

BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS DE PETROLEO Y COMPUESTOS RELACIONADOS

Lopolito María F.¹, Molina Tirado Liliana B.¹, Corbella María E.¹, Kabbas Soraya², García Elisa¹, Lanfranchi Deborah², Carlos E.^{1*} Gómez, Higa Luis E.^{1*}

- ¹ Instituto Nacional de Ciencia y Técnica Hídricas - Centro de Tecnología del Uso del Agua y el Ambiente, Casilla de Correo N°7 - (1802) Aeropuerto Internacional de Ezeiza - Buenos Aires - Argentina
² Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Buenos Aires, Medrano 951 - (1179) Buenos Aires - Argentina

Con la finalidad de degradar hidrocarburos se llevaron a cabo ensayos de biodegradación empleando diferentes sustratos orgánicos (crudo de petróleo, kerosene, aceite lubricante y benceno). Se ensayaron tres inóculos diferentes desarrollados a partir de una muestra de agua superficial con alto grado de contaminación, y reactores "batch" alimentados con crudo de petróleo y aceite lubricante para automotores. Como nutrientes se utilizaron medio mínimo salino (MM) y fertilizante foliar comercial. Los ensayos se realizaron en erlenmeyers de 1000 ml, con agitación continua y en condiciones de esterilidad, de manera tal que sólo pudieran desarrollarse aquellos microorganismos con capacidad de utilizar los hidrocarburos como única fuente de carbono y energía. La biodegradación fue evaluada a través de la estimación de la biomasa microbiana (recuento de bacterias viables en placa y consumo de oxígeno) y la concentración de hidrocarburos totales en la fase disuelta (DQO y lectura infrarrojo). Proteínas totales e hidratos de carbono se determinaron con el fin de observar la posible liberación de biosurfactantes.

Palabras clave: Biodegradación de hidrocarburos.

INTRODUCCIÓN

La firme demanda de energía en el mundo moderno ha determinado el uso intensivo del petróleo, y sus derivados, como fuente de energía. Muchos de sus componentes son empleados como materias primas básicas en las industrias químicas y petroquímicas. Este aumento en la explotación del petróleo ha determinado la aparición de crecientes fuentes de contaminación. Por ejemplo: derrames accidentales desde buques petroleros, extracción y el procesamiento del petróleo y sus derivados, etc.

La importancia de la contaminación producida por estos compuestos está determinada por sus características mutagénicas, carcinogénicas y tóxicas. Además, su propiedad de escasa solubilidad dificulta aún más la biodegradación natural.

El objetivo de este trabajo es encontrar herramientas que permitan aumentar la velocidad de biodegradación de este tipo de compuestos, por ejemplo, a partir de la generación de biomasa aclimatada a sustratos relacionados relativamente fáciles de biodegradar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medio Mínimo (MM)

El medio mineral mínimo (Foght *et al.*, 1989) empleado en los ensayos se compone de 0,5 g de K_2HPO_4 , 1,0 g de NH_4Cl , 2,0 g de Na_2SO_4 , 2,0 g de KNO_3 , 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y trazas de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ por litro de agua bidestilada. Este medio, suplementado con 1 g de extracto de levaduras y 2 g de proteasa peptona fue empleado en la preparación inicial de los inóculos. Se emplearon reactivos de calidad analítica.

Fertilizante foliar

Se empleó el fertilizante Basf Nitrofoska Foliar A de grado 10-2-6 (N-P-K), libre de cloruros, como fuente alternativa de nutrientes.

Inóculo de microorganismos

Se ensayaron tres inóculos diferentes:

- I-1 Microorganismos desarrollados a partir de una muestra de agua superficial de un cuerpo con alto grado de contaminación (Riachuelo, Buenos Aires) y medio mínimo salino.
- I-2 Microorganismos desarrollados a partir de un reactor "batch" alimentado con crudo de petróleo y fertilizante foliar comercial.
- I-3 Microorganismos aclimatados en un reactor batch" alimentado con aceite lubricante para automotores y fertilizante foliar comercial.

Sustratos

Los sustratos orgánicos utilizados en los ensayos incluyeron : Crudo de Petróleo (C), Aceite lubricante de automotores (A), Kerosene (K) y Benceno (B).

