
EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE UN INÓCULO ENZIMÁTICO COMO ACELERADOR DEL PROCESO DE LANDFARM EN BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON DIÉSEL Y BUNKER, A ESCALA PILOTO. PARROQUIA EL REVENTADOR, PROVINCIA DE SUCUMBIOS.

Edison Patricio Marcillo Tipán.

Estudiante de la carrera de Ing. En Biotecnología, Universidad de las Fuerzas Armadas. Abril, 2014

Resumen

Los avances tecnológicos en el desarrollo de enzimas capaces de degradar muchos compuestos ha llevado a que se creen consorcios específicos para la degradación de distintos tipos de hidrocarburos ligadas a las condiciones de la parroquia el Reventador, además de establecer las condiciones apropiadas para que las enzimas tengan mayor grado de remoción de hidrocarburos. Se utilizaron diferentes tipos de concentraciones de enzima, volumen de hidrocarburo en el suelo. Para determinar la tasa de remoción de hidrocarburo en el suelo, se elaboraron curvas de cinética mediante las concentraciones iniciales y finales en función del tiempo. Los resultados de los análisis realizados muestran que las enzimas a una concentración de 20 ml de enzima trabajaron mejor para diésel y 40 ml de enzima para remoción de bunker, y que al ser utilizadas en hidrocarburo liviano como en diésel tiene mejores resultados, la eficiencia en la remoción de hidrocarburos pesados como el bunker si bien tuvo resultados favorables este no tuvo la capacidad de llegar a los límites permisibles en el tiempo previsto.

Introducción

La degradación por acción de enzimática, tiene como principio agregar enzimas al lugar y/o sitio contaminado con la finalidad de degradar las sustancias nocivas o degradar los compuestos de hidrocarburos. Estas enzimas se obtienen de microorganismos especialmente diseñados para así obtener grandes cantidades y de alta especificidad y que son comercializadas por las empresas biotecnológicas.

La presente investigación estará enfocada a optimizar la técnica de biorremediación Landfarm, si bien es un

proceso ya descrito lo que se desea realizar es una investigación que estandarice un procedimiento a condiciones de prueba piloto, llevando los conocimientos generados en laboratorio a condiciones reales de clima, pH, temperatura, humedad, geomorfología del suelo, cantidad de luz natural, consorcios bacterianos autóctonos (Araujo, 2004), con lo cual se pueda obtener resultados que repercutan en mejores técnicas de biorremediación, además esto ayudara al ambiente.

Además, los compuestos derivados del petróleo son compuestos nocivos para los seres humanos, son una amenaza tanto

para la vida acuática como para la terrestre, pues su acumulación en diversos ambientes impide un normal desarrollo de organismos que viven en estos medios, causando alteraciones en el ecosistema (Annachhatre & Gheewala, 1996).

Existen varias técnicas que han sido usadas para remover Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH) de suelos contaminados, entre ellos físicos, químicos y biológicos. Los procesos biológicos, como es la biodegradación, han recibido mayor atención debido a que son amigables con el ambiente (Agarry & Solomon, 2008).

Marco teórico

Suelo

El término suelo se refiere al material suelto de la superficie de la tierra, formado por una agregación de minerales no consolidados, agua, aire, materia orgánica, inorgánica y organismos vivos. La fase mineral supone más del 50% de volumen total del suelo, conformada en su mayoría por SiO₂, Al y Fe y en menor cuantía al Ca, Mg, K, Ti, Mn, Na, N, P y S. El agua y aire conjuntamente constituyen el volumen de poros que varía entre un 25 y 50%. (Eweis, 1999).

Características físico-químicas y microbiológicas

Densidad

Se puede referir al material sólido que compone el suelo y entonces se habla de densidad real, o a la densidad calculada considerando el espacio total ocupado por los componentes sólidos más el espacio poroso y se denomina densidad aparente. La densidad de los suelos superficiales son sustancialmente diferentes, oscilan entre 1,00 a 1,60 g/ml; mientras que la densidad

real de los sólidos en los suelos minerales oscila entre 2,60 y 2,70 g/ml (Buckman, 1985).

La cantidad de materia orgánica en un suelo afecta a la densidad, al pesar mucho menos que un volumen igual de sólidos de minerales (Buckman, 1985).

