

REMOCIÓN BIOLÓGICA DE BARIO DE AGUAS DE PRODUCCIÓN UTILIZANDO ASOCIACIONES MICROBIANAS ESTRATIFICADAS (AME)

L. I. MOGOLLÓN*, R. RODRÍGUEZ, W. LARROTA y R. TORRES

ECOPETROL - Instituto Colombiano del Petróleo, A.A. 4185 Bucaramanga, Santander, Colombia

Se presenta el desarrollo de una técnica para la remoción biológica de bario de aguas de producción. Esta tecnología, denominada Asociaciones Microbianas Estratificadas, AME, se evaluó a nivel de laboratorio y a escala banco. En los ensayos realizados en microcosmos, las AME fueron capaces de inmovilizar el metal, y esta capacidad se incrementó al adicionarse bacterias oxidadoras de azufre. El empleo de biorreactores permitió valorar el efecto de: la concentración de azufre reducido disponible, la longitud del biorreactor, el patrón de flujo y el efecto del tiempo de residencia en la captura del metal. La composición elemental de los constituyentes sólidos, la localización y naturaleza de los depósitos de metal en el biorreactor fueron determinados por microscopía electrónica. Este proceso tiene una eficiencia de remoción del bario entre el 95-98% en concentraciones que van de los 8 a 50 gm^{-3} . La captura del metal está dada por fenómenos de biosorción y por la formación de complejos de baja solubilidad como es el sulfato de bario.

This work shows the development of a technique for biological removal of barium from production waters. This technology, called stratified microbial associations (SMA), was evaluated at laboratory and bench scale levels. Removal capacity of this metal was demonstrated by microcosmos and bioreactor assay. The role of reduced sulfur availability, residence time, flow pattern and bioreactor size were also evaluated. Elemental composition of the solid constituents, localization and nature of the metal deposits in the bioreactor were determined by electron microscopy. This process has an efficiency of 95%-98% of barium removal with concentrations between 8 and 50 gm^{-3} . Metal capture is mainly due to biosorption and the formation of low solubility complexes such as barium sulphate.

Palabras claves: aguas de producción, bario, AME, bacterias oxidadoras de sulfuros.

* A quien debe ser enviada la correspondencia

INTRODUCCIÓN

Entre los diversos efluentes generados en la industria petrolera, se encuentran las aguas de producción, que son mezclas complejas de materiales orgánicos e inorgánicos, suspendidos y disueltos, cuya composición varía con el origen y el tiempo de explotación del yacimiento al cual pertenecen. Dentro de dichos componentes se encuentra el bario, metal pesado cuya concentración en estos efluentes puede exceder los límites permisibles exigidos por la legislación vigente, constituyéndose en un problema de gran importancia ambiental (Ministerio de Salud, 1983, 1984 y OMS, 1990).

En el tratamiento de aguas de producción, las técnicas fisico-químicas convencionales para la remoción de metales pesados son poco efectivas y de baja competitividad económica, dada la complejidad de la matriz y los grandes volúmenes que deben ser tratados (Hansen y Davies, 1994).

Por otro lado, los procesos biológicos para el tratamiento de aguas de producción va dirigido a la disminución de la carga orgánica del efluente, pero no hacen énfasis en la captura de cationes pesados presentes en la solución (Smith *et al.*, 1994 y Volesky y Hocan, 1995). Sin embargo, algunas técnicas biológicas no convencionales utilizadas para el tratamiento de corrientes de desecho, como las tierras húmedas ("wet land") y las Asociaciones Microbianas Estratificadas, AME, son promisorias en la remoción de metales pesados de estos efluentes (Bender y Phillips, 1994 y Rodríguez *et al.*, 1994).

En general, las AME se definen como comunidades microbianas heterógenas que se organizan en forma laminar. Se caracterizan por su alta diversidad y resistencia, y son capaces de proliferar en aguas de producción mejorando su calidad ambiental. Dentro de los microorganismos que integran la asociación se encuentran cianobacterias, bacterias sulfurosas coloreadas (BSC) y no coloreadas (BSNC) y varios tipos de bacterias heterótrofas (Bender y Phillips, 1994 y Vatcharapijan *et al.*, 1994).

Este trabajo, utilizando como modelo la remoción de bario, muestra la utilización de la técnica AME en la eliminación de metales pesados de corrientes de producción. Esta aplicación es una innovación biotecnológica y una excelente herramienta para ser

utilizada en las dos formas probables de disposición final de las aguas de producción: vertimiento en superficie y reinyección.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La secuencia experimental, que permitió el planteamiento y la utilización de las AME como una alternativa viable para la remoción de bario de las aguas de producción, se ejecutó en varias etapas. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y mostraron una alta reproducibilidad en los resultados.

