

# **BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS EN SUELOS CONTENIDOS EN TERRARIOS**

**Belloso Claudio, Carrario Javier, Viduzzi Dario**

Belloso Claudio  
Mendoza 4197 - 2.000 Rosario - Argentina  
Tel-Fax: 041-380853 e-mail: belloso@satlink.com

Carrario Javier  
Pasaje Mateo Biglioni 761  
Corral de Bustos. Córdoba - Argentina  
Tel: 0468-22182

Viduzzi Dario  
Ruta 11 Km. 331 - 2.200 San Lorenzo - Argentina  
Tel-Fax: 0476-38200

Palabras Claves: Biodegradación. Landfarming. Hidrocarburos

## RESUMEN

Las tecnologías conocidas como Landfarming, Land Treatment o Land Application, son métodos de remediación de hidrocarburos del petróleo a través de la Biodegradación. Se inocularon suelos de landfarming con distintas cepas de bacterias aisladas del mismo suelo contaminado con hidrocarburos y propagadas en el laboratorio. Se aplicaron distintas concentraciones de nutrientes y se mantuvieron los suelos a la intemperie durante 90 días. La mayor tasa de biodegradación obtenida fue del 45 % en uno de los suelos ensayados.

## INTRODUCCION

La biodegradación de hidrocarburos en suelos es una alternativa que puede emplearse tanto para el tratamiento como para la disposición final de los residuos producidos por las refinerías de petróleo. En la actualidad se ha comenzado a comprender que la capacidad de autodepuración de los suelos es restringida y que las actividades de su población microbiana, verdadero motor de la biodegradación de residuos, se reprime con la incorporación masiva e irracional de residuos, ya sea por las altas concentraciones que retrasan su degradación o por su condición de residuos peligrosos (1).

Las tecnologías conocidas como Landfarming, Land Treatment o Land Application, son métodos de remediación de hidrocarburos del petróleo a través de la Biodegradación. Estas tecnologías consisten en la aplicación del suelo contaminado con hidrocarburos o en la aplicación de residuos de fondo de tanque de crudo en una fina capa sobre otro suelo preparado para tal fin.

La efectividad de estas metodologías dependen de innumerables factores, entre ellos, las características agronómicas, topográficas y microbianas del suelo receptor, características y composición de los residuos aplicados, condiciones climáticas, etc.

## OBJETIVO

Comparar la actividad hidrocarburofítica de distintas cepas bacterianas en suelos de landfarming contenidos en terrarios.

## MATERIALES Y METODOS

El suelo se obtuvo de un landfarming perteneciente a Refinería San Lorenzo S. A. ubicada en la Ciudad de San Lorenzo, Provincia de Santa Fe.

El hidrocarburo inicial calculado expresado como extractables en éter etílico fue igual a 5% p/p.

### Composición porcentual del residuo hidrocarbonado contenido en el suelo del landfarming

Clases de Hidrocarburos	Porcentaje
Saturados	44
Aromáticos	17
Resinas	14
Asfaltenos	25

El Carbono Orgánico Total inicial del suelo del landfarming fue de 1,07% p/p. Se construyeron 11 terrarios metálicos de 50 lts. de capacidad, en donde se colocaron 30 Kg. de suelo de landfarming por terrario.

Para evitar el contacto del suelo con el metal del terrario, se procedió a recubrir interiormente a los terrarios con una capa gruesa de resina epoxi no biodegradable en las condiciones del ensayo.

Se eligieron 3 cepas bacterianas para las inoculaciones, previa propagación en medio mineral líquido (3) con extractable etéreo (EE) como única fuente de carbono.

El EE se obtuvo por extracción del suelo del Landfarming durante 6 hs. con éter etílico mediante el empleo de un equipo Soxhlet.

### Medio Mineral Líquido (MML)

NaCl .....	5,0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O .....	0,2 g
KNO <sub>3</sub> .....	3,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro .....	1,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	1,0 g
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,0 g
Agua destilada c.s.p. ....	1000 ml

Las propagaciones se realizaron en reactores compuestos por recipientes cilíndricos de polipropileno de 1,5 lts. de capacidad con sistema de agitación continua.

Se descartó semanalmente el sobrenadante libre de biomasa y se repuso el medio mineral líquido con la fuente de carbono.

