

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE CRUDO EN LA BIORREMEDIACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO

Alexmar CÓRDOVA¹, Carmen INFANTE², Liliana LÓPEZ¹ & Patricia LUGO¹

¹Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Instituto de Ciencias de la Tierra, Caracas. Correo-e.: alexmar.cg@gmail.com. ²Universidad Simón Bolívar, Departamento de Procesos y Sistemas, Caracas.

RESUMEN

Se estudió el efecto de la concentración inicial de crudo mediano en la biorremediación de un suelo arenoso contaminado. Fueron preparados dos tratamientos, A y B, con concentraciones de crudo de 5% y 9%, respectivamente. Se llevó a cabo la extracción del crudo presente en el suelo a los 1, 30 y 90 días del avance del experimento de biorremediación, usando como solventes de extracción n-hexano y diclorometano. Los extractos de crudo fueron separados y cuantificados en sus fracciones constituyentes (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos) y se realizó el análisis de biomarcadores de los hidrocarburos saturados. Los resultados obtenidos indican que el proceso de biodegradación es más eficiente para el tratamiento A con respecto al B, teniendo que para el suelo con carga inicial de crudo de 5% puede establecerse el siguiente orden relativo de biodegradación: n-alcános > isoprenoides > diasteranos ~ esteranos C₂₇ > terpano C₂₃₋₃; mientras que para el suelo con concentración inicial de crudo de 9%, el proceso de biodegradación afectó principalmente a n-alcános e isoprenoides. Adicionalmente, se observó que el solvente de extracción influye en la cantidad de crudo extraído, sin embargo no ejerce ningún efecto sobre las distribuciones de los biomarcadores.

Palabras clave: biodegradación, biomarcadores, fracciones constituyentes.

ABSTRACT

The effect of the initial crude oil concentration in the bioremediation of a contaminated sandy soil was studied. Treatments were prepared with oil concentrations of 5% (A) and 9% (B) and it was performed Soxhlet extraction of oil present in each treatment at 1, 30 and 90 days of progress of the bioremediation experiment, using dichloromethane and n-hexane as solvents. The oil extracts were separated into its constituents fractions (saturated, aromatics, resins and asphaltenes) and it was performed the analysis of biomarkers of the saturated hydrocarbons fraction. Results show that the biodegradation process is more efficient for treatment A, relate to B, obtaining a relative biodegradation order: n-alkanes > isoprenoids > diasteranes ~ steranes C₂₇ > terpane C₂₃₋₃, for the soil with 5% of initial oil; while in the soil with 9% of initial

oil the biodegradation affected mainly, n-alkanes and isoprenoids. Further, it was observed that the extraction solvent influences the amount of oil extracted, however has no effect on the biomarkers distribution.

Keywords: biodegradation, biomarkers, constituents fractions.

INTRODUCCIÓN

Venezuela se caracteriza por su gran abundancia en recursos hidrocarburos, lo cual la ha llevado a desarrollar la industria petrolera como su principal generadora de ingresos económicos. Sin embargo, las actividades que están envueltas en la exploración y producción del petróleo producen impactos potencialmente negativos sobre los ecosistemas, afectando en forma directa el suelo, el agua, el aire, la fauna, la flora y al hombre. Con la finalidad de proteger el ambiente y preservar los ecosistemas, el hombre ha desarrollado técnicas como la biorremediación, la cual se basa en el uso del proceso de biodegradación (ALEXANDER, 1999) para transformar los componentes tóxicos de los desechos orgánicos, como son las fracciones de hidrocarburos saturados y aromáticos, en productos inocuos para el medio ambiente y la salud humana, tales como CO₂, H₂O y biomasa microbiana (INFANTE, 2005).

Los hidrocarburos pueden llegar al suelo como consecuencia de eventuales derrames de crudo, en caso de accidentes, y por la disposición temporal de los desechos sólidos generados en las actividades de exploración y perforación, en sitios denominados fosas (INFANTE, 2005). Los suelos, frecuentemente, contienen microorganismos capaces de degradar los compuestos orgánicos formados en la naturaleza y para los hidrocarburos existen una cantidad considerable de hongos y bacterias con capacidad degradadora (ALEXANDER, 1999). La biodegradación depende de factores como el tipo de suelo, disponibilidad de nutrientes y oxígeno, y tipo y concentración de hidrocarburos; sin embargo, considerando que la mayoría de los procesos naturales de biodegradación pueden proceder lentamente, se aplican las técnicas de biorremediación, que permiten incrementar la velocidad del proceso de degradación biológica.