El trabajo incluyó pruebas de remoción de bario utilizando las AME en microcosmos y biorreactores. Se evaluó el efecto del tiempo de residencia, el efecto de la longitud del biorreactor y la determinación de la localización y naturaleza de los depósitos de metal por microscopía electrónica. La eficiencia de la remoción de bario se determinó por la disminución en la concentración del metal en la solución. Esta fue medida por espectrofotometría de absorción atómica y por colorimetría (Hawes, 1985). Los sulfatos fueron determinados turbidimétricamente (Norma ASTM D516-90).

Asociaciones microbianas estratificadas, AME.

Las AME, empleadas en la realización de este trabajo, fueron conformadas utilizando cultivos mixtos de cianobacterias, bacterias oxidadoras de sulfuro coloreadas y no coloreadas, obtenidas por enriquecimiento selectivo de muestras de aguas de producción, procedentes del Distrito de Producción El Centro-Ecopetrol de Barrancabermeja.

Biorreactores.

En la proliferación de la biomasa y en la realización de los ensayos a escala banco, se emplearon tres tipos de biorreactores continuos. El material de empaque fue el siguiente (% en peso seco): carbón mineral 15%, arena 6%-7%, grava 75% y recortes de material vegetal, 3%-4%. Estos fueron inoculados con los microorganismos que conforman las AME y puestos en operación después de seis semanas de crecimiento.

Los tipos de biorreactores utilizados fueron los siguientes (Figura 1):

Modelo 1: Biorreactor de lecho empacado de una

nes iniciales de sulfatos en estas aguas oscilaban entre los 20 gm^{-3} y los 80 gm^{-3} .

Utilización de las AME en microcosmos.

Se evaluó la contribución individual y sinérgica de las AME, las bacterias sulfurosas no coloreadas (BSNC) y de la adición de una fuente de azufre reducido en la precipitación y acumulación de bario y la producción de sulfatos, se realizó un diseño experimental, el cual incluyó ocho tratamientos. Estos fueron:

	Tratamiento							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
AME	+	+	+	+	-	-	-	-
Tiosulfato	+	+	-	-	+	+	-	-
BSNC	+	-	+	-	+	-	+	-

(+) Adición; (-) No adición

sola etapa. Se utilizó para el cultivo de los microorganismos. Dimensiones: relación largo/ancho 1,5, altura 0,12 m .

Modelo 2: Biorreactor de empaquetamiento alternado multietapas en cascada. Dimensiones relación largo/ancho 2,6, altura 0,19 m, área del tapete microbiano 0,23 m^2 .

Modelo 3: Biorreactor empacado en forma secuencial para tener regiones de flujo con empaque y sin empaque en una sola dirección. Relación largo/ancho 3,5, altura 0,1 m, área del tapete microbiano 0,23 m^2 .

Tipos de agua de producción.

Se seleccionaron dos tipos de aguas de producción: una de concentración alta de bario 45-50 gm^{-3} y otra de concentración baja 8-15 gm^{-3} . Las concentracio-

Se utilizaron recortes de 3 cm^2 de la asociación, crecidos hasta la madurez (cuatro semanas), los cuales se colocaron en vasos de precipitado con 100 cm^3 de agua de producción. Se adicionaron 2 cm^3 de BSNC en una concentración de 48×10^6 células por cm^3 . La concentración final de azufre reducido en el ensayo fue de 100 gm^{-3} , lograda mediante adición de un patrón de tiosulfato de sodio de 1.000 gm^{-3} .

Los tratamientos de las muestras, T1-T8, fueron incubados en cámara iluminada durante 24 horas, en agitación longitudinal (150 ciclos). Al final de la incubación, el volumen total de agua fue filtrado al vacío utilizando membranas de 0,45 μm . Las muestras fueron preservadas con un mililitro de ácido nítrico y refrigeradas, para posteriormente evaluar su contenido de bario y de sulfatos.

Empleo de biorreactores en el tratamiento de diferentes aguas de producción.

Se determinó la funcionalidad de las AME en la captura y precipitación de bario en biorreactores, cuando se utilizan diferentes tipos de aguas de producción. Simultáneamente, se determinó la incidencia del patrón de circulación del flujo de agua en el interior del sistema.

Cada uno de los tipos de agua de producción evaluados se trató en los biorreactores tipo dos y tres en forma separada. En todos los casos, el agua de producción fue suplementada con 100 gm^{-3} de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y 50 gm^{-3} de NH_4Cl . El tiempo de residencia fue de 30 horas y el tratamiento se efectuó durante 10 días, en cada uno de los cuales se tomaron muestras para análisis de bario y de sulfatos.

Efecto del tiempo de residencia en la captura de bario en sistemas continuos.