Porosidad

La porosidad de los suelos habitualmente se determina de forma indirecta a partir del valor de la densidad aparente; en laboratorio se puede medir de forma directa utilizando un porómetro (FAO, 1997).

La densidad real normalmente se considera estándar para todos los suelos, y se le asigna un valor medio de 2,65 g/cm³ (FAO, 1997).

El espacio poroso de un suelo está ocupado por aire y agua. Para la mayor parte de los suelos, la porosidad varía entre 25 y 50%, sin embargo en los suelos varía considerablemente debido a los cambios resultantes de procesos como la expansión, contracción, dispersión, compactación y fisura. Los suelos compactados presentan una porosidad baja (Buckman, 1985) (Eweis, 1999).

Humedad

En general al agua del suelo se la ha clasificado en tres tipos: la gravitacional es la que se desplaza en sentido descendente bajo la influencia de la gravedad, está disponible para microorganismos y plantas, juega un papel muy importante en el transporte. El agua capilar es la que se encuentra retenida en los poros, está disponible para microorganismos. El agua osmótica es retenida por las partículas de arcilla y humus, esta no está disponible

para los microorganismos ni las plantas (Eweis, 1999).

La capacidad de campo definida por (Veihmeyer & Hendrickson, 1949), como la cantidad de agua retenida en el suelo saturado, oscila entre 18 y 30% en peso en función del contenido de arcilla.

pH

Como indica (Benzina, 2001), el pH es el grado de alcalinidad o acidez del suelo, basada en la concentración de iones hidrógeno en solución. El valor de pH en la mayoría de los suelos se encuentra entre 4 y 8.

El balance hídrico de un suelo es decisivo para el pH. Según (Benzina, 2001), (Buckman, 1985), los suelos arcillosos tienden a acidificarse en los climas húmedos, debido al cambio iónico y a la lixiviación de cationes básicos.

Una acidez marcada es un síntoma de deficiencia de nutrientes. En suelos con pH menor a 6,5 se reduce la biodisponibilidad de P, Mg, Al, Ca, Mo, B. en suelos con pH mayores a 6,5 se reduce la disponibilidad de Cu, Mn, Zn, Fe, B (Suquilanda, 1996).

Contaminación por hidrocarburos

Suelo contaminado es todo aquel cuyas características físicas, químicas y biológicas naturales, han sido alteradas debido a actividades antropogénicas y representa un riesgo para la salud humana o al medio ambiente (MAE, 2000).

Químicamente, el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos principalmente por carbono e hidrógeno, con contenidos menores de otros elementos como azufre, oxígeno, nitrógeno y trazas de metales pesados.

La extracción, transporte y procesamiento del crudo, genera grandes volúmenes de desechos como ripios, lodos petrolizados, aguas de formación y petróleo crudo, constituidos básicamente por compuestos orgánicos aromáticos, poliaromáticos, derivados de hidrocarburos, compuestos inorgánicos y metales, los cuales son difíciles de degradar de manera natural por la complejidad de su estructura y pueden actuar como contaminantes si no se manejan de manera adecuada (Eweis, 1999).

La contaminación se produce como consecuencia de accidentes durante la producción y transporte de petróleo; esta situación ha causado daños ecológicos de gran importancia en el mundo, por lo que la recuperación de terrenos y aguas contaminadas se ha convertido en una importante industria en todo el mundo (Levin & Lee, 1997).

Fundamento bioquímico de la biorremediación

Según Eweis 1999., el fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, van a producir una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia un sustrato orgánico (compuestos hidrocarburos) que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia.

Los aceptores más comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el

oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio

Landfarming

El landfarming o tratamiento superficial en tierra, es una técnica de remediación ex situ aerobia, cuya aplicación usual es la reducción de la concentración de TPH en suelos contaminados (EPA, 2012).

Los suelos contaminados son excavados y tratados en espacios abiertos, sobre la superficie revestida con geomembrana para evitar toda posibilidad de percolación de lixiviados. El drenaje se recolecta mediante tuberías perforadas y se trata por separado o se recircula. La eficacia del tratamiento es menor a medida que se incrementa el peso molecular de los contaminantes a ser degradados (Eweis, 1999).

Biodegradación de los hidrocarburos.

