo, Dapetrol S.A. Yacimiento José II°, Amoco Argentina Oil Company, Yacimiento Cerro Dragón, Eg3 Refinería, Siderca S.A.

lumna fraccionada, desde el inicio de la contaminación (en el mes de agosto de 1995), cuando el petróleo crudo aún no había sido afectado por la acción de los microorganismos, hasta mayo de 1997. La curva correspondiente a agosto de 1995 representa las fracciones presentes en el suelo contaminado durante el relevamiento inicial, mostrando que el petróleo derramado contiene predominantemente hidrocarburos alifáticos. La segunda

Conclusiones

La biorremediación "in situ" de suelos semiáridos de la Patagonia Central se aplicó con éxito bajo condiciones optimizadas. La inoculación con un cultivo starter seleccionado, en combinación con la adición de nutrientes inorgánicos, aceleró significativamente el tratamiento de biodegradación.

Bajo condiciones optimizadas el 66% de los hidrocarburos totales contenidos en el suelo fueron degradados. Las diferentes tasas de biodegradación de las fracciones alifáticas, aromáticas y asfálticas dieron como resultado concentraciones finales semejantes y cambios significativos en la composición de los hidrocarburos residuales.