

Bioaumentación y sustancias húmicas en la biodegradación de hidrocarburos del petróleo

Reyna Windevoxhel^{*,a}, Nereida Sánchez^a, Hector Bastardo^b, Nora Malaver^b

^aLaboratorio de Investigación y Tecnología de Suelo y Ambiente (LITSA-UC). Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela

^bLaboratorio de Microbiología Ambiental. Postgrado de Ciencias. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

Resumen.-

Se estudió el efecto de un producto húmico y la bioaumentación en la biorremediación de un suelo petrolizado mediante ensayos a escala de laboratorio. Se aislaron 29 cepas bacterianas del suelo contaminado y se conformó un cultivo mixto con aquellas que dieron respuesta positiva a un grupo de pruebas enzimáticas. La actividad hidrocarburolytica fue corroborada mediante ensayo en medio acuoso empleando gasoil como única fuente de carbono. El ensayo de biodegradabilidad en el suelo se construyó bajo un diseño de bloques al azar en parcelas divididas, estando la parcela principal definida por muestras del suelo contaminado con/sin adición de inóculo y la parcela secundaria por los tratamientos con 0 %, 1 %, 3 % y 5 % de humus, a los que se hizo seguimiento de la densidad bacteriana y el contenido de grasas y aceites durante 80 días. Los mayores niveles de remoción de aceites y grasas (97,2 %, 96,0 % y 93,1 %) se obtuvieron para los tratamientos con humus e inoculación combinados.

Palabras clave: bioaumentación, biodegradación, humus, suelo petrolizado

Bioaugmentation and humic substances in biodegradation of petroleum hydrocarbons

Abstract.-

The effect of a humic product and the bioaugmentation on the bioremediation of an oil contaminated soil by laboratory scale testing was studied. Twenty nine bacterial strains were isolated and a mixed culture was formed with those reporting positive responses to bioenzymatic tests. This hidrocarburolytic activity was confirmed in tests with aqueous medium using gasoil as the sole carbon source. The ground biodegradation test was built under a randomized block design in split plots, with the main plot defined by soil samples contaminated with/without addition of inoculums and the secondary plot treatments with 0 %, 1 %, 3 % and 5 % of humus, which is made up of bacterial density and the residual content of fats and oils for 80 days. The higher levels of removal of oils and fats (97,2 %, 96,0 % and 93,1 %) were obtained for humus and inoculation treatments combined.

Keywords: bioaugmentation, biodegradation, humus, oil contaminated soil

Recibido: enero 2011 ¹

Aceptado: marzo 2011

*Autor para correspondencia

Correo-e: rwindevo@uc.edu.ve (Reyna

Windevoxhel)

¹Un avance de este trabajo fue presentado en el XVIII Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo en San José de Costa Rica, Noviembre 2009

1. INTRODUCCIÓN

Tras muchos años de investigación en el desarrollo de tecnologías para tratar sustratos contaminados con hidrocarburos, la biorremediación, que aprovecha la actividad metabólica de microorganismos para eliminar y/o modificar contaminantes, es la más aceptada, por los bajos costos relativos asociados y por su sustentabilidad ambiental [1].

Si bien los procesos de biorremediación se dan de forma natural en la mayoría de los casos, muchas veces, por las características que rodean el enclave contaminado, es necesario acelerar este proceso, para lo cual la biorremediación asistida incorpora diversas técnicas que persiguen mejorar las condiciones para que se de el ataque microorganismo-contaminante. Entre ellas, la bioaumentación, en la que se inoculan al suelo microorganismos (nativos o exógenos) con capacidad comprobada para degradar los contaminantes presentes en el suelo multiplicados “*in vitro*”, ha demostrado en muchos casos tener un efecto muy positivo [1,2]; y también la adición de sustancias húmicas, por su propiedades surfactantes, reguladoras de pH, aporte de nutrientes, elevación de la capacidad de intercambio catiónico y comportamiento como aceptores de electrones [3] es de interés para la estimulación de la actividad bacteriana degradadora.

