

BIORREMEDIACION DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

E. Ortiz; R. Núñez.; E. Fonseca; J. Oramas; V Almazán; Y. Cabranes; A. Miranda; O .Barbán, C. Martínez; Y. Díaz; y G. Borges.

Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR). Loma e/ 35 y 37, Alturas del Vedado, Ciudad de La Habana, C. P. 10 600, Cuba. Email: cebimar@ama.cu

RESUMEN

En la actualidad los suelos contaminados con hidrocarburos representan el 70% del total de los ecosistemas impactados. A partir del aislamiento, selección y conservación de bacterias marinas degradadoras de hidrocarburos y productoras de sustancias tensioactivas se formuló un producto denominado BIOIL-FC. Este producto ha sido aplicado satisfactoriamente en derrames de hidrocarburos en el mar. En el presente trabajo fue evaluada la factibilidad del uso de los procesos de biorremediación "ex situ" en parcelas de suelos contaminados con 10% de diferentes hidrocarburos (fuel oil, gasolina de 85% y de 96% de octanaje), utilizando técnicas de bioestimulación con nitrógeno y fósforo inorgánico y de bioaumentación con el producto BIOIL-FC. Durante la experiencia se tomaron muestras integradas cada siete días para las determinaciones de concentración de bacterias heterótrofas, biodegradadoras de petróleo, índice de respirometría y concentración de hidrocarburos totales. En cada variante se incrementaron significativamente los microorganismos degradadores de petróleo que utilizan estos compuestos como fuente de carbono y energía. Sin embargo, mediante la determinación de los hidrocarburos totales y producción de CO₂ se demostró una mayor eficiencia en la oxidación de los hidrocarburos con la aplicación de BIOIL-FC con respecto a la bioestimulación tradicional, lográndose un 50 y 61% de remoción del fuel oil y gasolina de 85% de octanaje respectivamente en 28 días, mientras que para gasolina de 96 % se alcanzó un 98% de remoción en solo 15 días. Estos resultados evidencian las potencialidades de este bioproducto para el saneamiento de ambientes terrestres impactados con petróleo y sus derivados.

Palabras claves: *biorremediación, bioestimulación, bioaumentación*

ABSTRACT

The contaminated land is around of 70 % of the total of polluted ecosystems of the earth. Based of the isolation, conservation and selection of marine bacteria hydrocarbon degraders was design a bioproduct called BIOIL-FC. This product has been used with excellent results in different oil spill. In this work was evaluated "ex situ" bioremediation process of contaminated ands with some hydrocarbons (fuel oil gasoline 85 % and 96% of octane number). In this experience was used the biostimulation with inorganic nitrogen and phosphorus and bioaugmentation with BIOIL-FC. During the experience was taken weekly integrated samples, in all the samples was determinate the heterotrophs bacteria concentration, hydrocarbon degrading bacteria, respirometry and hydrocarbons concentrations. In all of case the concentration of hydrocarbons degrading bacteria was increased. However in this work was demonstrated that the BIOIL-FC. Treated areas was more efficient the biodegradation process in comparation with traditional biostimulation systems, with BIOIL-FC was obtained 50 and 61% of remotion of fuel oil and gasoline 85% respectively in 28 days, however the gasoline (96% octane number) was removed at 98 % in only 15 days. In this work was demonstrated the satisfactory utilization of the bioproduct for the mitigation of contaminated land with crude oil and their derivates.

Key words: *bioremediation, biostimulatiton, bioaugmentation*

INTRODUCCIÓN

La contaminación con hidrocarburos en diferentes ecosistemas se ha incrementado en los últimos años debido al aumento en la actividad de exploración y producción de la Industria Petrolera. En la actualidad los suelos contaminados con estos compuestos representan el 70 % del total de los ecosistemas impactados (Swannell, 2000).

Los derrames de petróleo y sus derivados son considerados de gran impacto al ambiente por los nefastos daños que ocasionan en los ecosistemas impactados. Las investigaciones relacionadas con la biorremediación como alternativa eficiente para la recuperación de los mismos cobran cada vez mayor importancia.