Al conjunto de caminos metabólicos por medio de los cuales los tejidos incrementan la polaridad de un tóxico se lo denomina biotransformación. En algunos casos, la biotransformación resulta en la producción de un metabolito que es más tóxico que el compuesto original, al proceso se le denomina bioactivación. Si estos metabolitos se acumulan y vencen las defensas del organismo entonces pueden producir un daño que se manifieste en una respuesta tóxica (Atlas, 2002).

Materiales y Métodos

La dosificación fue calculada de acuerdo a lo establecido en las instrucciones de uso de inóculo.

Se toma la relación a una concentración de TPH de 16000 ppm en suelo, la concentración recomendable de adición del inóculo es de 2560 gramos por toneladas métrica de suelo, el experimento al tomar un cantidad de suelo de 40 kg con una concentración media aproximada de 16000 ppm de TPH en el suelo, la dosificación calculada con 40% de pérdida por lixiviación es de 28 gramos de inóculo a una densidad de 0,98 g/ml, con la referencia se toma un valor del doble de concentración ideal, un valor de la mitad de concentración y un valor de 0 como muestra control:

Concentración Alta 40 ml

Concentración Media (Ideal) 20 ml

Concentración Baja 10 ml

Sin dosis (control) 0 ml

Primera dosificación

Dosis 1: 40 ml de inóculo enzimático + 40 ml de agua destilada

Dosis 1: 20 ml de inóculo enzimático + 20 ml de agua destilada

Dosis 1: 10 ml de inóculo enzimático + 10 ml de agua destilada

Dosis 1: 0 ml de inóculo enzimático + 0 ml de agua destilada

Segunda dosificación, 30 días después de iniciado el proceso

Dosis 2: 20 ml de inóculo enzimático + 20 ml de agua destilada

Dosis 2: 8 ml de inóculo enzimático + 8 ml de agua destilada

Dosis 2: 4 ml de inóculo enzimático + 4 ml de agua destilada

Dosis 2: 0 ml de inóculo enzimático + 0 ml de agua destilada

Resultados

Ensayos de landfarm

El grado de descontaminación durante el proceso de biorremediación del suelo contaminado con diésel y bunker por la técnica de landfarming se evaluó mediante el monitoreo de las variables de respuesta y las variables control para cada uno de los tratamientos en cada unidad experimental se necesitó de 40 kg de suelo para cada uno de los tratamientos. Para realizar el proceso de contaminación del suelo se usó: suelo natural propio de la zona, fertilizante comercial, aserrín, diésel y bunker.

Caracterización del suelo contaminado.

Los resultados de la caracterización del suelo contaminado con hidrocarburos que se presentan en la tabla 7 muestran que la densidad real es de 1600 kg/m³ la cual es inferior para un suelo mineral de 2700 kg/m³, lo cual está ligado a suelos arcillosos. El valor de 29% de porosidad del

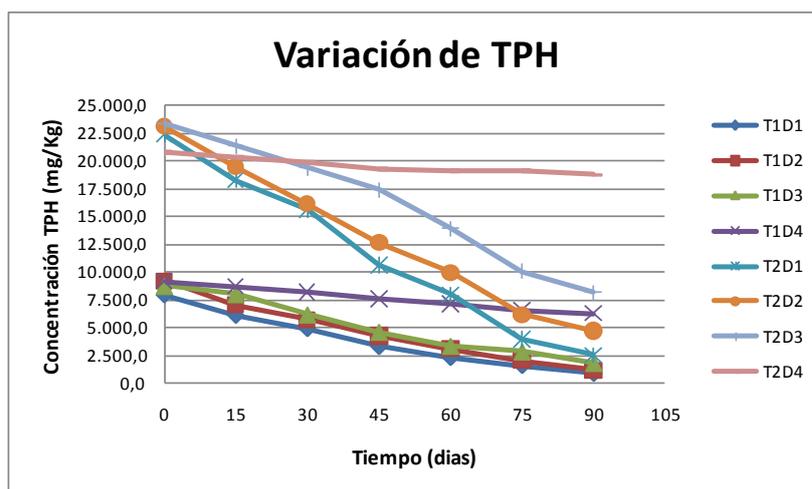
suelo evidencia un suelo compactado (Buckman, 1985).