Técnicas Analíticas

La estimación de biomasa microbiana se realizó por recuento de bacterias aerobias en placa (APHA *et al.*, 1992) técnica 9215 A, modificado mediante el agregado de Tween 80 al 0,01% en solución fisiológica, sembrando 0,1 ml de muestra en superficie. La biomasa se expresa UFC/ml (unidades formadoras de colonia/ml). El consumo de oxígeno se midió con un equipo YSI mod.57 con registro continuo. La Demanda Química de Oxígeno (DQO) se realizó según técnica 5220 C (APHA *et al.*, 1992). Los hidrocarburos totales se determinaron por lectura infrarroja (Horiba OCMA-220), realizándose la extracción con tetracloruro de carbono. Las curvas de calibración fueron realizadas empleando los mismos sustratos. La producción de biosurfactantes fue medida empleando el método de la Antrona (Scott y Melvin, 1953) para la dosificación de los hidratos de carbono totales y por el método de Lowry modificado (Lowry *et al.*, 1951) para la estimación de las proteínas totales.

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

Los ensayos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y condiciones de esterilidad en erlenmeyers de 1000 ml de capacidad con agitación continua y conteniendo entre 200 y 400 ml de medio mínimo, 1% de sustrato y 2% de inóculo de microorganismos (vol/vol). Previa iniciación de los ensayos, los inóculos fueron transferidos a medio mínimo enriquecido con extracto de levaduras y peptona durante 48 hs para favorecer el desarrollo de los microorganismos presentes. Posteriormente, se realizó un repique a medio mínimo no enriquecido durante otras 48 hs a fin de eliminar las fuentes de carbono residuales. Se realizaron en forma paralela ensayos con y sin adición de inóculos para cada sustrato. En la primera etapa se trabajó con crudo de petróleo e inóculo I-1 y luego se ensayaron sustratos más livianos como aceite lubricante y kerosene adicionando inóculo I-2. Si bien, los distintos sustratos presentaron diferentes grado de emulsificación a lo largo de los ensayos, la toma de muestra

se realizó de la fracción soluble utilizando pipetas graduadas. Las muestras fueron filtradas (filtro de nitrato de celulosa de 0,45 μm de diámetro de poro) para la determinación de hidrocarburos totales, DQO y surfactantes. La frecuencia de toma de muestras fue de dos veces por semana, tomando como tiempo inicial el correspondiente a 4 horas de agitación en "shaker". La duración promedio de las experiencias fue de aproximadamente 30 días.

Finalmente, se efectuaron ensayos respirométricos a temperatura constante (20 °C) empleando como inóculo I-3 y 0,33 μl de benceno/ml. El mismo, fue previamente filtrado a través de papel de filtro Whatman 42, para disminuir la concentración de aceite lubricante, y luego diluido en MM y aireado durante 72 hs para minimizar el contenido de aceite en la fase líquida y de materiales de reserva dentro de las células.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- El énfasis de los ensayos descritos aquí ha sido poner a punto y estandarizar metodologías para evaluar el comportamiento de estos sistemas, cuya complejidad está dada por la coexistencia de varias fases.
- Los gráficos 1 a 4 son representativos de varios ensayos realizados en condiciones variables (temperatura, densidad de inóculo y volumen de medio nutritivo).
- Los ensayos realizados permiten afirmar que los microorganismos capaces de degradar estos compuestos estarían presentes en el mismo sustrato. Pero en cantidades mínimas, por lo que el proceso de degradación comenzaría en el caso del aceite dos o tres semanas después de iniciado el ensayo, y en el kerosene una semana después.
- Por otro lado, los resultados obtenidos indicarían que la inoculación previa aceleraría el proceso de biodegradación, tanto para el aceite como para el kerosene.
- En los sistemas inoculados, el "plateau" correspondiente a la biomasa se alcanza más rápidamente y la concentración de microorganismos, medidos como UFC/ml, es de dos a tres órdenes de magnitud mayor que en los sistemas sin inocular.
- La modificación introducida en la técnica de recuento de bacterias viables en placa por el agregado de Tween 80, favoreció la dispersión de las colonias en las placas, lo que permitió eliminar fuentes de error en los recuentos.
- Se observó que la concentración de hidrocarburos totales en la fase acuosa aumenta con el tiempo de incubación. Esto ocurriría por la liberación a la fase acuosa de surfactantes generados por los microorganismos presentes en el sistema.
- Estos biosurfactantes no serían de naturaleza protéica, dado que se obtuvieron resultados negativos aplicando el método de Lowry.
- La presencia de hidratos de carbono, medidos a través de la técnica de Antrona, indicaría la posibilidad de que estos compuestos sean los responsables del aumento de la solubilidad de los hidrocarburos en la fase líquida.
- Los primeros resultados de los ensayos respirométricos empleando el inóculo I-3, indicarían que el agregado de estos microorganismos permitirían aumentar la velocidad de degradación del benceno.

