



Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diesel*

Nancy J. Pino Rodríguez** / Stephanie Carvajal*** /
Andrés Gallo**** / Gustavo Peñuela*****

*Comparison between biostimulation and bioaugmentation
to recover soils contaminated with diesel*

*Comparaçãõ entre bio-estimulaçãõ e bio-aumento
para a recuperaçãõ de solos contaminados com diesel*

RESUMEN

Introducción. El diesel es un hidrocarburo contaminante que puede llegar a matrices ambientales por diferentes fuentes y generar un gran impacto ambiental negativo. **Objetivo.** evaluar la biorremediación con bioestimulación y bioaumentación como metodología para la recuperación de suelos contaminados con diesel. **Materiales y métodos.** Los ensayos se realizaron con muestras de suelo obtenido de un lugar con historial de contaminación. Se llevaron a cabo 4 enfoques; atenuación natural bioaumentación con microorganismos aislados a partir del suelo y bioestimulación con nutrientes o con cascara de banano. **Resultados.** Durante 30 días se monitoreó la concentración de microorganismos, y de hidrocarburos dando como resultado que el mejor tratamiento fue el de adición de nutrientes con cáscara de banano, lo-

*Artículo derivado del proyecto de investigación "Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en el municipio de Apartadó" realizado entre abril y septiembre de 2010 en Apartadó (Antioquia). **Microbióloga y Bioanalista. MSc. En Microbiología. Grupo GDCON, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. ***Bióloga. Grupo GDCON, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. ****Químico. MSc (C). Grupo GDCON. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. *****Químico. Msc., Ph.D. Coordinador grupo GDCON. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Correspondencia: Nancy Johanna Pino Rodriguez, e-mail: nancyjohanna@gmail.com

Artículo recibido: 12/02/2012; Artículo aprobado: 15/05/2012

grando una degradación del 93%, la más alta con respecto a los otros tratamientos. **Conclusión.** Los resultados sugieren que una adecuada aplicación de nutrientes contribuye al desarrollo de la población microbiana en el suelo con capacidad de degradar diesel aumentando la efectividad del proceso.

Palabras clave: biodegradación, bioestimulación, bioaugmentación, diesel, biorremediación.

ABSTRACT

Introduction. Diesel is a contaminating hydrocarbon that can come to environmental matrices via several sources, and produce high environmental damage. **Objective.** To evaluate bioremediation with biostimulation and bioaugmentation as a methodology to recover soils contaminated with diesel. **Materials and methods.** The tests were performed with soil samples obtained from a place with a contamination historical record. 4 approaches were taken: natural attenuation, bioaugmentation with microorganisms isolated from the ground, biostimulation with nutrients and banana peels. **Results.** The microorganisms and hydrocarbon concentrations were monitored during 30 days, and the best treatment was that of the nutrient addition with banana peels, achieving a 93% of degradation, the highest one in comparison to the other treatments. **Conclusion.** The results suggest that an adequate application of nutrients contributes to the development of the microbial population in the soil with diesel degradation capacity, increasing the process' effectiveness.

Key words: biodegradation, biostimulation, bioaugmentation, diesel, bioremediation.

RESUMO

Introdução. O diesel é um hidrocarboneto contaminante que pode chegar a matrizes ambientais por diferentes fontes e gerar um grande impacto ambiental negativo. **Objetivo.** Avaliar a bio-remediação com bio-estimulação e bio-aumento como metodologia para a recuperação de solos contaminados com diesel. **Materiais e métodos.** Os ensaios se realizaram com mostras de solo obtido de um lugar com histórico de contaminação. Levaram-se a cabo 4 enfoques; atenuação natural, bio-aumento com microrganismos isolados a partir do solo, bio-estimulação com nutrientes e com casca de banana. **Resultados.** Durante 30 dias se monitorou a concentração de microrganismos e de hidrocarbonetos dando como resultado que o melhor tratamento foi o de adição de nutrientes com casca de banana, conseguindo uma degradação do 93%, a mais alta com respeito aos outros tratamentos. **Conclusão.** Os resultados sugerem que uma adequada aplicação de nutrientes contribui ao desenvolvimento da população microbiana no solo com capacidade de degradar diesel, aumentando a efetividade do processo.

Palavras importantes: bio-degradação, bio-estimulação, bio-aumento, diesel, bio-remediação.