La biorremediación está basada en la capacidad que tienen los microorganismos de crecer a partir de la utilización de sustancias recalcitrantes al medio ambiente (Shmaefsky, 1999, Mack Kay, 2001). Algunos de ellos son capaces de degradar estos compuestos hasta dióxido de carbono, sales, agua y otros productos inocuos al medio ambiente (Advanced BioTech, 2000) los cuales se integran posteriormente a los ciclos biogeoquímicos naturales (Mack Kay, 2001). Esta técnica permite tratar grandes volúmenes de contaminantes con un impacto ambiental mínimo, a diferencia de otros procedimientos de descontaminación (Molnaa y Grubbs, 2001).

La biorremediación puede ser aplicada “in situ” o “ex situ”. Las tecnologías “in situ” se refieren a las que se aplican en el área a tratar, mientras que en las “ex situ” los productos son aplicados al material contaminado donde pueda ser tratado (Gruiz y Kriston, 1995; Shmaefsky, 1999; Tuttle y Lester, 2001). Los procesos de biorremediación clasifican en técnicas de bioestimulación y bioaumentación. La técnica de bioestimulación se basa en el uso de nutrientes, sustratos o aditivos con actividad superficial para estimular el crecimiento y desarrollo de organismos capaces de biodegradar compuestos contaminantes del medio ambiente (Gruiz y Kriston, 1995; Baheri y Meysami, 2002; Núñez, 2003).

Las técnicas de bioaumentación describe la adición de organismos o enzimas a un material con el propósito de eliminar sustancias indeseables (Shmaefsky, 1999). La bioaumentación asegura que estén presentes los microorganismos específicos capaces de degradar al compuesto contaminante no deseado hasta sus moléculas básicas (Advanced BioTech, 2000). Las bacterias son los microorganismos más comúnmente utilizados para la bioaumentación (Shmaefsky, 1999; Saponaro et al, 2002).

A partir de un programa de aislamiento, selección y conservación de bacterias marinas hidrocarbonoclastas y productoras de sustancias tensioactivas se han formulados diferentes bioproductos para su aplicación en derrames de hidrocarburos, teniendo en cuenta que la extensión y diversidad taxonómica de los microorganismos marinos representan un potencial para obtener productos naturales bioactivos que garanticen la conservación del medio ambiente.

El cultivo mixto A-5, compuesto por bacterias marinas hidrocarbonoclastas forma parte del bioproducto BIOIL-FC (Núñez, 2003 y Núñez et al, 2003). Este bioproducto presenta una alta capacidad de oxidación del petróleo y sus derivados como resultado de la actividad metabólica de las cepas que lo integran.

El objetivo de este trabajo fue evaluar procesos de biorremediación “ex situ” a escala de laboratorio como una alternativa para el saneamiento de los suelos contaminados con hidrocarburos.

MATERIALES Y METODOS

Se diseñó un experimento con tres bloques, donde se evaluaron las técnicas de bioestimulación y bioaumentación con el producto BIOIL-FC, el cual está formado por bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de la plataforma cubana (Núñez, 2003) y que forman parte de la colección de bacterias marinas del Centro de Bioproductos Marinos.

Los estudios fueron realizados en parcelas (41 cm de largo x 30 cm de ancho x 2,5 cm de profundidad) de 3 Kg de suelos contaminados con un 10 % de fuel oil o gasolina regular (85 % o 96% de octanaje).

Las parcelas fueron aireadas semanalmente y la humedad fue controlada a un 20 %, además se añadió inicialmente 6 % (w/w) de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Se tomaron muestras integradas de las parcelas cada 7 días para las determinaciones de concentración de bacterias heterótrofas, biodegradadores de petróleo, índice de respirometría y concentración hidrocarburos totales.

Concentración de heterótrofos totales presentes en el suelo (ISO 4833: 1991 e ISO 6837: 1993): A partir de muestras de suelo se realizaron diluciones seriadas, las cuales fueron inoculadas a razón de 100 μL en placas, que fueron incubadas a 30°C durante 48 horas. Luego del tiempo de incubación se realizó el conteo directo de las colonias viables formadas expresado en $\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ de suelo.

Determinación de microorganismos degradadores: Se utilizó el conteo de viables expresados en UFC g^{-1} de suelo en el medio propuesto por Finnerty (1994) y utilizando petróleo crudo Varadero de 11 API como única fuente de carbono y energía.