El suelo contaminado con hidrocarburos presenta un pH de 5.6 por tanto es ligeramente ácido, este comportamiento es típico para suelo de climas húmedos, debido a que las precipitaciones son altas como para lixiviar las bases según Buckman (1985). Este valor se encuentra dentro del rango permitido para aplicar la técnica de landfarming según los parámetros establecidos en Ewis (1990). Quien además establece que la capacidad de campo para un suelo va de 18 a 30% en función del contenido de arcilla, por lo que el valor de 29,5% en el suelo caracterizado es un valor que está dentro de parámetros aunque en el límite para un suelo arcilloso.

Los valores reportados en la caracterización inicial son muy elevados y están sobre los 23000 ppm de TPH muy lejos de los parámetros máximos permitidos por la legislación ecuatoriana RAOH 1215 de 2500 ppm de TPH para suelo de uso agrícola. Tabla 1 y Cuadro 1

TRATAMIENTOS		TPH (mg/Kg) / TIEMPO (días)						
		0	15	30	45	60	75	90
Diesel 40ml	T1D1	7.976,7	6.130,0	4.930,0	3.315,7	2.329,0	1.606,7	897,3
Diesel 20ml	T1D2	9.246,7	7.077,7	5.717,7	4.252,7	3.096,0	2.046,7	1.170,7
Diesel 10ml	T1D3	8.762,0	8.023,3	6.184,0	4.622,7	3.356,7	2.841,7	1.806,0
Testigo Diesel	T1D4	9.165,0	8.739,7	8.218,0	7.604,7	7.153,3	6.585,3	6.300,0
Bunker 40ml	T2D1	22.410,7	18.266,3	15.666,7	10.646,7	7.993,3	3.982,0	2.551,0
Bunker 20ml	T2D2	23.161,7	19.480,0	16.173,0	12.649,3	9.973,3	6.216,0	4.744,3
Bunker 10ml	T2D3	23.373,3	21.361,0	19.426,0	17.432,0	13.931,3	10.091,3	8.162,0
Testigo bunker	T2D4	20.853,0	20.369,7	19.937,3	19.291,3	19.192,7	19.101,0	18.772,7

Tabla 1. Concentración de TPH.



Cuadro 1. Concentración de TPH.

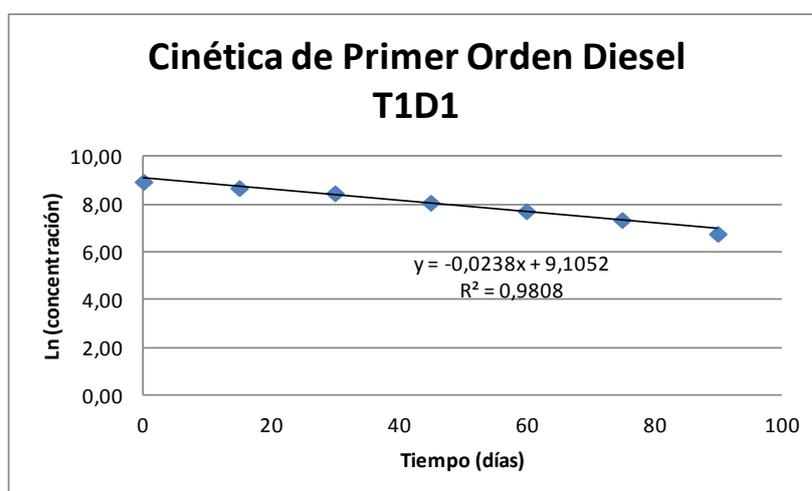


Gráfico 1. Cinética de primer orden para diésel.

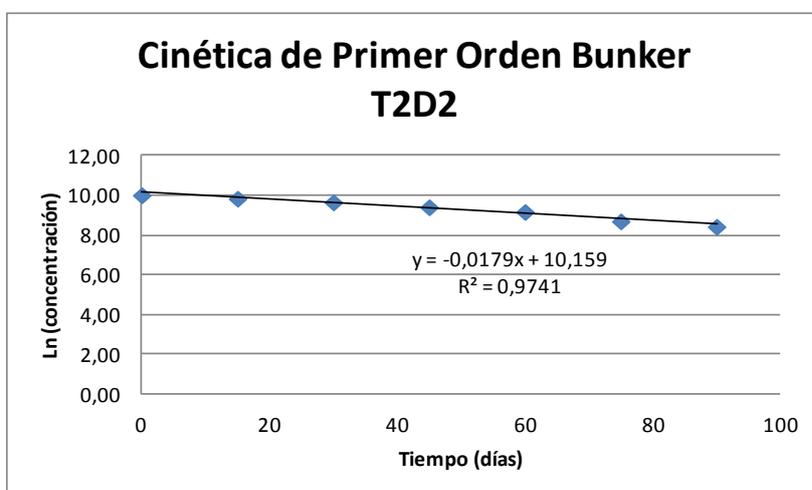


Gráfico 2. Cinética de primer orden para bunker.