La única variable de este diseño experimental fue el tiempo de residencia. Se utilizaron cuatro niveles: 30, 24, 18 y 12 h. Los ensayos fueron realizados en el biorreactor 3, utilizando agua de producción de concentración alta de bario suplementada con 100 gm^{-3} de tiosulfato de sodio y 50 gm^{-3} de cloruro de amonio. Las velocidades de los flujos empleados variaron entre 10 y $20 \text{ cm}^3/\text{min}$.

Efecto de la longitud del biorreactor en la captura de bario.

Se tomaron cuatro muestras en diferentes puntos en los cuales no había material de empaque a lo largo del biorreactor. Las distancias utilizadas fueron: 0,125 m, 0,625 m y 0,875 m.

Los ensayos se realizaron en el biorreactor 3. Las condiciones de operación restantes fueron idénticas a las descritas en el diseño anterior.

Microscopía electrónica.

Con el fin de determinar el sitio y naturaleza de la formación de depósitos de bario procedente de la solución, se tomaron muestras para SEM, Scanning Electronic Microscopy, acoplado con una sonda EDX, Electron Dispersive. La modalidad de backscatter se utilizó para determinar zonas de alta densidad electrónica donde se acumulan de preferencia los elementos pesados. Las muestras fueron tomadas del biorreactor 2. Se incluyeron soportes colonizados y materiales biológicos de diferentes puntos de la columna de agua.

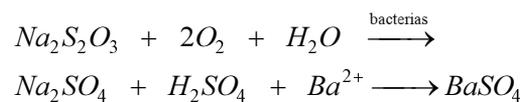
El procesamiento de las muestras incluyó la deshidratación en concentraciones crecientes de etanol y secado por punto crítico, y la posterior observación en un microscopio electrónico Cambridge Instrument Stereoscan 240.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Utilización de las AME en microcosmos.

Los resultados de la Figura 2 muestran que las AME son capaces de inmovilizar el bario (T4), y esta facultad se optimiza por la bioaugmentación con BSNC lográndose una remoción del 95% (T1 y T2).

El inóculo de BSNC fue capaz de oxidar el tiosulfato y precipitar el bario (T5). Esto confirma que los microorganismos utilizan una fuente de energía que, en este caso, la proporciona el tiosulfato. Se genera la siguiente reacción (Jorgensen, 1988 y Kelly, 1988):



La alta solubilidad del tiosulfato hace que esté disponible para las bacterias y se logre la oxidación y producción de concentraciones elevadas de sulfatos, los cuales reaccionan con el bario de la solución y lo precipitan.

La acumulación del bario y otros metales dentro de la asociación, no es el resultado únicamente de la formación de compuestos de baja solubilidad, como sulfatos, sino también del atrapamiento del metal por diferencias de carga entre el metal en solución y la pared celular de la biomasa (Volesky y Hocan, 1995). Este caso puede apreciarse en el tratamiento, donde se emplearon recortes de las AME y BSNC sin adicionarle ninguna fuente de azufre y con el que se logra, hasta en un 84%, la inmovilización del metal (T3).

Eficiencia de las AME en diferentes tipos de agua de producción y diferentes patrones de flujo.

Los niveles de remoción de bario alcanzados con este experimento se muestran en las Figuras 3 y 4. En la Tabla 1 se observan los resultados obtenidos en la bioproducción endógena de sulfatos, los cuales resultan efectivos en la remoción de bario de altas concentraciones (Figura 4).

El patrón de flujo utilizado en este sistema permite generar gradientes redox similares a los reportados por Gemerden (1993). En esta clase de sistemas la conservación de gradientes de potenciales redox que facilitan la sedimentación de las diferentes formas de azufre, hacen efectiva la remoción de metales como sulfuros