2. MATERIALES y MÉTODOS

Se colectó una muestra compuesta de un suelo (arenoso-franco) contaminado con crudo mediano (7,9 % de grasas y aceites) al cual se le realizó una caracterización física, química y microbiológica. La flora bacteriana fue activada y se sembraron diluciones en placas, a partir de las cuales se aislaron y purificaron 30 colonias, las cuales se sembraron en distintos medios para detectar habilidades enzimáticas de interés. Con las cepas que arrojaron actividad positiva se conformó un inóculo mixto, cuyo crecimiento se verificó midiendo el aumento en la densidad óptica del cultivo en función del tiempo.

Para un estudio preliminar del potencial degradador del cultivo se establecieron 18 unidades experimentales a nivel de microcosmos para realizar ensayos de biodegradabilidad de gasoil en presencia y ausencia del “humus líquido” (HL), sustancia de la cual se había probado su capacidad degradadora en trabajos anteriores [5,6]. Se utilizaron Erlenmeyers de 250 mL con 93 % de medio mineral Bushnell-Haas (MM), 5 % de inóculo y 2 % de gasoil como única fuente de carbono [5,6]. Se evaluaron cinco tratamientos, con tres repeticiones cada uno: se

aplicó tratamiento con HL al 1 %, 3 % y 5 % (sustituyendo parcialmente el agua de dilución); se realizó un control biótico en ausencia de HL; y dos controles abióticos: uno sin humus y otro con humus al 3 %, en ambos casos se esterilizó el medio con solución 1 M de AgNO_3 como biocida, verificándose la ausencia de microflora bacteriana.

Los microcosmos fueron incubados a temperatura ambiente (25–31°C) durante 20 días con agitación durante 30 minutos cada 24 horas. Al inicio y final del experimento se determinó el contenido de aceites y grasas según el método gravimétrico 846 de la EPA, y los heterótrofos mesófilos mediante la técnica de placa vertida.

Para el ensayo de biodegradabilidad en suelo una muestra del suelo contaminado (crudo mediano) fue encalada (para ajustar el pH de 5,50 a 7,05), se ajustó la relación C:N:P a 100:10:1 [1, 7, 8] mediante la adición de fertilizantes inorgánicos como fuente de fósforo (ortofosfatos) y nitrógeno amoniacal, y fue cernida (malla de 2mm) y distribuida en bandejas en porciones de 01 kg para la aplicación por triplicado (muestras destructivas) de los tratamientos descritos en la Tabla 1. El inóculo y la sustancia húmica fueron añadidos únicamente al inicio del experimento. Se mantuvo el contenido de humedad alrededor del 50 % de la capacidad de retención de agua [1,6] determinado según el método gravimétrico 2540-B de la APHA. Para minimizar la degradación de hidrocarburos debida a reacciones fotolíticas las unidades experimentales se mantuvieron en un aula cerrada con una mínima exposición a la luz solar. Se determinaron los heterótrofos mesófilos mediante la técnica de placa vertida, pH según el método 9071 de la EPA, y los hidrocarburos residuales se cuantificaron según el método 846 de la EPA empleando cloroformo como extractante.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó una densidad bacteriana de $3,2\text{E}06$ en el sustrato. Se identificaron 08 cepas que presentaron actividad positiva en las pruebas bioquímicas, con las cuales se conformó un cultivo. En todos los ensayos en medio acuoso, a excepción de los controles abióticos, se veri-

Tabla 1: Tratamientos aplicados en suelo

Sistema	Tratamiento	Objetivo
SH1	Adición de inóculo al 5 % y de HL al 1 %	Evaluar el efecto de la concentración de HL en la biodegradabilidad del gasoil con bioaumentación
SH3	Adición de inóculo al 5 % y de HL al 3 %	
SH5	Adición de inóculo al 5 % y de HL al 5 %	
SCH1	Control biótico de SH1. Sin inóculo y con adición de SH al 1 %	Evaluar el efecto de la concentración de HL en la biodegradabilidad del gasoil sin bioaumentación
SCH3	Control biótico de SH3. Sin inóculo y con adición de SH al 3 %	
SCH5	Control biótico de SH5. Sin inóculo y con adición de SH al 5 %	
SCB	Control biótico. Con inóculo (5 %) y sin HL	Evaluar la biodegradabilidad del gasoil en ausencia de HL con bioaumentación
SCA	Control abiótico (AgNO_3 1 M) sin HL	Evaluar la pérdida abiótica de gasoil en ausencia de microorganismos y HL
SCAH	Control abiótico (AgNO_3 1 M) con HL	Evaluar la pérdida abiótica de gasoil en presencia de HL y ausencia de microorganismos