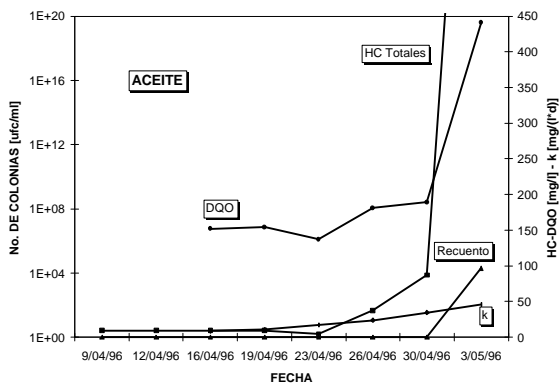


Gráfico 1

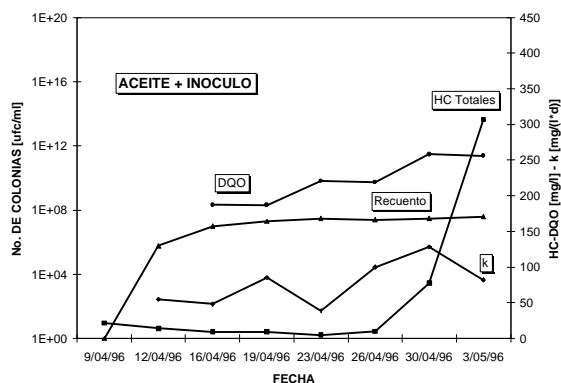


Gráfico 2

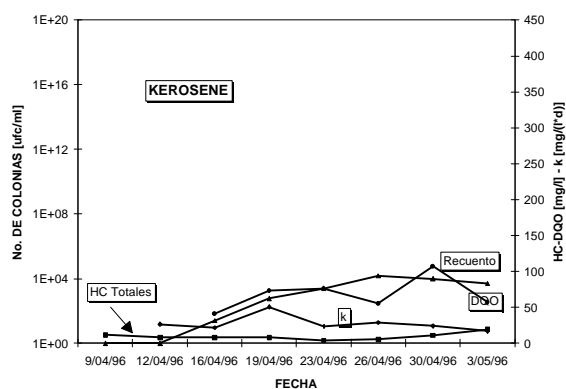


Gráfico 3

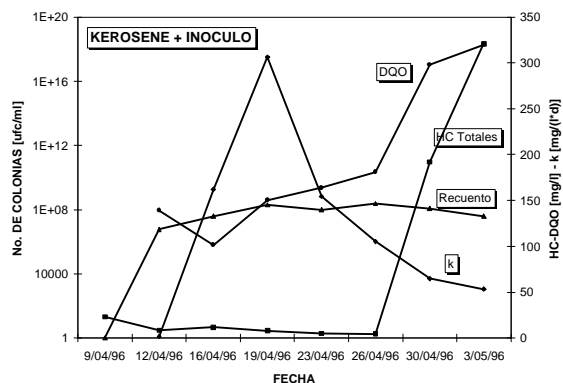


Gráfico 4

REFERENCIAS

APHA, AWWA y WEF (1992). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18TH Edition, American Public Health Association, Washington.

Foght J.M., Gutnick D.L. y Westlake D.W.S. (1989). Effect of emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures. *Applied and Environmental Microbiology* **Vol.5**, N°1, 36-42.

Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Lewis Farr A. y Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry* 265-275.

Scott T.A. Jr., Melvin E.H. (1953). Determination of dextran with anthrone. *Analytical Chemistry* **Vol.25**, N°11, 1656-1661.