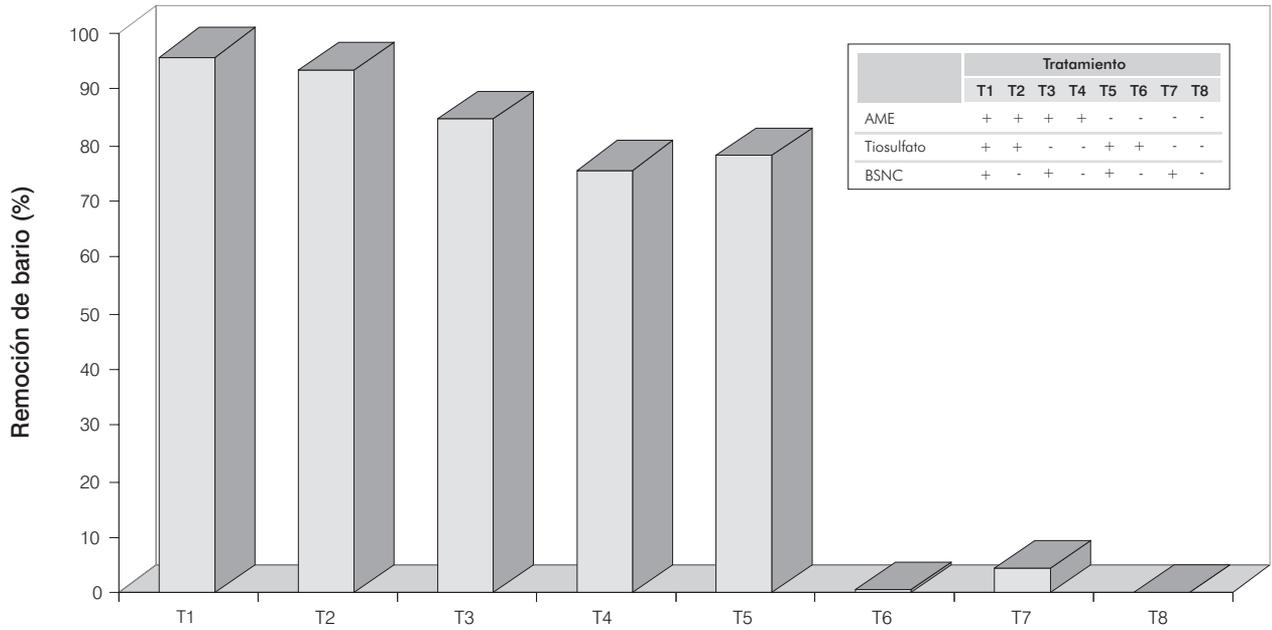


Figura 2. Utilización de las AME en microcosmos. Remoción de bario. El tiempo de exposición fue de 24 h, la concentración inicial de bario fue $45,2 \text{ gm}^{-3}$. (+) Adición, (-) No adición, AME recortes maduros de asociaciones microbianas estratificadas, BSNC adición de inóculo bacterias oxidadoras de sulfuros, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. La concentración final de tiosulfato de sodio fue 100 gm^{-3}

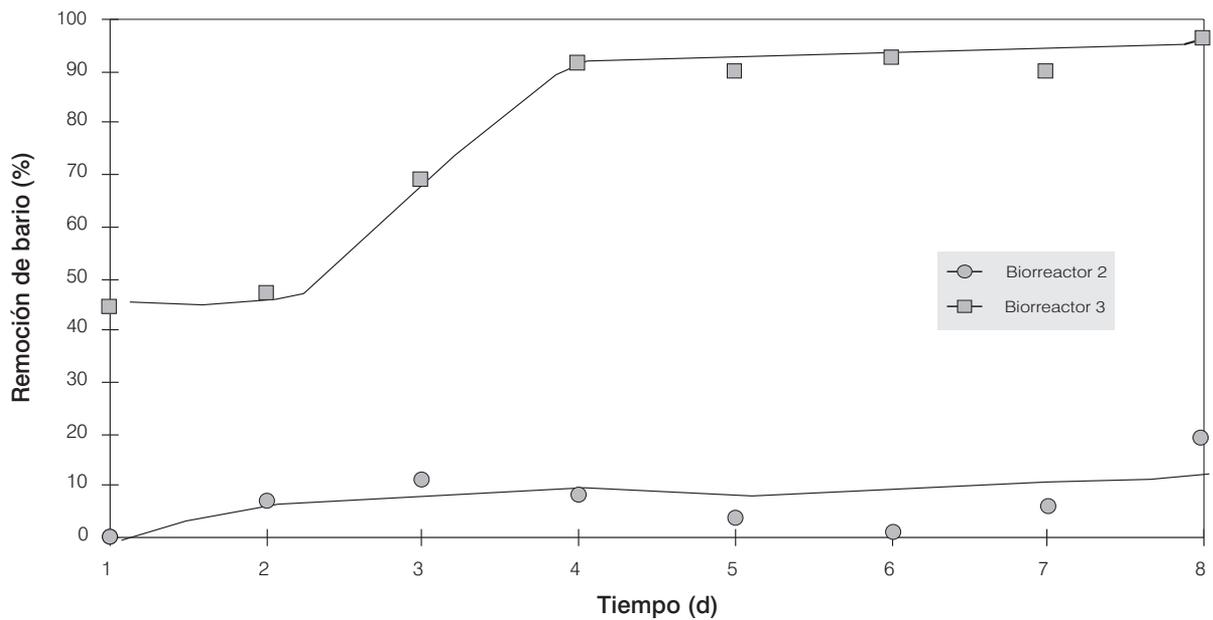


Figura 3. Remoción de bario en los biorreactores 2 y 3, utilizando agua con una baja concentración de metal. La concentración inicial de bario fue de $8,1 \text{ gm}^{-3}$