La concentración inicial de crudo influye en la remoción de los contaminantes orgánicos del medio.

Varios estudios han documentado la tasa inicial de carga de hidrocarburos de crudo en el suelo y su grado de biodegradación, tal es el caso de una revisión preparada para American Petroleum Institute (API), en 1983, sobre las prácticas de tratamiento de tierras, la cual indica que del 70 al 90% de los hidrocarburos que se aplicaron a la superficie de los suelos a tasas de carga de 1 a 5% fueron removidos, principalmente a través de biodegradación. Algunos autores sugieren que concentraciones de crudo en suelo por encima del 4% pueden causar efectos tóxicos a los microorganismos, disminuyendo la velocidad del proceso de biodegradación (TRINDADE *et al.*, 2005), sin embargo, se han obtenido resultados satisfactorios a partir de ensayos con concentraciones iniciales entre 5 y 10% (INFANTE, 2005).

Algunas herramientas útiles en el monitoreo de la evolución de la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos son: la separación de las distintas fracciones del crudo (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos), con la posterior determinación de la variación en peso de cada una de ellas y el análisis de los biomarcadores. Los biomarcadores son compuestos orgánicos complejos reconocibles dentro de las fracciones de hidrocarburos saturados y aromáticos, cuyo esqueleto de carbono está formado por organismos vivos y es suficientemente estable para ser identificado y asociado con su precursor biológico (HUNT, 1995). En función de su resistencia a la degradación, los biomarcadores son de gran utilidad en el estudio de la biodegradación del crudo.

Considerando la importancia de la biorremediación como tecnología de saneamiento ambiental en un país petrolero como Venezuela, es necesario realizar estudios que permitan determinar la influencia de la concentración de hidrocarburos en la biorremediación de suelos característicos venezolanos. Por ello, el objetivo principal de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la concentración inicial de crudo en la biorremediación de un suelo arenoso contaminado con un crudo mediano. Para tal fin se establecieron los siguientes objetivos específicos:

Simular en el laboratorio el proceso de contaminación del suelo con concentraciones de 5% y 9% (m/m) de crudo y su posterior biorremediación mediante la estimulación de los microorganismos presentes en el suelo.

Determinar las tasas de biodegradación para cada tratamiento (cambio en el contenido de crudo respecto al contenido inicial) a $t=30$ días y $t_f=90$ días

Evaluar el efecto de la concentración inicial de crudo sobre el proceso de biodegradación del mismo, a través de las variaciones en su composición SARA y en la distribución de los biomarcadores de la fracción de hidrocarburos saturados (a $t_0=1$ día, $t=30$ días y $t_f=90$ días).

MÉTODOS

El suelo empleado en el estudio corresponde a un suelo de textura arenosa, proveniente de la localidad de El Tigre en el estado Anzoátegui, el cual ha sido usado en otros estudios de biodegradación (GARCÍA, 2008). Se trata de un suelo con bajo contenido de materia orgánica, característico de los suelos del oriente venezolano.

El suelo se tamizó haciéndolo pasar por una malla N° 10, con la finalidad de obtener las partículas menores a 2 mm. Se adicionó el crudo Guafita 10X en concentraciones equivalentes a 5% (m/m) para el tratamiento A (3 réplicas) y 9% (m/m) para el tratamiento B (3 réplicas) para obtener un total de 6 composteros. Luego de homogeneizar, a la mezcla se le añadió el agente estructurante en una concentración de 13% (m/m), el cual estuvo constituido por hojas secas finamente cortadas en trozos de 1 a 2 mm. Se añadieron fertilizantes satisfaciendo las relaciones C/N= 60 y C/P= 800. Cada compostero fue removido con una frecuencia interdiaria y se agregó agua para mantener un nivel de oxígeno adecuado y ajustar el valor de humedad.

El crudo empleado (Guafita 10X) es proveniente del Campo Guafita, estado Apure, Venezuela. Se trata de un crudo mediano (gravedad específica de 27,3 °API) con una composición de 54% de saturados, 25% de aromáticos, 11% de resinas y 10% de asfaltenos. Sobre la base del tipo de hidrocarburos constituyentes puede clasificarse como un crudo parafinico-nafténico (LÓPEZ *et al.*, 1998).