DISCUSIÓN

El método de ex-situ de landfarm para remediar suelos contaminados por hidrocarburos es una técnica que da excelentes resultados frente a otras técnicas de remediación, es así que esta metodología lograr altos grados de eficiencia en la remoción de contaminantes, tomando en cuenta que las técnicas in-situ pueden lograr igual o mejores resultados siempre y cuando se utilicen de manera adecuada los parámetros de control (pH, temperatura, humedad), además de realizar un control al sistema de manera puntual y riguroso donde no varié las condiciones de manera que pueda afectar al proceso de bioremediación (Bongkeun, 2000), (Ebru, 2004).

Soto (2000) reporta que los contaminaste de hidrocarburo como gasolinas, diésel, kerosén son compuestos de hidrocarburos que por su naturaleza de compuestos simples con menos enlaces y ramificaciones son más fáciles de degradar en comparación a los hidrocarburos como parafinas, aromáticos y asfáltenos, ciclo parafinas, estos se consideran los más resistentes a la bioremediación.

El coctel de enzimas (oxigenasas y peroxidasas), incluidas en el inóculo enzimático aceleran el proceso de remediación, según Benavidez (2005) la técnica ex-situ de landfarm puede alcanzar valores aceptables de remoción en periodos que varían de 6 meses a varios años.

La alta eficiencia en la remoción de TPH del suelo por parte del inóculo enzimático se debe a su gran especificidad esto gracias a que puede romper las cadenas de carbono en cadenas más

pequeñas con los cual este carbono puede ser asimilado por las colonias de bacterias autóctonas propias del suelo (Oilfield Chemicals, 1900).

La bioaumentación con nutrientes NPK tiene resultados positivos los porcentajes de remediación utilizando esta técnica son considerables y van desde un 62% a un 85% en un tiempo de 45 días (Roberto, 2000), para esta investigación los porcentajes estuvieron en un rango del 82% en un tiempo de 90 días.

Según reporta Arroyo (2001), la necesidad de condiciones óptimas de pH, temperatura y nutrientes debe estar balanceada de manera que no se dé efectos contraproducentes ya que un desbalance en estos elementos puede generar que los tiempos de proceso se alarguen y en el peor de las casos el inóculo enzimático no tenga las condiciones necesarias para en conjunto con las bacterias poder degradar los compuestos de hidrocarburos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Como se evidencio la temperatura afecta directamente a la temperatura del suelo, al proceso de landfarm al ser un proceso que no genera calor interno a diferencia del compost este estará regulado por la temperatura ambiente los valores reportados tuvieron una media de 23° C lo cual es ideal para el proceso los ligeros picos que se dieron a los días 15 y 75 no afectaron de manera significativa.

Las variaciones del pH de la misma manera no fueron muy significativas salvo en el día 60 donde se evidencio un pico de bajada llegando a ser un suelo ácido para lo cual se tuvo que adicionar cal para regular el sistema, el descenso del pH no

tuvo una incidencia directa sobre el proceso se hubiera esperado que el inóculo y las poblaciones autóctonas si inhibieran a un pH bajo pero a la rápida acción de equilibrar el sistema no se evidenciaron cambios tan drásticos.

Como se ha mencionado en capítulos anteriores el control de estas condiciones y un buen control son fundamentales una demostración cuantitativa es que las concentraciones de TPH se redujeron de valores de 22981.9 mg/kg hasta 5152.4 mg/kg para el caso del bunker y para el caso del diésel 8661 mg/kg hasta 1291 mg/kg de haber existido condiciones desfavorables de pH y temperatura este proceso jamás hubiera podido ser tan eficiente.