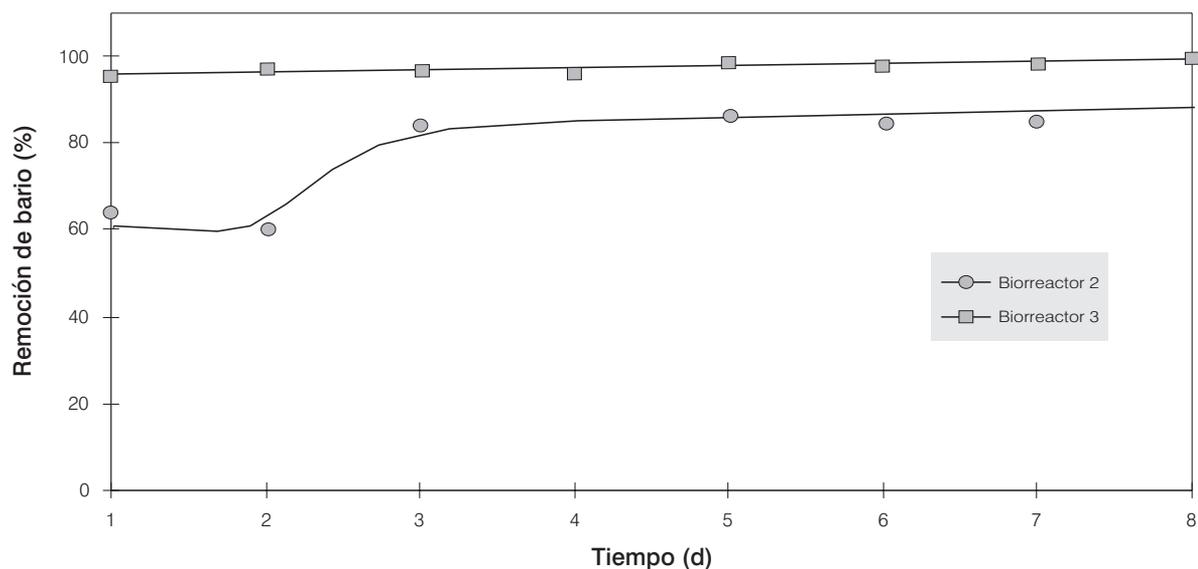


Figura 4 Remoción de bario en los biorreactores 2 y 3, utilizando agua con una alta concentración del metal. La concentración inicial de bario fue de $54,9 \text{ gm}^{-3}$.

Tabla 1. Producción de sulfatos en los biorreactores 2 y 3, utilizando diferentes tipos de agua de producción

CONCENTRACIÓN DE SULFATOS (gm^{-3})				
Agua de producción. Concentración de metal				
Día	Concentración baja		Concentración alta	
	Biorreactor 2	Biorreactor 3	Biorreactor 2	Biorreactor 3
1	85,3	211	32,2	790
2	95,0	290	41,3	982,5
3	72,0	1.090	36,0	797,5
4	59,5	1.538	400,0	945
5	57,5	1.550	30,0	942,5
6	57,5	1.725	48,3	781,8
7	68,2	1.510	61,3	947
8	86,6	1.790	282,5	620
Control	8,1	16,8	54,9	17

o sulfatos metálicos. Este caso ocurre con el bario que precipita como sulfato de bario.

En consecuencia, el flujo horizontal, como el presentado en el biorreactor 3, favorece el establecimiento de zonas oxidantes en el extremo superficial de la asociación, y de zonas reductoras en la parte media y profunda del crecimiento de la asociación. De esta manera, el bario se acumula como sulfato en forma

preferencial en las zonas oxidantes, mientras que en las zonas reductoras se estarían formando sulfuros endógenos, para su posterior transformación en sulfatos en las zonas oxidantes (Gemerden, 1993).

Un modelo que relacione cuantitativamente la concentración de bario soluble y la concentración de sulfatos producidos, está determinado por otros iones presentes en el sistema, por lo cual, cada tipo de agua

de producción se convierte en un caso particular. Además, el balance de masa está determinado por la presencia de formas de sulfato en los diferentes soportes, la cuantificación del azufre reducido que está presente en el agua tratada y el suministrado como nutriente.

Adicionalmente, se debe tener en cuenta que la composición del agua modifica el tipo y la concentración de microorganismos presentes en la asociación. Así, una concentración de azufre reducido, entre 50-100 gm^{-3} , estimula las bacterias oxidadoras de sulfuros y, por consiguiente, la producción endógena de sulfatos y el atrapamiento de bario. Por otro lado, si disminuye la concentración de azufre reducido, disminuyen también la población de microorganismos oxidadores de sulfuros y la eficiencia en la precipitación del metal.