ficó crecimiento bacteriano. También se detectó la formación de una interfase emulsionada en todos los ensayos con humus, lo cual permite presumir la presencia de propiedades surfactantes en el humus, y coincide con el mayor porcentaje de remoción (89,5 %) obtenido para el tratamiento con humus al 5 %, que disminuyó con la proporción de humus en la mezcla (65,3 % con humus al 3 %, 50,0 % con humus al 1 % y 28,5 % sin humus. Es sabido que con los hidrocarburos del petróleo la actividad surfactante aumenta la superficie de contacto (de ataque) del sustrato haciéndolo más biodisponible y por lo tanto más fácilmente biodegradable.

Para el estudio en suelo se observó un mayor crecimiento bacteriano (Figura 1) para los tratamientos SH3 y SH5, posiblemente debido al mayor aporte de nutrientes provenientes del humus así como a su posible efecto surfactante que facilita el ataque a los hidrocarburos. La densidad bacteriana en los ensayos inoculados se mantuvo por encima de la que presentaron los respectivos controles no inoculados, y en todos estos casos fue superior a la del control biótico sin humus, observándose que la presencia de humus

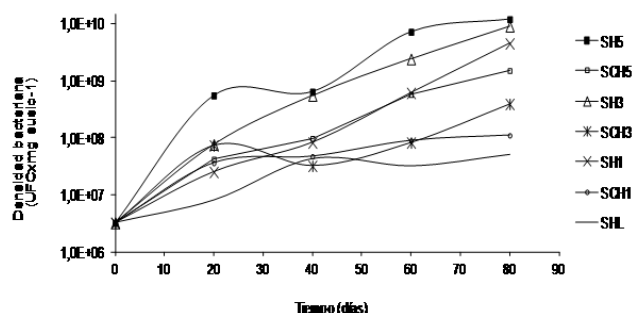


Figura 1: Densidad bacteriana en suelo

favorece el crecimiento bacteriano, y que una mayor concentración de humus genera una mayor densidad bacteriana. En la Figura 1 no se muestran los ensayos abióticos (SCA y SCAH) por no haber presentado crecimiento bacteriano relevante, como es de esperarse. El contenido residual de grasas y aceites (Figura 2) disminuyó progresivamente para todos los casos, excepto para los controles abióticos. Análogo al comportamiento de la densidad bacteriana, se observa una mayor remoción (Figura 3) en los tratamientos con humus respecto

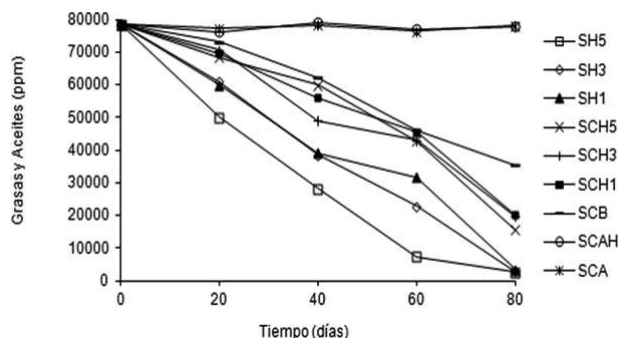


Figura 2: Contenido residual de grasas y aceites en suelo

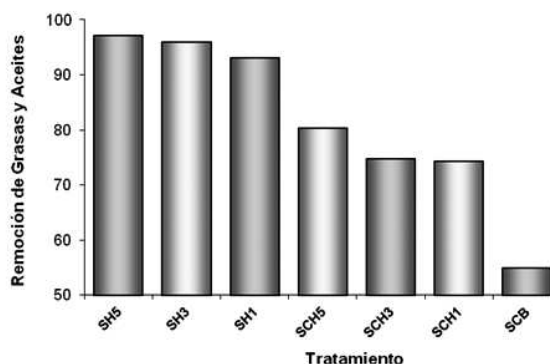


Figura 3: Remoción de grasas y aceites (en los controles abióticos no hubo remoción)