Producción de CO_2 (Respirometría): Se determinó la cantidad de CO_2 producido como indicador indirecto de la actividad microbiana, expresado en mg de CO_2 producidos por m^2 de suelo por días (Viale e Infante, 1997).

Velocidad específica de crecimiento (μ): Se determinó en la fase exponencial del crecimiento, utilizando el modelo de crecimiento no restringido (López y Gódia, 1998).

Determinaciones analíticas

Gravimetría: Se realizó por la metodología descrita en el Standard Methods, según la norma internacional APHA 5520. (APHA, 1995).

Espectroscopía Infrarroja: El extracto obtenido por gravimetría, fue resuspendido en 10 mL de n-hexano y sometido a espectroscopía infrarroja en un espectrómetro Konik, en celdas de Bak con separador de teflón de 0,025 mm.

Cromatografía gaseosa de alta resolución: Para la determinación cuantitativa y cualitativa el petróleo residual después de interactuar con las bacterias, el hidrocarburo fue inyectado en un cromatógrafo de gases HP6890 con detector iónico de llama (GC/FID), con columna capilar HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno impregnada con 0v-101. Se utilizó helio como gas portador. El gradiente de temperatura programado fue de 45-100°C a 3 °C min^{-1} y de 100-300°C a 5 °C min^{-1} .

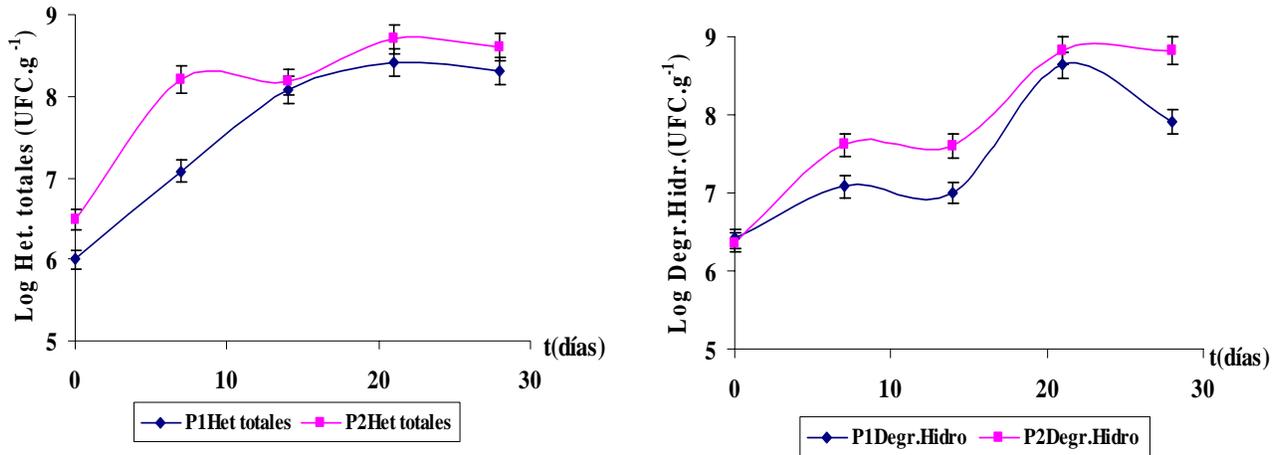
Tratamiento estadístico de los resultados

Todas las experiencias se realizaron con tres repeticiones y una vez que se verificó el cumplimiento de la distribución normal de los datos según Kolmogorov y Smirnov y la homogeneidad de varianzas por el método de Bartlett, se realizó el análisis de varianza de clasificación simple y la prueba de comparación de medias de rangos múltiples de Duncan (Lerch, 1977) en la cual las medias que se diferencian se expresan con diferente letra. Todos los resultados fueron procesados con el paquete estadístico Statística 4.0 y/o Excel 7.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSION

La manipulación y transporte de crudo y sus derivados ha incrementado notablemente los derrames de éstos en diferentes ecosistemas. Los suelos contaminados requieren de tratamientos eficientes que permitan su recuperación y su posible reutilización.