Efecto del tiempo de residencia en la captura de bario en sistemas continuos.

Los resultados obtenidos en estos ensayos indican que el sistema amortigua eficazmente cambios en los flujos de entrada de agua, sin detectarse disminución en el atrapamiento de bario, ni en la capacidad filtrante (Figura 5). Tampoco se detectó una disminución sustancial en la oxidación de fuentes reducidas de azufre, y se mantuvieron los sulfatos biogénicos en el rango de 530-790 gm^{-3} , en el caso del tiempo de residencia de 12 h (Tabla 2).

En un sistema de tratamiento de aguas basado en la utilización de las AME, el tiempo de residencia en el cual la remoción de bario es efectiva muestra una relación directa entre la superficie y el volumen del reactor. De esta manera, al incrementar la relación superficie expuesta / volumen del reactor, es posible reducir el tiempo de residencia. Este hecho se debe a que las reacciones de circulación del C, S, N y P, son dependientes de la fijación de carbono por vía fotosintética. Por lo tanto, la eficiencia con que se realicen estas reacciones depende, en gran medida, de la superficie expuesta a la luz solar (Alexander, 1980 y Gemerden, 1993).

Efecto de la longitud del biorreactor en la captura de bario.

En la Figura 6 aparecen los resultados obtenidos del efecto que presenta la variación de la longitud del reactor en la producción de sulfato y captura del bario. Puede observarse que a medida que aumenta la longitud del reactor hay un incremento en la producción de sulfato y una disminución del contenido de bario. La concentración inicial del metal fue de 60 gm^{-3} , disminuyendo hasta 0,92 gm^{-3} a la salida del reactor, con lo cual se alcanzó un 98% de remoción del metal en el biorreactor estudiado, modelo 3.

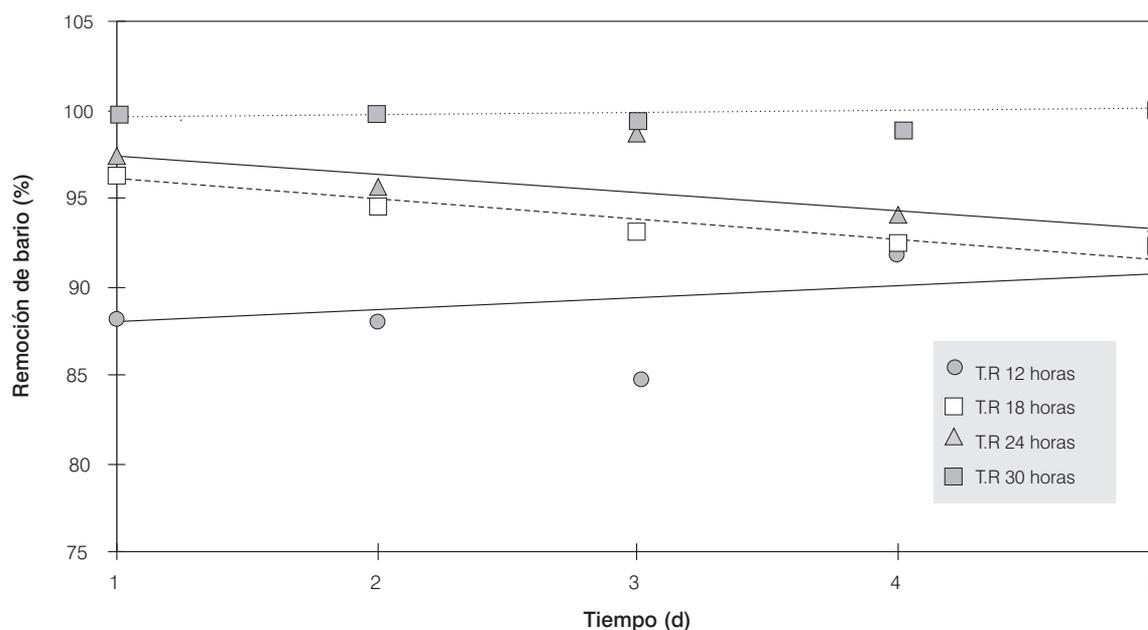


Figura 5. Valoración del efecto del tiempo de residencia en la remoción de bario biorreactor 3

Tabla 2. Valoración del efecto del tiempo de residencia. producción de sulfatos.

CONCENTRACIÓN DE SULFATOS (gm^{-3})				
DÍA	Tiempo de residencia			
	12 Horas	18 Horas	24 Horas	30 Horas
1	584	1280	656	790
2	647	1279	465	983
3	532	847	970	798
4	794	541	452	945
5	663	481	335	942

Este biorreactor puede ser modelado, de acuerdo con los resultados, como un reactor continuo en que la transformación del tiosulfato en sulfato es función de la longitud, permitiendo así remociones de bario cercanos al 100%.