INTRODUCCIÓN

El diesel es una mezcla compleja de diferentes hidrocarburos y está constituido principalmente por alcanos, alquenos e hidrocarburos aromáticos, también posee en menor proporción azufre, nitrógeno, metales y oxígeno. Las moléculas de hidrocarburos presentes en el diesel contienen de 8 a 40 átomos de carbono, y en general son más pesados que los que se encuentran en la gasolina. El diesel es uno de los mayores contaminantes de agua y suelo y puede llegar a estas matrices como consecuencia de actividades industriales y derrames accidentales, los efectos de esta contaminación son graves para los diferentes ecosistemas ya que interfiere con el crecimiento y el desarrollo normal de la fauna y la flora de diversas maneras¹.

Existen diferentes tecnologías y métodos para la recuperación de suelos contaminados con derivados del petróleo como el diesel², sin embargo la biorremediación es una tecnología que en los últimos años se ha venido desarrollando como una alternativa más económica y ambientalmente sostenible

para el tratamiento de suelos contaminados³. La biorremediación utiliza la capacidad de los microorganismos presentes en ambientes afectados para degradar compuestos o convertirlos a otros menos tóxicos⁴. La recuperación de zonas afectadas con el uso de microorganismos ofrece una solución práctica y viable para la restauración de ecosistemas⁵. Varios investigadores han reportado microorganismos con una alta capacidad de degradar hidrocarburos, aislados de hábitats naturales históricamente contaminados con petróleo o sus derivados⁶.

La biorremediación puede llevarse a cabo con dos enfoques: la bioaumentación que se realiza con la adición externa de microorganismos degradadores y la bioestimulación que se realiza con la adición de nutrientes para favorecer el crecimiento de los microorganismos y de esta manera aumentar la velocidad de la degradación⁷. Ambos enfoques han sido usados exitosamente para la recuperación de suelos, sin embargo la biorremediación es un proceso que se ve afectado por factores como el tipo de suelo, pH, tipo de contaminante, disponibilidad de nutrientes y de aceptores de electrones⁸, lo que hace necesario evaluar las diferentes alternativas antes de realizar trabajos en campo. El objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar un proceso de bioestimulación y bioaumentación con el fin de encontrar un método eficiente, de bajo costo, robusto para acelerar la biorremediación de un suelo contaminado con diesel proveniente del embarcadero de UNIBAN ubicado en Apartadó, Antioquia.

MATERIALES Y MÉTODOS

El suelo seleccionado para este estudio se obtuvo de un área contaminada crónicamente con diesel en Apartadó, Antioquia. Debido a las actividades de embarque de la zona bananera. Estudios previos determinaron que la concentración de hidrocarburos era mayor a 6000 mg /kg. Las muestras fueron recolectadas en bolsas de polietileno asépticamente a partir de una capa 0-60 cm suelo, la cantidad de muestra osciló entre 500 a 700 g. Las muestras de suelo fueron recolectadas y almacenadas a 4°C para análisis físico-químicos posteriores y para el aislamiento de microorganismos degradadores de diesel.

Cultivo y aislamiento de microorganismos

La determinación de la densidad bacteriana en el suelo se llevó a cabo según lo descrito por Hernesmaa et al.⁹ Se tomó 1 g de suelo y se mezcló con 9 ml de NaCl al 0,9%, la suspensión se mezcló con vórtex durante 1 min, a partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-8} y las dos últimas se sembraron en placas de agar nutritivo (Merck), para el recuento de microorganismos y en medio mínimo para bacterias hidrocarbonoclastas que fueron incubadas durante 48 h en oscuridad a 35°C.