El uso de un inóculo enzimático debería ser estudiado de manera más exhaustiva, en base a la legislación ambiental vigente RAOH 1215 en donde estipula que el recurso suelo para ser considerado remediado debe cumplir cuatro parámetros químicos TPH, Plomo, Cadmio, Níquel y HAP's, debido al costo de los análisis de todos estos parámetros esta investigación se centró solo en TPH.

Para procesos de biorremediación en suelos que contengan contaminantes como bunker y crudo pesado en grandes cantidades, se recomienda primero se realice un pre tratamiento mediante lavados con detergentes surfactantes para mediante arrastre hidráulico se elimine de manera mecánica gran parte de contaminante y de esta manera bajar las concentraciones de TPH a concentraciones óptimas de trabajo para la enzima.

Durante el proceso de biorremediación de suelo por landfarm es necesario estimular el crecimiento de los

microorganismos mediante la adición de variables abióticas principalmente provisión de agua mediante la humectación, el oxígeno mediante la aireación mecánica, ya que este es el aceptor de electrones en el proceso aerobio, llevado a cabo por bacterias y el adecuado suministro de nutrientes

BIBLIOGRAFÍA

Agarry, S., & Solomon, B. (2008). Inhibition kinetic of phenol degradation by indigenous *Pseudomonas aeruginosa*. . *Bioremediation*, 12-20.

Agencia. (1999). *Agencia de proteccion ambiental*. Recuperado el 2012, de www.atsdr.cdc.gov/ec

Annachhatre, A., & Gheewala, S. (1996). Biodegradation of chlorinated phenolic compounds. *Biotechnol*, 35-36.

Araujo, I. (2004). *Recuperación biológica de suelos contaminados con rípios de perforación, base aceite*. Maracaibo.

Atlas, R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Educación: Madrid.

Benzina, A. (2001). *Agricultura orgánica: Fundamentos para la región andina*. Alemania: Neckar-verlang.

Bongkeun, S. (2000). Isolation and characterization of diverse halobenzoate, 66-68

Buckman, H. (1985). *Naturaleza y propiedades de los suelos*. Mexico: Limusa.

EPA. (2012). *Agencia de proteccion ambiental*. Recuperado el 2012, de www.epa.gov/out/cat/landfarm

Eweis, J. (1999). *Principios de Bioremediación*. España: McGraw-Hill.

FAO. (1997). *Guía para la descripción de perfiles de suelo*. Roma: FAO.

Guaranda, W. (2012). *FUNDACIÓN REGIONAL DE ASESORÍA EN DERECHOS HUMANOS*. Obtenido de <http://www.inredh.org/index.php>

Levin, H., & Lee, J. (1997). *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos*. USA: McGraw-Hill.

MAE. (2000). TULAS. *TULAS*. Quito, Pichincha, Ecuador: MAE.

MAE. (2001). Decreto ejecutivo 1215. *Decreto para control hidrocarburífero*. Pichincha, Ecuador.

Morris, L. (1997). *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos*. Madrid: McGraw - Hill.

Mulas, R. (2014). *Fundamentos de biorremediación, Tratamiento y recuperación de suelos contaminados*. Obtenido de http://suel.wikispaces.com/file/view/Fundam_Biorremediacion.pdf/52971546/Fundam_Biorremediacion.pdf

Pardo, J. (2004). *Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo*. Bogotá.

PEPDA. (2012). *Protección Ambiental*. Recuperado el Julio de 2012, de <http://proteccionambiental.org/site/pepda.htm>

Petroecuador. (1999). Hidrocarburo totales de petróleo. *Hidrocarburo totales de petróleo*. Sucumbios, Ecuador.

Petroleo, M. (2000). Manual de control de derrames de petróleo. *Manual de control de derrames de petróleo*. Sucumbios, Ecuador.

Riser, E. (1996). Remediation of petroleum contaminated soil. LLC.

Rittmann, B. (1996). *Biología del medio ambiente*. Madrid: McGraw-Hill.

Ryan, J., & Loehr, E. (1991). Bioremediation of organic contaminated soils. *Journal of Hazardous materials*, 159-169.

Samanez, G. (2008). Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo. San Marcos, Peru.

Suquilanda, M. (1996). *Agricultura orgánica*. Quito: UPS.

Veihmeyer, F., & Hendrickson, A. (1949). *Methods of measuring field capacity and permanent wilting percentage of soil*. Sci.