Microscopía electrónica.

Las muestras directas de la biomasa, incluidas dentro de las AME, mostraron fibras tubulares elongadas que corresponden a cianobacterias. El entramado formado por este tipo microbiano permite la adherencia de bacterias y la filtración de partículas.

Así mismo, se observan bacterias de forma bacilar que resultan más claras y brillantes que el resto de la muestra (Figura 7, microfotografía). Una imagen global

de la muestra a 709(X) revela cómo son filtrados los sólidos contenidos en el agua y luego depositados sobre la malla de microalgas. Por su mayor densidad electrónica, las partículas compuestas de elementos más pesados son observables con un mayor brillo. Esto explica la tonalidad adquirida por algunas bacterias en este sector de la muestra.

Al posicionar la sonda EDX sobre estas bacterias se resuelve perfectamente un pico correspondiente al elemento bario, y otro pico de idéntica altura perteneciente al azufre. La concentración de azufre basal de las células (0,5%-1,5% en peso seco de cenizas según Grady y Lim, 1988) no se detecta en los análisis elementales de rutina utilizando EDX. De esta manera, el azufre depositado en la superficie de las células es

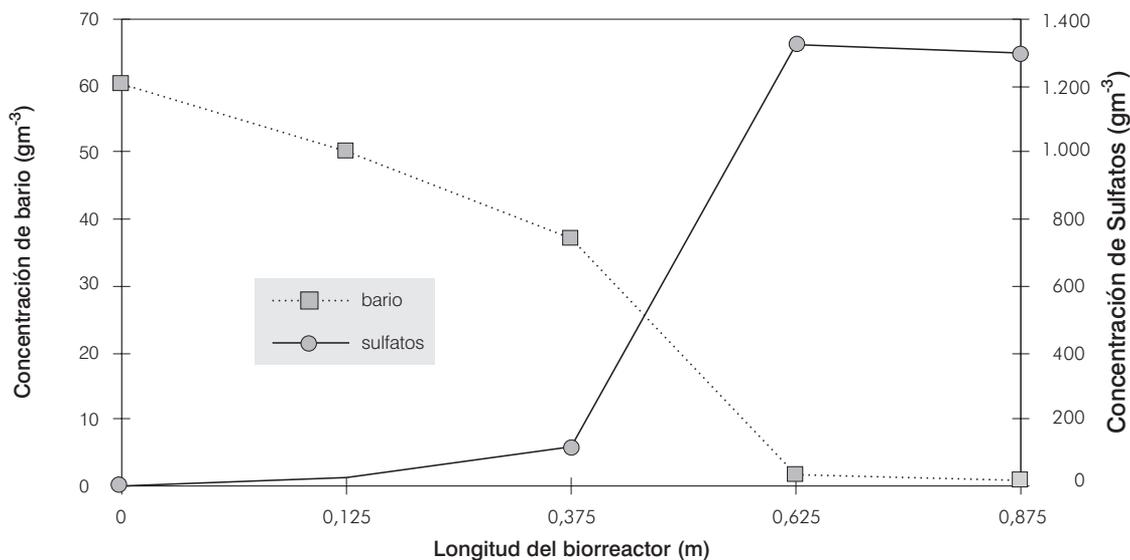


Figura 6. Efecto de la longitud del biorreactor. Resultados de los porcentajes de remoción de bario y concentración de bario y concentración de sulfato

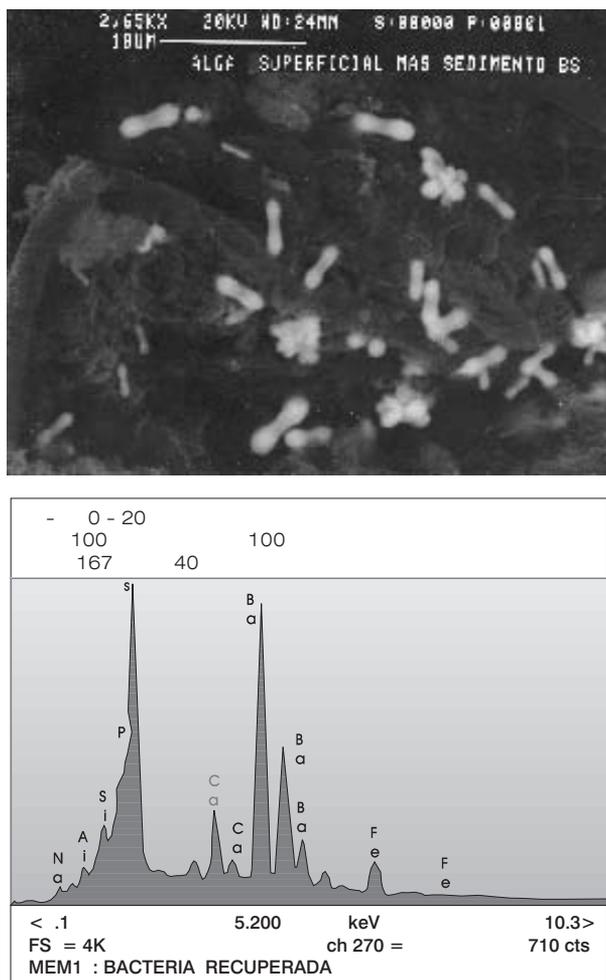


Figura 7. Fotografía de microscopía electrónica de las AME, y la ubicación de depósito de bario