Obtención de cultivos puros y del consorcio microbiano enriquecido

Las cepas microbianas fueron aisladas por el cultivo de enriquecimiento a partir de muestras de suelo contaminado con diesel. Se utilizó Medio Minino de Sales (MMS), como medio de cultivo, con la siguiente composición en gramos por litro: 8,5 g de Na_2HPO_4 , 3 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g de NH_4Cl , 0,0147 g de CaCl_2 , 0,001 g de KI, 0,04 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,04 g $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,002g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de NaCl, 0,005g de H_3BO_3 , 0,0004g de CuSO_4 . 100 gramos de suelo fueron inoculados en frascos erlen meyer de 500 mL con 200 mL de MSM suplementado con 2%(v/v) de diesel como única fuente de carbono, los cultivos se incubaron en un agitador orbital a 35 °C, a 180 rpm durante 7d. Después de la incubación, una alícuota de 20 mL del cultivo fue usada como inóculo para 200 mL de MSM fresco con 2% de diesel y fue cultivado en las mismas condiciones. Este paso se repitió cuatro veces para obtener un consorcio enriquecido con microorganismos degradadores de diesel. Como control se usó medio sin inocular. Para el aislamiento de cepas de microorganismos del consorcio, después de cada ciclo de enriquecimiento, 1 mL de caldo de cultivo se diluyó en serie y se sembraron en placas de MSM con agaral 1,5% y 2% de diesel, se incubaron durante 7 días, cada colonia individual fue identificado inicialmente por su color y la morfología y se caracterizó por la capacidad

de degradación de diesel en MSM suplementado con diesel 12% como única fuente de carbono. Como control se utilizaron placas de agar sin suplemento de diesel.

Ensayos de bioestimulación y bioaumentación

Se llevaron a cabo 4 tratamientos por triplicado como se describe en la tabla 1. El suelo se tamizó a tamaños de partícula entre 2-2,3 mm para garantizar que se diera una distribución homogénea. Para estos ensayos se utilizaron 400 g de suelo en bandejas plásticas. La relación entre el suelo y las cáscaras de banana fue 90:10. Las fuentes de nitrógeno y fósforo fueron $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y K_2HPO_4 respectivamente. La concentración inicial de diesel fue de 6.27%. Para calcular la cantidad de nutrientes a adicionar se utilizó la relación C:N:P(100:10:1). Los microorganismos adicionados fueron aquellos aislados por enriquecimiento y se agregaron en una concentración de 10^9 UFC/g suelo en una solución de 100 mL de agua junto con los nutrientes. Como control se utilizó suelo esterilizado en autoclave a una temperatura de 121°C y una presión de 1.5 kg/cm^2 durante 1 hora, este proceso se repitió durante 3 días. El suelo utilizado para los tratamientos tenía las mismas condiciones, a excepción de aquel utilizado para el control que estaba esterilizado. El ensayo fue monitoreado durante 30 días y se tomó muestra al inicio y al final del ensayo y de cada uno de los tratamientos para determinar la concentración de hidrocarburos.

Tabla 1. Ensayos de bioestimulación y bioaumentación

Tipo tratamiento	Tipo	Descripción
Tratamiento A	Control	Suelo estéril con hidrocarburos
Tratamiento B	Atenuación natural	Suelo con hidrocarburos
Tratamiento C	Bioaumentación	Con adición de microorganismos degradadores de hidrocarburos a una concentración de 10^7 UFC/gr suelo
Tratamiento D	Bioestimulación	Suelo con hidrocarburos, adición de nutrientes potasio y nitrógeno
Tratamiento E	Bioestimulación	Suelo con hidrocarburos, adición de nutrientes nitrógeno y cascara de banana

Procedimientos Analíticos

La concentración de diesel fue cuantificada usando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies® 6890 Plus como la suma del contenido de hidrocarburos no polares contenidos en el rango $\text{C}_{10}\text{H}_{22}$ - $\text{C}_{25}\text{H}_{52}$ (n-Decano, n-Pentacosano DRO Mix (Tennessee/Mississippi), Restek). Se inyectaron $2.0 \mu\text{L}$ del extracto de la muestra en el puerto de inyección a 250°C en modo Splitless, la separación de los compuestos de las muestras analizadas se realizó en una columna capilar Rtx®-5MS w/Integra-Guard de $30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm I.D.}$, $0.25 \mu\text{m}$ de espesor de película y 5 m de guarda columna (Restek). La temperatura del horno inicio a 40°C por 2 min, luego subió a una rampa de $12.00^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 320°C donde se mantuvo por 5.0 min, usando helio como gas de arrastre a un flujo de $3.0 \text{ mL}/\text{min}$, la detección se realizó con un detector de ionización de llama a 330°C .

Las muestras fueron extraídas utilizando 5 g de suelo (previamente tamizado por una malla de 2.0 mm) y realizando una extracción por ultrasonido durante 5.0 min utilizado 3 porciones de 10 mL de diclorometano, los extractos fueron concentrados hasta aproximadamente 3 ml y aforados en un balón de 5 mL con diclorometano.