El ensayo tuvo una duración de 90 días. Se realizó un muestreo de cada compostero a los días 1, 30 y 90 de iniciado el proceso de biorremediación, con la finalidad de evaluar la tasa de biodegradación (cambio en el contenido de crudo respecto al contenido inicial). En cada muestreo se tomó una alícuota de suelo de cada bandeja, se realizó la extracción del crudo presente empleando el método de extracción soxhlet y usando como solventes n-hexano y diclorometano y se determinó el contenido de crudo por gravimetría. Los extractos de crudo fueron separados y cuantificados en sus fracciones constituyentes: los asfaltenos fueron precipitados con n-heptano y se empleó la técnica de cromatografía de adsorción en columna (usando alúmina como fase estacionaria) para la separación de los maltenos en hidrocarburos saturados (eluidos con n-hexano), aromáticos (eluidos con tolueno) y resinas (eluidas con una mezcla tolueno:metanol 70:30). Para realizar esta separación se seleccionó una réplica constante y al azar de cada tratamiento.

Posteriormente, se realizó el análisis de los biomarcadores presentes en la fracción de hidrocarburos saturados. La distribución de n-alcanos se obtuvo haciendo uso de la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización a la llama (FID). Mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a

espectrometría de masas (CG-EM) se obtuvieron los fragmentogramas m/z 191 (terpanos), m/z 217 y m/z 218 (esteranos). El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases Agilent Technologies, modelo 6890N Network DCSysstem, acoplado un espectrómetro de masas MS Agilent 5973 Network Mass Selective Detector.

Los tratamientos fueron comparados a través de la prueba de hipótesis “t” de Student utilizando el paquete estadístico STATISTICA 6.0.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Las tasas de biodegradación de crudo se muestran en la tabla 1. Para el día 90 y para un mismo tratamiento, las tasas de biodegradación obtenidas con ambos solventes son estadísticamente iguales. Al comparar entre tratamientos, la tasa de biodegradación para A es mayor que para B, lo cual evidencia que existe una tendencia hacia la disminución en las tasas de biodegradación asociada con el aumento de la concentración inicial de crudo. Este hecho sugiere que mientras mayor es la carga inicial de crudo, se hace menos eficiente el proceso de biodegradación. Esta diferencia no se aprecia a los 30 días.

Tabla 1. Tasas de biodegradación del crudo (%)

Grupo	30 días	90 días
A_DCM	25 a	49 a
A_hexano	24 a	52 a
B_DCM	26 a	46 b
B_hexano	24 a	46 b

Medias en un mismo tiempo seguidas por la misma letra no son estadísticamente diferentes según la prueba “t” de Student ($P \leq 0,05$). DCM = diclorometano.

Los resultados obtenidos en el estudio para el suelo contaminado con 5% de crudo, posiblemente reflejan una mejor distribución del crudo en la fase sólida del suelo, permitiendo el contacto directo de los microorganismos con el hidrocarburo. La menor biodegradación en el suelo contaminado con mayor concentración de crudo puede ser consecuencia de una difusión parcial en la fase sólida del suelo, resultando en un menor contacto crudo-microorganismos (DEL'ARCO & FRANÇA, 2001), o de una mayor toxicidad para los microorganismos degradadores.

Considerando que la extracción de crudo se llevó a cabo empleando dos solventes, se realizó la correlación de los valores obtenidos con ambos solventes (Fig. 1) y se obtuvo que para el tratamiento A la extracción con n-hexano es aproximadamente 87% de la obtenida con diclorometano, valor que se corresponde con el reportado por MORALES (2009) de 85%; mientras que para el suelo del tratamiento B, la extracción con n-hexano es aproximadamente 96% de la lograda con

diclorometano. Esto sugiere que para crudos medianos, a concentraciones cercanas al 5%, la eficiencia de extracción con diclorometano es superior que con n-hexano, mientras que, para concentraciones mayores (cercanas a 9%), ambos solventes poseen eficiencias de extracción similares.

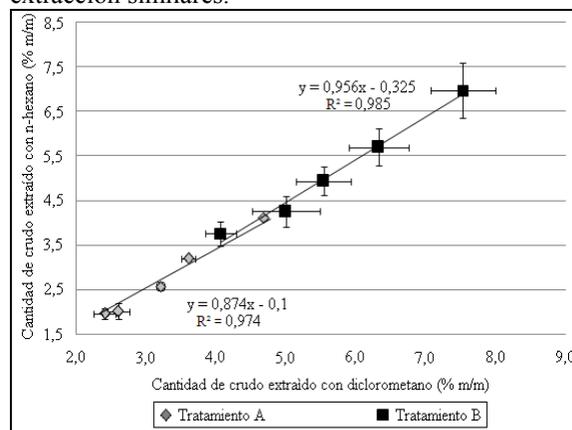


Fig. 1. Correlación entre las masas de crudo extraídas con cada solvente. Las barras representan la desviación estándar de los datos.