En las figuras 1, 2 y 3 se muestran el comportamiento de las concentraciones de microorganismos determinados en las parcelas durante el tratamiento de suelos contaminados con 10 % de gasolina de 85 % de octanaje, gasolina de 96 % de octanaje y fuel oil respectivamente. En cada experiencia se produjo un notable incremento de la población de microorganismos heterótrofos y degradadores de petróleo. Estos últimos predominaron en el total de bacterias heterótrofas al final de la experiencia, por su capacidad de utilizar los hidrocarburos como única fuente de carbono y energía (Figuras 1, 2 y 3).



a b
 Figura 1. Variaciones de la concentración de bacterias heterótrofas (a) e hidrocarbonoclastas (b) en el tiempo durante el proceso de biorremediación de suelo contaminado con 10 % de gasolina (85% octanaje), mediante la utilización de la bioestimulación y la bioaumentación con BIOIL-FC (Duncan, $p < 0,05$).

P₁ Bioestimulación (N₂, P) $\mu_{(\text{heterótrofos})} = 0,015^b \pm 0,001$ $\mu_{(\text{degradadores})} = 0,009^b \pm 0,003$
 P₂ Bioaumentación (N₂, P, BIOIL-FC) $\mu_{(\text{heterótrofos})} = 0,023^a \pm 0,002$ $\mu_{(\text{degradadores})} = 0,017^a \pm 0,002$

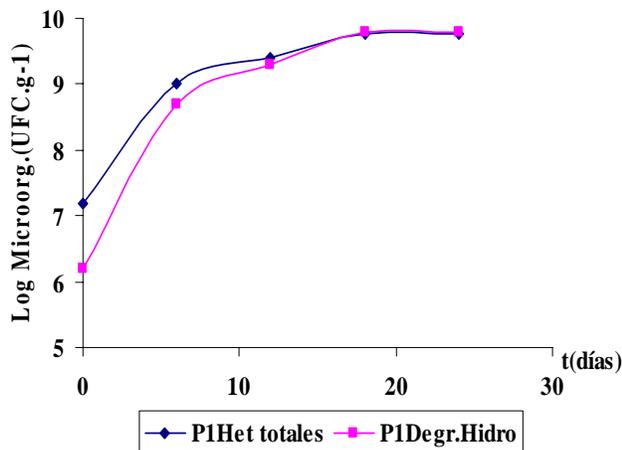


Figura 2. Variaciones de las concentraciones de bacterias heterótrofas y degradadores de hidrocarburos utilizando el BIOIL-FC en la biorremediación de suelos contaminados con un 10% de gasolina (96 % octanaje) (Duncan, $p < 0,05$).

$\mu_{(\text{heterótrofos})} = 0,032 \pm 0,001$ $\mu_{(\text{degradadores})} = 0,027 \pm 0,002$