La concentración de nitrógeno fue cuantificada con el método Kjeldahl usando un destilador automático modelo K-355 marca Buchi y un titulador automático 848 tritino plus marca Metrhom, el fósforo por el método del ácido ascórbico. El contenido de materia orgánica fue determinado por el método de Walkley-Black. El pH del suelo se midió a partir de 1 g de suelo diluido en 10 ml de agua desionizada, las mediciones se hicieron con un medidor de pH Metler Toledo® MP 220.

Análisis estadísticos

Se analizó el efecto de cuatro tratamientos diferentes en el porcentaje de biodegradación de diesel en el suelo. Se realizó el análisis de los resultados empleando un análisis de varianza (Anova) ($p < 0.05$). Finalmente se realizó el análisis de correlación de Pearson para distribución paramétrica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del suelo

El pH del suelo fue 7.2, el contenido de materia orgánica fue de 5.3%, la concentración de N fue de 1.5 mg/Kg y la de P 343 mg/kg. El suelo presentó una concentración promedio de hidrocarburos de 6270 mg /kg. Esta concentraciones según lo reportado por McAllister; et al¹⁰ están en el límite inferior que afecta la disponibilidad para la biodegradación de los microorganismos. El perfil de hidrocarburos (figura 1) indicó que están constituidos principalmente por hidrocarburos de $C_{10}H_{22}$ a $C_{20}H_{42}$ y carbonos, con posibles trazas de compuestos de 25 átomos de C. La ausencia de compuestos ligeros ($C < 10$), sugiere que se pueden haber perdido por evaporación y degradación biótica y abiótica. Por el contenido de fósforo y nitrógeno el suelo se calificó como fértil, sin embargo se añadió nitrógeno y fósforo, para cubrir el desbalance por la presencia del diesel.

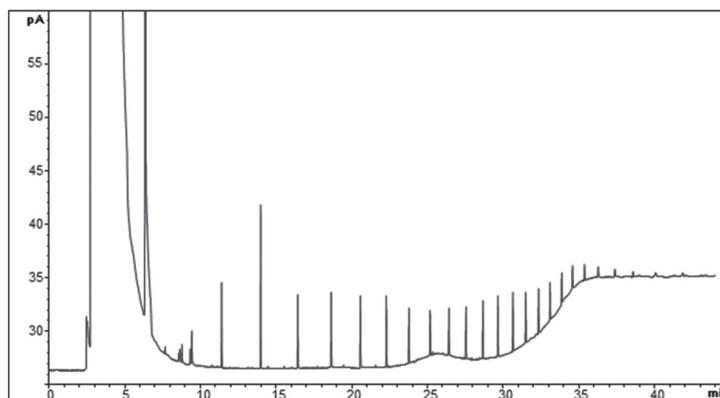


Figura 1. Cromatogramas obtenidos a partir del procesamiento de las muestras de suelo por cromatografía de gases

Aislamiento de microorganismos

Los recuentos de microorganismos, mostraron que la población dominante era de bacterias hidrocarbonoclastas, cuyos valores fueron típicos de suelos contaminados con microorganismos adaptados¹¹. los recuentos de bacterias hidrocarbonoclastas fue en promedio de 1.6×10^8 que corresponden a una población alta, adaptada, típica de suelos con presencia de hidrocarburos durante periodos prolongados, de acuerdo con las recomendaciones reportadas en la literatura estos niveles corres-

ponden a suelos con alto potencial de biodegradación con respecto a la población heterótrofa total, la población hidrocarbonoclasta representó un alto porcentaje de más del 60%. Después del proceso de enriquecimiento se lograron aislar 13 cepas diferentes, las cuales se clasificaron de acuerdo a su morfología y tinción de Gram.