de origen exógeno. Además, siendo el sulfato la forma insoluble de bario más frecuente, es factible que estos dos elementos se acumulen proporcionalmente. También se detectaron picos de Fe, Ca y P. Estos resultados se obtuvieron luego de revisar un mínimo de veinte campos por muestra.

CONCLUSIONES

- Las AME remueven, en forma efectiva, el bario de las aguas de producción. Las remociones de bario tienen una efectividad del 95% cuando se tratan aguas de producción con una alta y baja concentración del metal. Esta remoción de metales está dada por procesos de biosorción y por la formación de complejos de baja solubilidad como

sulfuros, sulfatos, carbonatos y polifosfatos.

- El tiempo de residencia para una remoción eficaz del metal, está relacionado directamente entre la superficie expuesta y el volumen del reactor. Para las condiciones de operación utilizadas en el biorreactor 3, se determinó que en los tiempos de residencia utilizados, 18, 24 y 30 horas, se logran remociones de bario superiores al 90%.
- La concentración de azufre reducido que ingresa al sistema está relacionada con la inmovilización de bario. Concentraciones de 50 gm^{-3} de tiosulfato lograron remociones mayores al 95% cuando el flujo del agua era horizontal.

REFERENCIAS

- Alexander, M., 1980. *Introduction to soil microbiology*, Jhon Wiley and Sons, Inc. USA: 129-390.
- American Public Health Association. American Water Works Association and Water Environment Federation, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18 th edition, 1992. American Public Health Association 1015 Fifteenth Street, NW. Washington D. C., 20005: 4-131.
- Bender, T. y Phillips, P., 1994. "Implementation of microbial mats for bioremediation", en *Emerging technology for bioremediation of metals*, Means, J. L. y Hincsee, R.E. (eds.), CRC press, Boca Ratón: 85 - 98.
- Gemerden, H. V., 1993. "Microbial mats: A joint venture", *Marine Geology*, 113: 3 - 25.
- Grady, C. P. y Lim, J.H., 1988. *Biological water treatment theory and applications*, New York, Marcel Decker Inc: 230 - 231.
- Hansen, B. R. y Davies, S. R. H., 1994. "Review of the potential technologies for the removal of dissolved components from produced water", *Trans. Chem. E.*, 72A: 176 - 188.
- Hawes, C. L., 1985. "Simple method finds barium in oil-field brines", *Oil & Gas Journal*: 130-132.
- Jorgensen, B. B., 1988. "Biogeochemistry of chemoautotrophic bacteria", *Autotrophic bacteria*, Science Tech Publisher, Madison: 117 - 146.
- Kelly, D. P., 1988. "Oxidation of sulphur compounds", *Society for general microbiology symposium*, 42: 65 - 198.

- Ministerio de Salud, 1983. "Normas y criterios de calidad física, química, y bacteriológicas del agua potable", Decreto 2105, capítulo III.
- Ministerio de Salud, 1984. "Criterios de calidad para destinación del recurso", *Decreto 1594*, capítulo IV.
- Rodríguez, E. S., Ekanemasang, U. y Bender, J., 1994. "Release of metal-binding flocculants by microbial mats", en *Emerging technology for bioremediation of metals*, Means, J. L. y Hinchee, R. E (eds.), CRC press, Boca Ratón: 118 - 123.
- Smith, L. A., Alleman, B. C. y Copley-Graves, L., 1994. "Biological treatment options", en *Emerging technology for bioremediation of metals*, Means, J.L. y Hinchee, R. E. (eds.), CRC press, Boca Ratón: 1 - 12.
- Vatcharapijjan, Y., Graves, B. y Bender, J., 1994. "Remediation of mining water with microbial mats", en *Emerging technology for bioremediation of metals*, Means, J. L., Hinchee, R. E. (eds.), CRC press, Boca Ratón: 124-130.
- Volesky, B. y Hocan, Z. R., 1995. "Biosorption of heavy metals", *Biotechnology Progress*, 11(3): 235 - 250.
- World Health Organization, 1990. "Environmental health criteria 107, Barium", IPCS, p. fl.148.