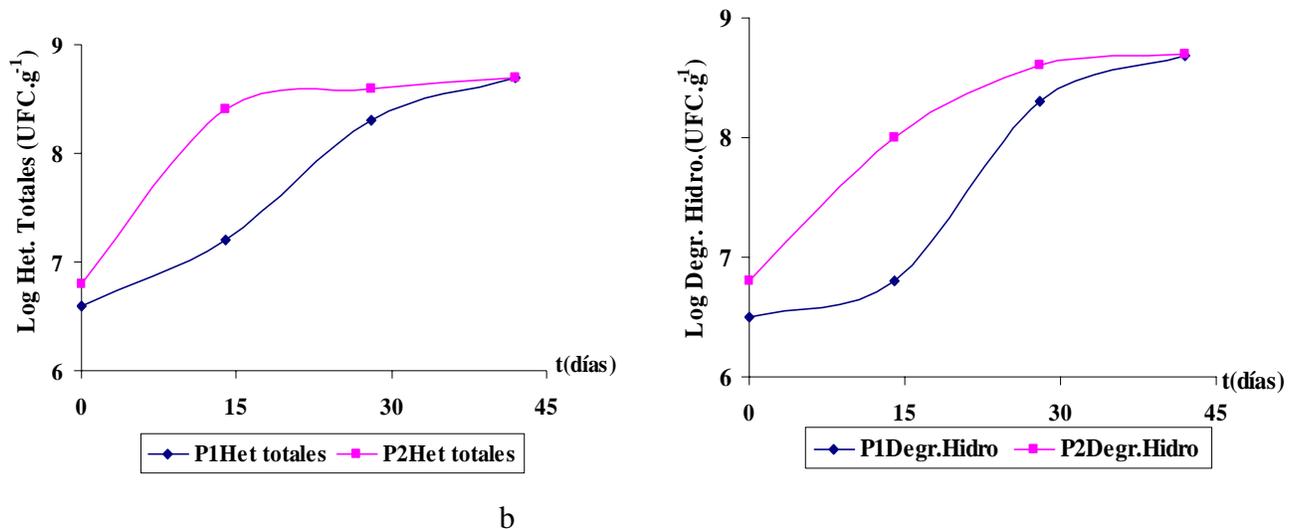


Figura 3. Concentración de bacterias heterótrofas (**a**) e hidrocarbonoclastas (**b**) en el tiempo durante el proceso de biorremediación de suelo contaminado con 10 % de fuel oil, mediante la utilización de la bioestimulación y la bioaumentación con BIOIL-FC. (Duncan, $p < 0,05$).

P₁ Bioestimulación $\mu_{(\text{heterótrofos})} = 0,011^b \pm 0,001$ $\mu_{(\text{degradadores})} = 0,006^b \pm 0,002$
 P₂ Bioaumentación $\mu_{(\text{heterótrofos})} = 0,015^a \pm 0,001$ $\mu_{(\text{degradadores})} = 0,010^a \pm 0,001$

Para las parcelas donde se evaluó el producto BIOIL-FC se obtuvo mayores μ de heterótrofos totales y degradadores de hidrocarburos con respecto a las alcanzadas en el método tradicional de biorremediación (bioestimulación). Este comportamiento debe estar determinado por la adición de microorganismos degradadores de crudo que garantizan la multiplicación celular en estas condiciones (Lee y Tremblay, 1995, Magot et al, 2000), y que son los responsables de la degradación de los hidrocarburos (Figuras 4, 5 y 6), a diferencia de la variante de bioestimulación donde la actividad metabólica de la microbiota autóctona se inhibe por la presencia de estos contaminantes.

En las figuras 4, 5 y 6 se presenta el comportamiento de las concentraciones de CO₂ y niveles de hidrocarburos con respecto al tiempo durante la evaluación de los procesos de biorremediación de suelos contaminados con los tipos de hidrocarburos evaluados.

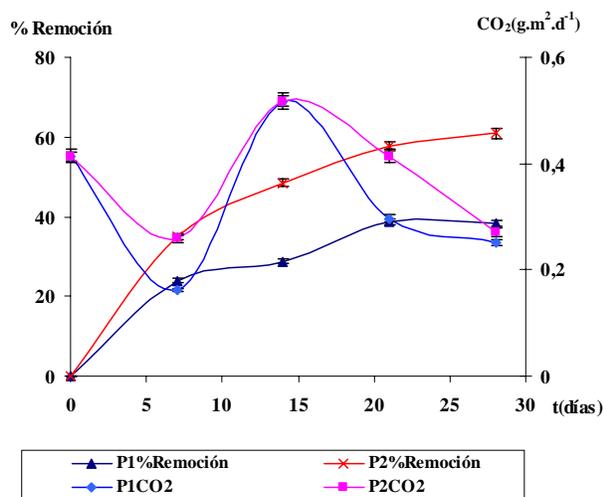


Figura 4. Variaciones de las concentraciones de CO₂ y porcentajes de remoción en las diferentes parcelas para la biorremediación de suelos contaminados con un 10% de gasolina (85% octanaje) (Duncan, $p < 0,05$).

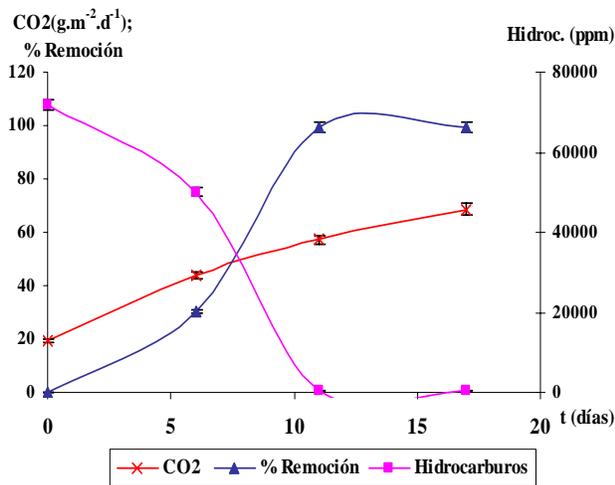


Figura 5. Variaciones de las concentraciones de CO₂, hidrocarburos totales y porcentaje de remoción durante la biorremediación de suelos contaminados con 10 % de gasolina (96 % de octanaje) con BIOIL-FC (Duncan, p<0,05).