Efecto de la bioestimulación y la bioaumentación en la degradación

Al analizar la influencia de los diferentes tratamientos en la remoción de diesel, se encontró que la adición de nutrientes y microorganismos aumentaron la degradación del compuesto (figura 2). La adición de nutrientes (P, N y cáscara de banano) presentó efectos significativos, evidenciando el requerimiento de nutrientes para estimular la actividad microbiana con este tratamiento la degradación fue de 93%. En el presente trabajo se manejó una relación C:N:P = 100:10:1 y ésta fue elegida basándose en las recomendaciones de literatura^{12,13} que consideran los rendimientos y la composición de elementos observada en la biomasa para determinados grupos microbianos. Los resultados sugieren para este estudio que la bioestimulación es el factor determinante para la recuperación del suelo. La razón puede deberse a que el crecimiento microbiano se incrementa cuando la relación C:N se optimiza, ya que los suelos altamente contaminados con hidrocarburos a menudo tienen un exceso de fuente de carbono, es decir, la relación C:N es muy alta, lo cual no favorece la degradación¹⁴. Los resultados obtenidos con la cáscara de banano son relevantes ya que muestra la importancia que tienen este tipo de matrices para la recuperación de suelos contaminados, porque favorecen el enriquecimiento del suelo con nutrientes, con lo cual se puede hacer un aprovechamiento de desechos agroindustriales, generando de esta manera estrategias sostenibles de recuperación.

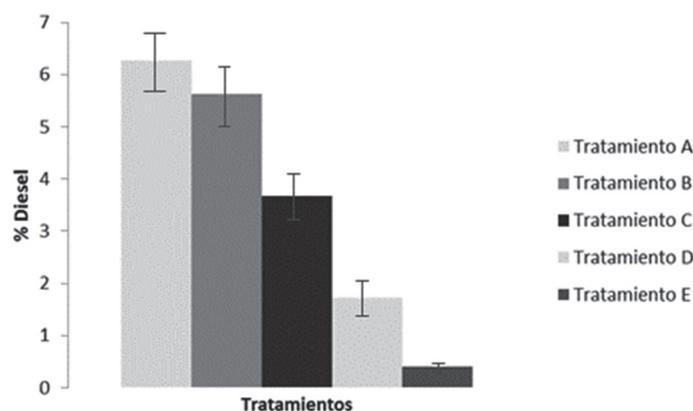


Figura 2. Degradación de hidrocarburos. Cada tratamiento inició con una concentración aproximada de 6,27% de hidrocarburos. Las barras de error representan la desviación estándar de tres ensayos independientes.

La bioaumentación tuvo un efecto positivo con la adición de inóculo, en la remoción de hidrocarburos siendo del 41%, sin embargo, el efecto positivo de la bioaumentación no se mantuvo constante durante todo el periodo de experimentación. Los cambios de humedad y la disminución de fuente de carbono y nutrientes pueden originar cambios en el interior de los microcosmos modificando la relación C:N y por lo tanto el metabolismo, favoreciendo el crecimiento de otras especies de bacterias y con ello la disminución de la degradación de hidrocarburos. Esto se pudo comprobar con el recuento de microorganismos hechos durante el ensayo, donde el recuento de bacterias hidrocarbonoclastas fue disminuyendo con el tiempo (figura 3). La explicación alternativa a la falta de influencia de los inóculos

microbianos es que los inóculos utilizados fueron incapaces de competir con las bacterias del suelo en los experimentos realizados, debido a que los cambios drásticos son típicos de las comunidades bacterianas como una respuesta a las diversas condiciones ambientales y los inóculos cultivados no pueden adaptarse tan rápido como la comunidad bacteriana presente en el suelo a las diversas condiciones ambientales. Cuando los consorcios bacterianos se enriquecen en condiciones de laboratorio el aumento relativo de determinadas cepas de bacteria se basa en su capacidad de crecer rápidamente en condiciones óptimas con hidrocarburos utilizados como sustrato.

Al suelo que no se agregaron nutrientes ni microorganismos, hubo un porcentaje pequeño de degradación, 10%, esto sugiere que la comunidad microbiana en suelo contaminado estaba naturalmente adaptada para degradar diesel debido a que el suelo utilizado en los experimentos estaba contaminado con combustible diesel durante o años, la comunidad microbiana autóctona tuvo tiempo de adaptarse a los hidrocarburos del diesel. La razón para el bajo porcentaje de degradación es que las condiciones ambientales no permitieron un alto desarrollo de altas densidades microbianas o actividades metabólicas¹⁵. Los resultados obtenidos con el control indican que la degradación se debió a factores bióticos, ya que en este tratamiento no había presencia de microorganismos.