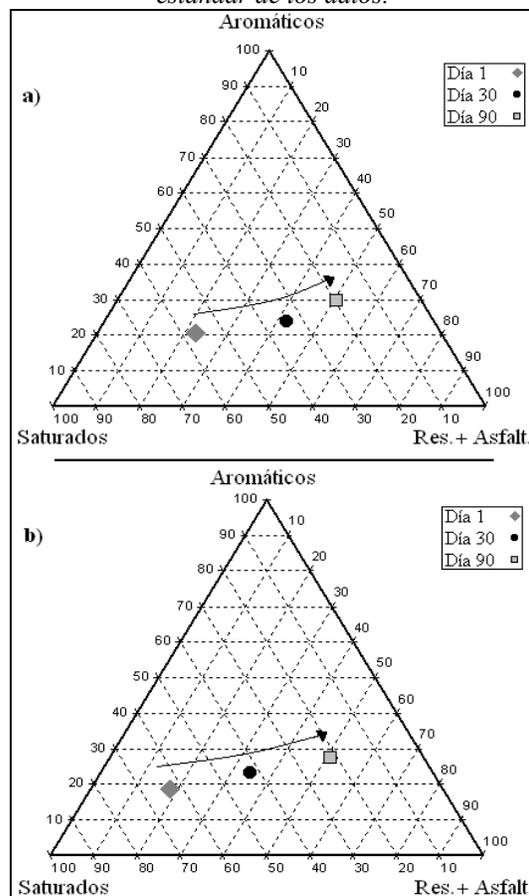


Fig. 2. Diagrama ternario de la composición SARA para: (a) tratamiento A y (b) tratamiento B.

En la figura 2 se observa la variación en la distribución SARA para cada tratamiento. Se evidencia una disminución de la fracción de hidrocarburos saturados, los cuales son más susceptibles a la biodegradación, con el consecuente aumento relativo del resto de las fracciones (aromáticos, resinas y asfaltenos).

En las figuras 3 y 4 se presentan las distribuciones de n-alcamos, a los distintos tiempos de análisis, para los tratamientos A y B, respectivamente. Al comparar los cromatogramas del grupo A con los del grupo B, se observa que para el día 30 ha ocurrido degradación a nivel de n-alcamos en ambos grupos. A nivel de isoprenoides, entre los días 1 y 30, en el grupo A se evidencia una disminución de la señal de pristano respecto a la de fitano; mientras para el grupo B, la relación entre ambas señales se mantiene prácticamente invariable.

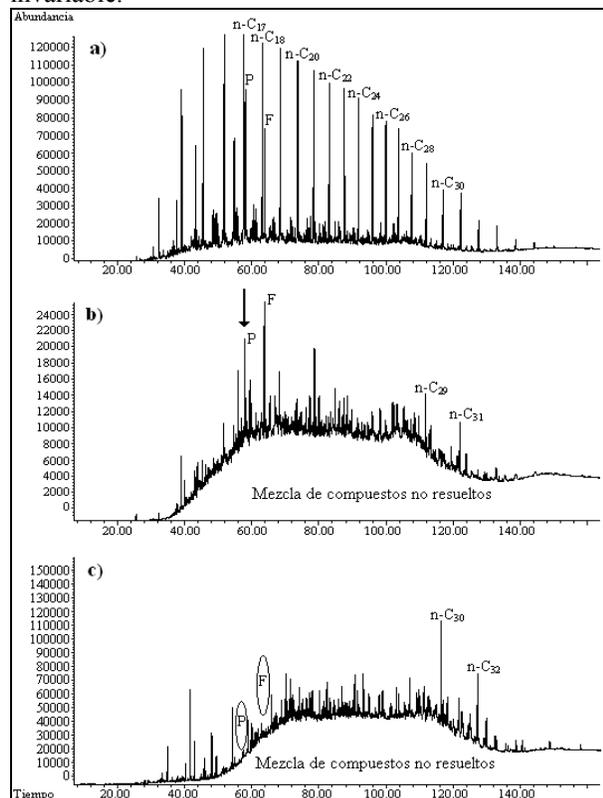


Fig. 3. CG-FID para el tratamiento A a los días: (a) 1, (b) 30 y (c) 90. P=pristano, F=fitano.