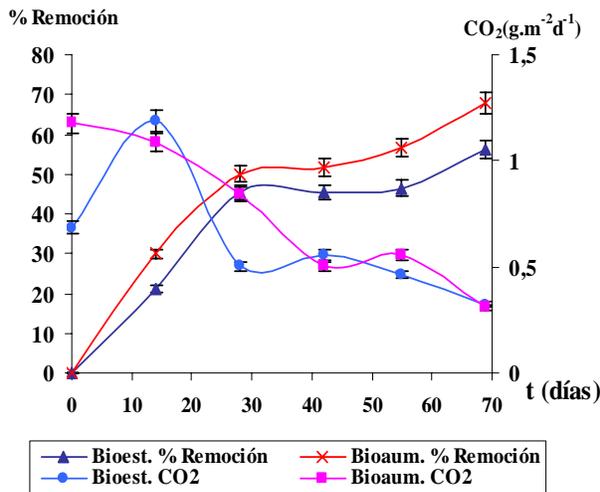


Figura 6. Variaciones de las concentraciones de CO₂, hidrocarburos totales y porcentaje de remoción durante la biorremediación de suelos contaminados con 10 % de fuel oil con BIOIL-FC (Duncan, p<0,05).

Para todas las variantes se detectó la disminución de los hidrocarburos en el tiempo, aunque en los casos donde se evaluó la bioestimulación tradicional el porcentaje de remoción fue significativamente inferior a las parcelas con BIOIL-FC, ya que la microbiota autóctona no debe presentar una alta velocidad de biotransformación.

En las parcelas con BIOIL-FC se logró una mayor eficiencia en la oxidación de los hidrocarburos aunque para cada uno se alcanzaron diferentes porcentajes de remoción, de manera que para el fuel oil y gasolina de 85% de octanaje se alcanzaron 50 y 61% de remoción respectivamente en 28 días, mientras que para gasolina de 96 % se alcanzó un 98% en solo 15 días. Es conocido que las diferencias en la composición y concentración de hidrocarburos en el petróleo influyen en su biodegradación. Así, un mismo microorganismo, puede presentar diferentes porcentajes de degradación ante crudos de diferente procedencia o composición química en iguales condiciones experimentales (Lee y Levy, 1989; Jackson y Pardue, 1999).

La adición de microorganismos degradadores de crudo en las parcelas con BIOIL-FC facilita los procesos de bioconversión de estos en compuestos no tóxicos y biodegradables, aún cuando pudiera existir

un agotamiento de algún nutriente. Estudios realizados por Núñez (2003) demostraron que una de las cepas integrante de ese biopreparado (*Bacillus alcalophilus* CBM-225) puede llevar a cabo la bioconversión de diferentes hidrocarburos presentes en el petróleo hasta CO_2 y H_2O .

Además, es importante destacar que en la formulación del bioproducto se incluye un biotensioactivo de tipo emulgente producido por una de las cepas que lo integran (*Bacillus licheniformis* CBM-60), que favorece los procesos de emulsificación de hidrocarburos y por tanto una mayor disponibilidad de este sustrato como fuente de carbono (Ortiz, 2004).

La presencia de tensioactivos debe modular la hidrofobicidad de la superficie celular facilitando la adhesión y colonización de la interfase (Köhler et al, 2000). Esto permite la incorporación del hidrocarburo a la célula para llevar a cabo los procesos metabólicos que conduzcan a la multiplicación celular a partir de los hidrocarburos como única fuente de carbono y energía (Ábalos, 2001), sin que se produzcan reacciones adversas que inhiban la permeabilidad de la membrana celular como ocurre para tensioactivos obtenidos por síntesis química (Ducreux et al, 1994).