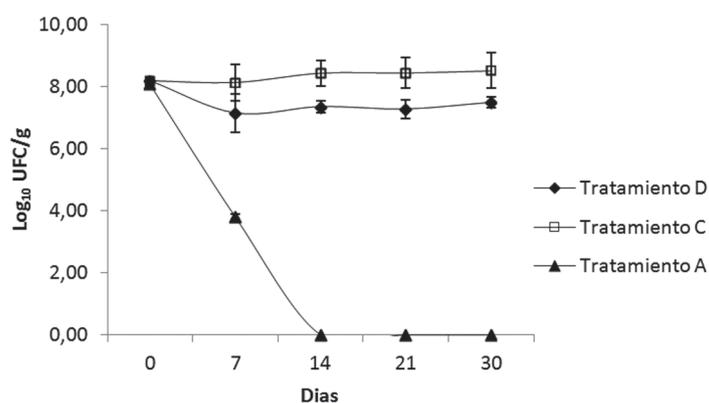


Figura 3. Recuento bacterias hidrocbonoclastas durante los ensayos de degradación

CONCLUSIONES

Se evaluaron diferentes tratamientos de bioestimulación y bioaumentación, resultando el de mejores resultados la bioestimulación con nutrientes y cáscara de banano, ya que permitió el desarrollo de la población microbiana con capacidad de degradar diesel. Los resultados muestran que el uso de microorganismos nativos en suelos afectados representa una buena alternativa para disminuir la contaminación generada por compuestos como el diesel, siempre y cuando se estimule su desarrollo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a UNIBAN por la financiación del proyecto

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BELOUSOVA, N., BARYSHNIKOVA, L. & SHKIDCHNEKO, A. Selection of microorganisms capable of degrading petroleum and its products at low temperatures En: Applied Biochemistry and Microbiology. 2001. Vol. 38, p. 437-440.
2. LIN, T.; *et al.* Characterization of Floating Activity on Diesel-Assimilating Local Bacterial Isolates. En: J. Biosci. Bioeng. 2005. Vol. 99, p. 466-476
3. FILONOV, A.; *et al.* Assessment of naphthalene biodegradation efficiency of Pseudomonas and Burkholderia strains tested in soil model systems En: J. Chem. Technol. Biotechnol. 2006. Vol. 81, p 216–224.
4. NIKAKHTARI, H.; KUMAR, P. & NEMATI M., H. Biodegradation of diesel oil in a baffled roller bioreactor. En: J. Chem. Technol. Biotechnol. 2009. Vol. 84 p. 525–532
5. WHANG, L.; LIU, C. Application of Biosurfactants, Rhamnolipid, and Surfactin, for Enhanced Biodegradation of Diesel-Contaminated Water and Soil-. En: J. Hazard. Mater. 2008. Vol. 151, p. 155-162
6. MOHAMMED, D.; RAMSUBHAG, M. An assessment of the biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil using non-indigenous, commercial microbes. En: Water Air Soil Pollut. 2007. Vol. 356, p. 182–349.
7. MARGESIN, R. & SCHINNER, F. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. Appl. Environ. Microb. 2001. vol67 p. 3127-3129
8. GOGOI B, DUTTA N, GOSWAMI P, KRISHNA T, A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site En: Advances in Environmental Research. 2008. Vol. 7, p. 767–782
9. HUESEMANN, M. Guidelines for land-treating petroleum hydrocarbon-contaminated soils. En: J. Soil Contam. 1994. Vol. 3, N° 3, p. 299-318.
10. MCALLISTER, P. & CHIANG, C. A practical approach to evaluation natural attenuation of contaminants in groundwater En: Groundwater Monitoring and Remediation. 1994. Vol. 14, p. 161-173.
11. ATLAS, R. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. En: Microbiol. Rev. 1981. Vol. 45, p. 180-209
12. POPE, D. Natural Attenuation of Soils. En Seminar Series on Bioremediation of Hazardous Waste Sites: Practical Approaches to Implementation. EPA 1625/R-96/001. 1996.
13. DEMQUE, D.; BIGGAR, K. & HEROUX, J. Land treatment of diesel contaminated sand. En: Can. Geotech. 1997. Vol. 34, p. 421-431.
14. VIEIRA, P.; FARIA, R. & VIEIRA, F. Statistical analysis and optimization of nitrogen, phosphorus, and inoculum concentrations for the biodegradation of petroleum hydrocarbons by response surface methodology World. En: J. Microbiol. Biotechnol. 2009. Vol. 25, 427–438.
15. YANG, S.; *et al.* Bioremediation of oil spills in cold environments: A review. Pedosphere. 2009. Vol. 19, p. 371-381.