Las cepas elegidas para inocular se aislaron del mismo suelo del landfarming y se nombraron como W1, W2 y W3, ya que no pudo llegarse a la identificación total de las mismas.

Se realizó una sola aplicación de fertilizantes del tipo NPK al comienzo del ensayo.

Los fertilizantes empleados se formularon y se aplicaron de acuerdo a las siguientes proporciones:

Denominación	Relación C/N	Relación NPK	Fuente de Nitrógeno
Z1	20	20:2:1	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Z2	100	20:20:1	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>

### Cuadro 1. Inoculación de los terrarios

En cada uno de los terrarios se colocó el suelo, el fertilizante y el inoculo bacteriano de acuerdo al siguiente cuadro

Terrario N°	Matriz (Kg.)	Concentración inicial de Hidrocarburos (% p/p)	Control abiótico	Cepa inoculada	Fertilizante	Agua adicionada al comienzo del ensayo
1	suelo (30)	5,0	-	Ninguna	Ninguno	5 Lts
2	suelo (30)	5,0	HgCl <sub>2</sub>	Ninguna	Ninguno	5 Lts
3	suelo (30)	5,0	-	W1	Ninguno	5 Lts
4	suelo (30)	5,0	-	W2	Ninguno	5 Lts
5	suelo (30)	5,0	-	W3	Ninguno	5 Lts
6	suelo (30)	5,0	-	W1	Z1	5 Lts
7	suelo (30)	5,0	-	W1	Z2	5 Lts
8	suelo (30)	5,0	-	W2	Z1	5 Lts
9	suelo (30)	5,0	-	W2	Z2	5 Lts
10	suelo (30)	5,0	-	W3	Z1	5 Lts
11	suelo (30)	5,0	-	W3	Z2	5 Lts

El terrario N°1 contiene solamente el suelo sin fertilizante como testigo. El terrario N°2 contiene además HgCl<sub>2</sub> (2g/100g de mezcla seca) con el propósito de evaluar pérdidas abióticas de hidrocarburos.

**Figura 1:** Terrarios



Los terrarios una vez inoculados se mantuvieron a la intemperie durante 90 días, desde Julio a Octubre de 1996, se airearon semanalmente mediante mezclado de todo el contenido.

Al comienzo del ensayo y cada 30 días se determinó en cada suelo contenido en los terrarios los siguientes parámetros: pH, humedad, contenido de hidrocarburos, recuento de microorganismos aerobios totales y microorganismos degradadores de hidrocarburos.

El pH se midió en suspensiones del suelo al 40 % p/v en una solución de  $\text{CaCl}_2$  0,01M.

La humedad en las muestras de suelo se determinó por secado a 105 °C hasta peso constante.

El contenido de hidrocarburos se determinó gravimétricamente mediante extracción en Soxhlet con Eter Etílico durante 6 horas.

El recuento de microorganismos aerobios totales (MAT) se efectuó mediante un recuento directo en placa por la técnica del vertido (4) empleando como medio de cultivo Plate Count Agar (Merck), los cultivos se incubaron a 30°C durante 24 horas.

La determinación de microorganismos degradadores de hidrocarburos (MDH) se realizó mediante la técnica del Número Más Probable (4) empleando como medio de cultivo el caldo Bushnell - Haas (BH)(DIFCO)(5) con n-hexadecano como única fuente de carbono.

Tres series de tres tubos con 5 ml de medio BH se inocularon con 1,0 , 0,1 y 0,01 ml de una dilución apropiada del suelo. Luego de la inoculación se le agregó a cada tubo 0,05 ml de n-hexadecano previamente esterilizado por radiación UV y 0,1 ml de una solución estéril de resazurina de una concentración de 50 mg/l. A la resazurina se la usó como indicador de la actividad deshidrogenasa. Los cultivos se incubaron a 30°C durante 7 días.