En cuanto al comportamiento de la concentración de CO_2 se detectaron fluctuaciones a lo largo de la experiencia para cada hidrocarburo evaluado, aunque en general los máximos valores se alcanzaron en la parcela con BIOIL-FC, lo cual nos indica que en dicha parcela existió una mayor actividad microbiana pues existe un mayor porcentaje de remoción de hidrocarburos que no sólo debe estar relacionado con su oxidación; sino también por reacciones de biotransformación de este sustrato que facilitan su biodegradación posterior hasta CO_2 y H_2O .

El análisis cualitativo de la degradación de la gasolina de 96 % de octanaje demostró las diferencias entre los perfiles cromatográficos de este hidrocarburo sin degradar y los residuos luego del contacto con el bioproducto BIOIL-FC (Figura 7).

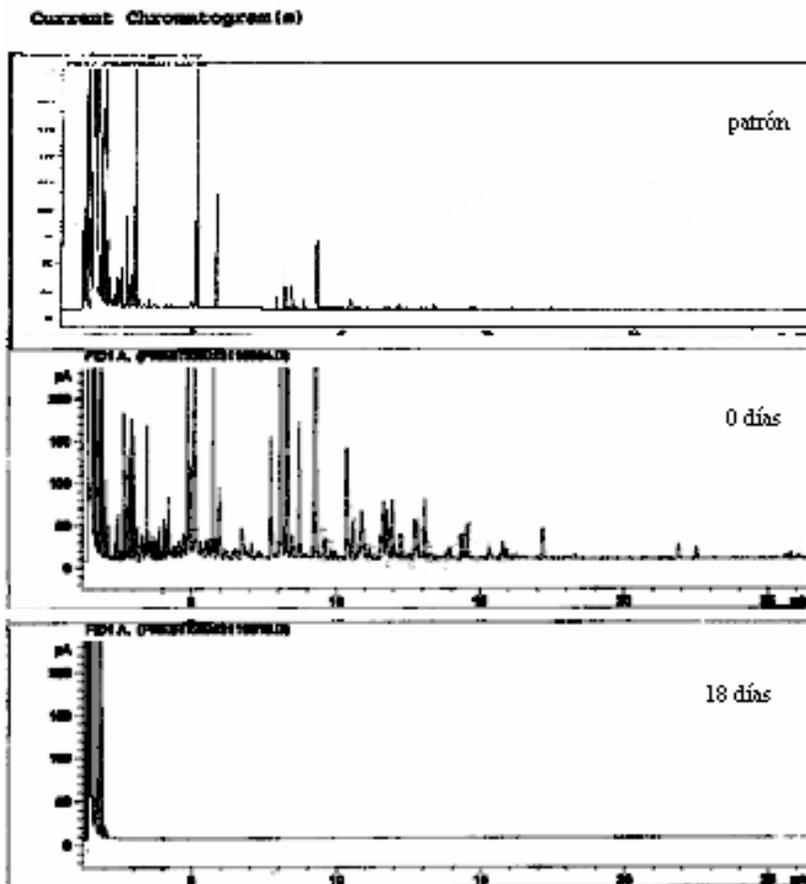


Figura 7. Perfil cromatográfico de la gasolina (96 % de octanaje) residual luego del contacto con BIOIL-FC en procesos de biorremediación “ex situ” de suelos contaminados.

En la figura 7 se muestra el perfil cromatográfico del patrón de la gasolina de 96 % de octanaje, donde aparecen los picos correspondientes a las parafinas que la constituyen. El análisis cualitativo de la muestra de tiempo cero demuestran la presencia de otros hidrocarburos en la matriz de tierra, que corresponde con los no volátiles que perduran por tiempo indefinido en el ambiente y que sólo son susceptibles a la biodegradación microbiana.

El perfil cromatográfico, luego de 18 días de contacto con el producto BIOIL-FC, evidencia la disminución notable de los picos denominados contaminantes para el ecosistema. Estos resultados corroboran los obtenidos mediante la cuantificación de los hidrocarburos, demostrando cualitativamente la efectividad del proceso de biorremediación por bioaumentación con BIOIL-FC.

CONCLUSIONES

La biorremediación por bioestimulación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando el producto BIOIL-FC fue superior a la técnica de bioestimulación tradicional con nutrientes, lo cual evidencian las potencialidades de este bioproducto para el saneamiento de ambientes terrestres impactados con petróleo y sus derivados.