La degradación preferencial de pristano sobre fitano se debe a que la susceptibilidad a la biodegradación, en los isoprenoides, decrece con el aumento del número de carbonos (PETERS *et al.*, 2005). A los 90 días de experimentación, tanto pristano como fitano han sido completamente removidos en ambos tratamientos.

La supresión de los isoprenoides y n-alcamos de menor masa molecular permite observar en los cromatogramas del día 90 la presencia de señales de n-alcamos mayores

a n-C₃₀, las cuales se encontraban enmascaradas en los cromatogramas del día 30 al ser las intensidades de estas señales menores a las de los isoprenoides. La preservación de estos n-alcamos es debida a que su biodegradación es difícil por la dificultad de los microorganismos para transportarlos a través de sus membranas celulares (PETERS *et al.*, 2005).

A partir del día 30, se observa un levantamiento de la línea base que se hace más prominente con el avance del tiempo. La aparición de este levantamiento, denominado mezcla de compuestos no resueltos (UCM, por sus siglas en inglés), indica una disminución de los compuestos resueltos, como resultado de la degradación microbiana, y consiste de compuestos biorresistentes tales como saturados cíclicos, aromáticos, naftenoaromáticos y compuestos polares que no pueden ser separados mediante la técnica de cromatografía (PETERS *et al.*, 2005).

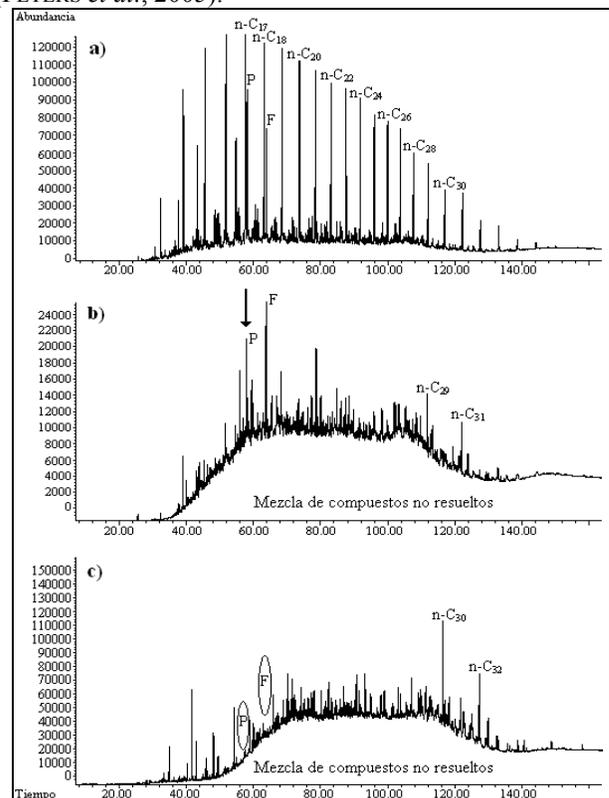


Fig. 4. CG-FID para el tratamiento B a los días: (a) 1, (b) 30 y (c) 90. P=pristano, F=fitano

En las figuras 5 y 6 se muestran los fragmentogramas de terpanos (m/z 191) y esteranos (m/z 218) para el tratamiento A. En la figura 5, se observa que durante los primeros 30 días las señales no varían; sin embargo, para el día 90 ha ocurrido una ligera disminución en la señal del compuesto C₂₃₋₃, indicando una degradación incipiente del mismo mientras que los hopanos permanecen inalterados. Comúnmente, los terpanos tricíclicos (C₂₃₋₃) son altamente resistentes a la

biodegradación, subsistiendo aún cuando los hopanos (C_{30}) han sido removidos; a pesar de esto, en algunos crudos venezolanos se ha encontrado que los terpanos tricíclicos parecen ser alterados simultáneamente con los hopanos, aunque a una tasa de degradación más lenta (ALBERDI *et al.*, 2001).