a los controles bióticos sin humus, lo cual se espera ya que un incremento en la densidad de la microflora degradadora presupone una mayor tasa de degradación del sustrato. Se evidencia también un aumento de la remoción a medida que se eleva la concentración de humus para el rango de concentraciones estudiado —a diferencia de los resultados obtenidos por Windevoxlhel y col. (2011)— lo que permite inferir que en este estudio a medida que aumenta la concentración de humus en el medio el contaminante se hace más biodisponible para la población microbiana degradadora.

Los resultados fueron sometidos a un análisis de la varianza utilizando el programa Statistix 8.0 luego de verificar los supuestos básicos; el supuesto de normalidad mediante la prueba de Wilk-Shapiro, la prueba de Barlett para la verificación de la homogeneidad de las varianzas y la prueba de

Tukey para evaluar el supuesto de normalidad. El análisis de la varianza mostró diferencias significativas ($P < 0,01$) en los términos correspondientes a presencia de inóculo y en cuanto a las diferentes dosis de sustancias húmicas evaluadas en los suelos. Se utilizaron la prueba W de Tukey y el coeficiente de correlación de Pearson.

4. CONCLUSIONES

La bioaumentación con un inóculo autóctono fue favorable para la biodegradación de los hidrocarburos en todos los casos estudiados.

La incorporación de humus líquidos al suelo aceleró las tasas de biodegradación en todos los casos.

Se obtuvieron los mayores niveles de remoción de grasas y aceites en los casos en que se emplearon los tratamientos de bioaumentación y adición de humus combinados, con un aumento de la remoción para mayores concentraciones de humus.

Referencias

- [1] Atlas R. y R. Bartha (2002) *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Education. S.A. Madrid: 255 – 261.
- [2] Pozzo-Ardizzi, M., M. Ferrari y G. Calderón (2001) *Diseño y ejecución de un plan de biotratamiento para residuos (cortes) de perforación de la actividad petrolera, por la metodología de biodegradación con bioaumentación*. Ingeniería Sanitaria y Ambiental 54: 41–48.
- [3] Quagliotto, P., G. Viscardi, E. Montoneri, R. Goberro y F. Adani (2005) *Compost humic acid-like matter as surfactant*. Geophysical Research Abstracts, Vol. 7, 10555.
- [4] Hernández, A. y H. Bastardo (2003) *Caracterización Química de Biosurfactantes*. Universidad Central de Venezuela. Caracas: 1–10, 24–30.
- [5] Windevoxlhel, R., N. Sánchez, H. Bastardo y N. Malaver (2011) *Biorremediación de un suelo petrolizado empleando humus del río Caroní*. Ingeniería y Sociedad UC, Julio – Diciembre 2–2011 Vol.6 No. 2.
- [6] Araujo I., M. Montilla, N. Angulo, C. Cárdenas, L. Herrera, y G. morillo (2006) *Lodos activados y cepas bacterianas en la Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. Interciencia, abril año/ vol. 31 No 004. pp 268–275.
- [7] Acosta, G. (2008) *Evaluación por respirometría de la bioestimulación con nutrientes de la*

bioaumentación con Acinetobacter sp. en la biorremediación de suelos contaminados con diesel.
Url: www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis220.pdf, consultado 08/01/11.

- [8] Antonio, J., A. Martínez, F. Ramos, L. Sánchez, A. Martínez, J. Tenorio y M. Cuevas-Díaz (2011) *Biorremediación de un suelo contaminado con petróleo mediante el empleo de bagazo de caña con diferentes tamaños de partícula*. Multiciencias, Vol. 11, N° 2, 2011 (136 - 145) ISSN 1317-2255 / Dep. legal pp. 200002FA828.