BIBLIOGRAFIA

- Abalos, A. (2001). "Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta. Caracterización y aplicación del producto". Tesis de Doctorado. Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias. Universidad de Barcelona
- Advanced BioTech, (2000). "Why add microbes?" Advanced BioTech, California, USA. http://www.adbio.com/bioem/why_add_microbes.htm
- APHA (1995). Standard Methods for the examination of water and wastewater. Grasas y aceites 18th ed. APHA_AWWA-WEF. 5520, pp: 534-540.
- Baheri, H. y Meysami, P. (2002). Feasibility of Fungi Bioaugmentation in Composting a Flare Pit Soil. **Journal of Hazardous Materials**. 89: 2-3: 279-286
- Ducreux, J., Ballerini, D. y Bocard, C. (1994). The role of surfactants in enhanced in situ bioremediation. **Hydrocarbon Bioremediation**. Ed. Lewis Publishers. Boca Raton. pp 237-242.
- Finnerty, N.R. (1994). Biosurfactants in environmental Biotechnology. **Curr. Opin. Biotechnol.** 5(3): 291-295;
- Gruiz, K y Kriston, E. (1995). In situ bioremediation of hydrocarbon in soil. **Journal of Soil Contamination**. 4(2): 163-173.
- ISO 4833:1991 (E). International Standard. Microbiology-general guidance for the enumeration of micro organism colony count technique at 30 °C.
- ISO 6887:1993 (E). International Standard. Microbiology: General guidance for the preparation of dilutions for microbiologica examination.
- Jackson, W. A. y Pardue, J. H. (1999). Potential for intrinsic and enhanced crude oil biodegradation in Louisiana's freshwater marshes. **Wetlands**. 19(1): 28-34.
- Köhler, T., Kocjancic, L., Barja, F., van Delden, C. y Pechére, J.C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. **J. of Bacteriol.** 182, 5990-5996.
- Lee, K. y Levy, E. M. (1989). Enhancement of the natural biodegradation of condensate and crude oil on beaches of Atlantic Canada. Proceedings of the Oil Spill Conference, American Petroleum Institute. Washington, D.C. pp 479-487.
- Lee, K. y Tremblay, G. H. (1995). Biorremediación de oiled beach sediments. Assessment of inorganic and organic fertilizers, evolving technologicis. Oil spill Conference, API. Washington DC, USA. 107-

112.

Lerch, G. (1977). *La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas*. Ed. Científico Técnica. La Habana..

López Santín, J. y Gódia Casablanca, F. (1998). *Ingeniería Bioquímica*. 1^{ra} Edición. Ed. SINTESIS, S.A.

Mac Kay, N.I. (2001). Biorremediación. <http://www.ambienteNews.htm>. 1-4.

Magot, M.; Ollivier, B.; Patel, B. (2000). Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek*. 77: **AMOP**. 12:103-116.

Molnaa, B.A y Grubbs, R.B. (2001). Bioremediation of petroleum contaminated soil using microbial consortia as inoculum. <http://www.bugsatwork.com/default.htm>.

Núñez R. (2003). Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la bioremediación de derrames de hidrocarburos. Tesis de doctorado. Universidad de La Habana. Cuba.

Núñez, R., Oramas, J., Ortiz, E., Fonseca, E. y otros. (2003). BIOIL-FC: Tecnología de Biorremediación de derrames de petróleo en ecosistemas marinos. Memorias del V Congreso Internacional sobre Desastres Naturales. La Habana. Cuba.

Ortiz, E. (2004). “Obtención de un tensioactivo a partir de una bacteria marina para la biorremediación de la contaminación con hidrocarburos”. Tesis de Doctorado. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.

Saponaro, S; Bonomo, L.; Petruzzelli, G. Romele, L. y Barbarafieri, M. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) slurry face biorremediation of manufacturing gas plant (MGP) site age soil. **Water, air and soil pollution**. 135: 1-4: 219-236.

Shmaefsky, B.R. (1999). Bioremediation: Panacea or fad? Access Excellence. The National Health Museum. <http://www.accessexcellence.org/LC/ST/st3bg.html>

Tuttle, A y Lester, S. (2001). Biological remediation. <http://www.ambienteNews.htm> 1-10.

Viale, R. e Infante, C. (1997) Protocolo para medir producción de CO2 en suelo. Documento Técnico. INTEVEP. INT- STE – 0966.97.