**Cuadro 2.** Recuento inicial de microorganismos aerobios totales en cada terrario al comienzo del ensayo.

Terrario N°	UFC/g
1	$6,5 \times 10^5$
2	0
3	$1,2 \times 10^6$
4	$3,2 \times 10^6$
5	$6,7 \times 10^5$
6	$4,3 \times 10^6$
7	$4,8 \times 10^6$
8	$6,5 \times 10^6$
9	$3,0 \times 10^6$
10	$1,3 \times 10^6$
11	$1,7 \times 10^6$

**Cuadro 3.** Recuento inicial de microorganismos degradadores de hidrocarburos en cada terrario al comienzo del ensayo.

Terrario N°	NMP/g
1	$2,4 \times 10^8$
2	0
3	$4,6 \times 10^8$
4	$6,4 \times 10^7$
5	$4,6 \times 10^8$
6	$> 1,1 \times 10^9$
7	$1,1 \times 10^9$
8	$4,6 \times 10^8$
9	$> 1,1 \times 10^9$
10	$2,4 \times 10^8$
11	$> 1,1 \times 10^9$

## RESULTADOS

En el término de los 90 días la humedad varió entre 5 y 15% . El pH varió entre 4,7 y 5,3.

**Cuadro 4.** Resultados generales para cada uno de los terrarios

TERRARIO N°	CEPA INOCULADA	FERTILIZANTE TIPO NPK APLICADO	% TOTAL DE REDUCCION DE HIDROCARBUROS	% PARCIAL DE REDUCCION DE HIDROCARBUROS OBTENIDO A LOS:		
				30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
1	NINGUNA	NINGUNO	12	4	6	2
2	NINGUNA	NINGUNO	8	4	2	2
3	W1	NINGUNO	34	26	-2	12
4	W2	NINGUNO	43	26	16	9
5	W3	NINGUNO	22	13	1	10
6	W1	Z1	31	6	23	5
7	W1	Z2	38	29	5	8
8	W2	Z1	26	19	14	-6
9	W2	Z2	45	33	6	13
10	W3	Z1	33	17	5	15
11	W3	Z2	21	10	-2	15

Recuento de Microorganismos aerobios totales (valor medio en los 90 días):  $2,6 \times 10^6$  UFC/g.

Microorganismos Degradadores de Hidrocarburos (valor medio en los 90 días):  $8,8 \times 10^7$  NMP/g.

En la mayoría de los terrarios, los porcentajes más altos de reducción de hidrocarburos se observaron en los primeros 30 días. La mayor eficiencia de biodegradación se obtuvo en los terrarios N°9, 4 y 7. En el terrario N° 9 se obtuvo la mayor reducción, 45%, la cual es coincidente con algunos trabajos (2).

## CONCLUSIONES

La cepa W2 es la que parece poseer la mayor capacidad hidrocarburofítica. El Fertilizante Z2 ha demostrado ser más efectivo que el Z1; excepto en los terrarios en los cuales se inoculó la cepa W3. De acuerdo a la formulación de los fertilizantes, el proceso de biodegradación para la cepa W2 depende en gran manera del aporte de Fósforo, el cual podría ser uno de los nutrientes limitantes del proceso. Los recuentos bajos que se obtuvieron de MAT comparados con los MDH, se debe en principio a que se empleó la técnica de vertido en placa, en la cual, no todos los microorganismos capaces de crecer en superficie pueden crecer en profundidad. En general, la fertilización estimuló el proceso de biodegradación. Este tipo de cepa, una vez propagada, podría ser empleada para acelerar los procesos de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados.

## **BIBLIOGRAFIA**

- (1) Pozzo Ardizzi MG, Manacorda AM, Altamirano G, Pellejero G, Aschkar G, Pozzo Ardizzi MC, Lizzi F. 1996. Biodegradación de residuos de petróleo por bioaugmentación con bacterias nativas de suelos regionales. *Gerencia ambiental*, 391-393.
- (2) Ferrari MD, Albornoz C, Neirotti E. Biodegradabilidad en suelo de hidrocarburos residuales en fondos de tanques de almacenamiento de petróleo. *Revista Argentina de Microbiología*, 26:157-170. 1994.
- (3) Bade GM, Vecchioli GI, Del Panno MT, Paineira MT. Conservación de bacterias degradadoras de hidrocarburos. *Revista Argentina de Microbiología*, 26:116-123. 1994.
- (4) American Public Health Association. *Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater*, APHA, 18th. ed., New York, 1992.
- (5) Bushnell LD, Hass HF. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *J. Bacteriol.* 41:653-673, 1941.