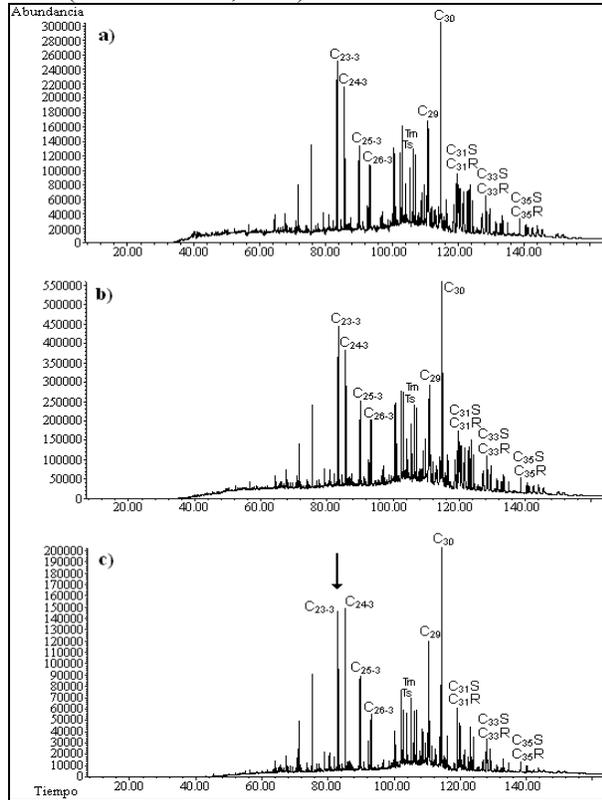


Fig. 5. CG-EM ($m/z = 191$) para el tratamiento A, a los días: (a) 1, (b) 30 y (c) 90.

Pueden presentarse excepciones, ocurriendo remoción de los terpanos tricíclicos antes de los hopanos, siendo las tasas de degradación de estos compuestos dependientes de los procesos microbianos específicos, de las poblaciones de microorganismos y de las condiciones del ambiente (MOLDOWAN *et al.*, 1995). Para el grupo B, las señales permanecieron constantes.

En la figura 6 se observa una disminución progresiva de las señales que aparecen a un tiempo de retención entre 44 y 56 minutos, las cuales desaparecen completamente a los 90 días de experimentación. A los 30 días, tanto los esteranos como los diasteranos permanecen inalterados, sin embargo, al día 90 se observa una disminución marcada de las señales de los diasteranos C_{27} y C_{28} y de los esteranos C_{27} .

No puede precisarse el orden de biodegradación entre esteranos y diasteranos debido a que a los 30 días no había iniciado la biodegradación y a los 90 días ya ambos habían comenzado a biodegradarse. Sin embargo, MOLDOWAN *et al.* (1995) sugieren un orden relativo de biodegradación, para el monitoreo del

proceso de la biorremediación de desechos de refinerías, donde los diasteranos son atacados primero que los esteranos. Por su parte, en el suelo contaminado con 9% de crudo no ocurre biodegradación apreciable a nivel de diasteranos y esteranos en el mismo período de tiempo, lo cual sugiere que para crudos medianos a concentraciones cercanas a 9%, es posible que se inhiba la actividad microbiana, ocasionando que el proceso de biodegradación sea más lento, en comparación con suelos con menor carga inicial de crudo.

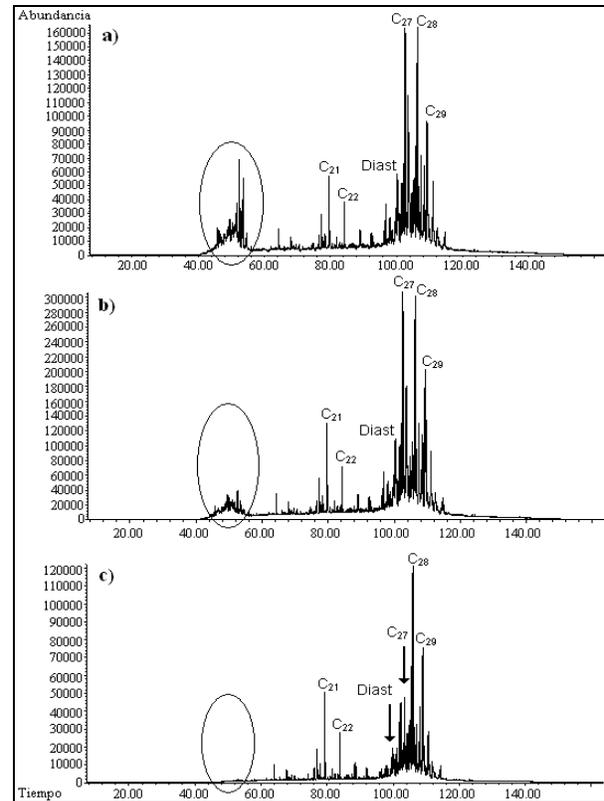


Fig. 6. CG-EM ($m/z = 218$) para el tratamiento A, a los días: (a) 1, (b) 30 y (c) 90.

Para el suelo del tratamiento A, donde el proceso de biodegradación fue más eficiente, puede establecerse un orden relativo de biodegradación de n-alcenos > isoprenoides > diasteranos ~ esteranos C_{27} > terpano C_{23-3} ; mientras que para el suelo del tratamiento B, el proceso de biodegradación solo afectó a los n-alcenos e isoprenoides, con una degradación incipiente de los esteranos C_{27} . El orden de biodegradación obtenido corresponde con el propuesto por MOLDOWAN *et al.* (1995). Es necesario señalar que no se observaron diferencias en las distribuciones obtenidas con diclorometano y n-hexano, lo cual indica que el solvente de extracción no ejerce ningún efecto sobre la distribución de biomarcadores.

CONCLUSIONES

Existe una disminución en las tasas de biodegradación, asociadas con el aumento de la concentración inicial de crudo. La biodegradación ocurrió más rápidamente en el suelo contaminado con 5% de crudo que en aquel contaminado con 9%. Durante el período de tiempo estudiado, para el suelo con carga inicial de crudo de 5% puede establecerse un orden relativo de biodegradación de n-alcános > isoprenoides > diasteranos ~ esteranos C_{27} > terpano C_{23-3} ; mientras que para el suelo con concentración de crudo de 9%, fueron alterados los n-alcános, isoprenoides y esteranos C_{27} .

AGRADECIMIENTOS

CDCH-UCV. Proyecto PI-03-00-7178-2008

REFERENCIAS

- ALBERDI M., J.M. MOLDOWAN, K.E. PETERS & J.E. DAHL. 2001. Stereoselective biodegradation of tricyclic terpanes in heavy oils from the Bolivar Coastal Fields, Venezuela. *Organic Geochemistry* 32:181-191.
- AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE (API). 1983. *Land Treatment Practice in the Petroleum Industry*. Washington: Environmental Research & Technology Inc., 148 p.
- ALEXANDER M. 1999. *Biodegradation and Bioremediation*. San Diego: Academic Press, 453 p.
- DEL'ARCO J.P. & F.P. DE FRANÇA. 2001. Influence of oil contamination levels on hydrocarbons biodegradation in sandy sediments. *Environmental Pollution* 110:515-519.
- GARCÍA M. 2008. *Estudio de la biodegradación del crudo Guafita IX en dos suelos de diferente textura y composición mineralógica*. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Trabajo Especial de Grado para optar al título de Licenciado en Geoquímica, inédita, 81 p.
- HUNT J.M. 1995. *Petroleum Geochemistry and Geology*. New York: W. H. Freeman and Company, 612 p.
- INFANTE C. 2005. Contaminación de suelos y recuperación ecológica de Venezuela. *Acta Biológica Venezuelica* 25:43-49.
- LÓPEZ L., S. LO MÓNACO & M. RICHARDSON. 1998. Use of molecular parameters and trace elements in oil-oil correlation Studies, Barinas sub basin, Venezuela. *Organic Geochemistry* 29:613-629.
- MOLDOWAN J.M., J. DAHL, M.A. MCCAFFREY, W.J. SMITH & J.C. FETZER. 1995. Application of biological marker technology to bioremediation of refinery by-products. *Energy & Fuels* 9:155-162.
- MORALES F. 2009. *Uso de análisis de riesgos para la evaluación de opciones de tratamiento de desechos petrolizados y suelos contaminados con hidrocarburos*. Universidad Simón Bolívar, División de Ciencias Biológicas, Departamento de Estudios Ambientales. Trabajo de Ascenso a la Categoría de Agregado, 328 p.
- PETERS K.E., C.C. WALTERS & J.M. MOLDOWAN. 2005. *The Biomarker Guide*. Cambridge: Cambridge University Press, 1155 p.
- TRINDADE P.V.O., L.G. SOBRAL, A.C.L. RIZZO, S.G.F. LEITE & A.U. SORIANO. 2005. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere* 58:515-522.