



Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos totales de petróleo (HTP's)

Márquez Badillo Adalberto*, Ávila Jiménez Miguel, Cruz Colín María del Rocío, Castañeda Briones María Teresa, Chávez Martínez Margarita, Espinoza-Castañeda Marisol

Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Ciencias Básicas. Av. San Pablo No. 180, Azcapotzalco, Ciudad de México. C.P. 02200. México.

* Autor para correspondencia: miaj@correo.azc.uam.mx

Recibido:

17/mayo/2016

Aceptado:

16/septiembre/2016

Palabras clave

Biorremediación,
hidrocarburos,
suelo

Keywords

bioremediation,
hydrocarbons,
soil

RESUMEN

En este trabajo se determinó la capacidad de seis cepas de hongos para degradar hidrocarburos totales de petróleo (HTP) de un suelo con 11,464 ppm de HTP proveniente de Coatzacoalcos, Veracruz. Las cepas fueron crecidas previamente en bagazo de caña sobre la superficie del suelo. Después de tres semanas de incubación se dio inicio al proceso de biorremediación mezclando el bagazo con el suelo. El tratamiento se llevó a cabo durante seis semanas a temperatura ambiente. Los mejores porcentajes de remoción alcanzados fueron: 38.6, 36.3, 32.6 y 31.1, con las cepas HBC7, M1H5, HBG y HBC9, respectivamente.

ABSTRACT

The objective of this work was to determine the degradability of total petroleum hydrocarbons (TPH) by six fungal strains in an industrial soil from Coatzacoalcos, Veracruz that was contaminated, initially with 11.464 ppm. At the beginning the strains were grown on sugar cane bagasse over the soil surface and incubated during 3 weeks, then starts the bioremediation process, where the bagasse were mixed with the soil for another 6 weeks a standard temperature. The removal of TPH was obtained: HBC7 (38.6%), M1H5 (36.3%), HBG (32.65) and HBC9 (31.1%).



Introducción

Actualmente en México, la contaminación de suelos con hidrocarburos es un problema que se ha vuelto muy común, debido a un excesivo consumo de combustibles derivados de los hidrocarburos en todo el país. Esta problemática aumenta, con el robo de combustibles desde ductos, realizado por el crimen organizado, lo cual provoca derrames accidentales, con el subsecuente impacto ambiental.

Los hidrocarburos presentes en suelos contaminados, representan riesgos potenciales para la salud humana y los ecosistemas, ya que son cancerígenos y mutagénicos, por lo tanto la limpieza de estos sitios es importante para proteger la salud del hombre (Wang et al., 2009).

Debido a la importancia de este problema se han realizado muchas investigaciones durante los últimos años acerca de la degradación de hidrocarburos derramados en suelos y remediados con microorganismos.

La biodegradación de contaminantes en suelo es un proceso crucial en la actualidad, ya que ofrece alternativas para limpiar ambientes. Por ejemplo, los hongos filamentosos que realizan los primeros pasos de la biodegradación de hidrocarburos vertidos en suelo y agua, siendo necesarios para su actividad degradadora, los nitratos y fosfatos disponibles en el suelo (Manahan, 2007).

Los hongos basidiomicetos, también conocidos como ligninolíticos, han sido ampliamente utilizados para la degradación de compuestos orgánicos persistentes, como los hidrocarburos de petróleo debido a la similitud estructural de la lignina con éstos contaminantes. Durante su catabolismo, los hongos sintetizan un sistema enzimático que se encarga de la ruptura de la lignina. Las enzimas en cuestión son de la familia de las peroxidases, oxidoreductasas, lacasas y tirosinasas. La eficiencia de la degradación dependerá del tiempo, del tipo y concentración del contaminante, así como de algunas propiedades físico-químicas del suelo (Haritash y Kaushik, 2009).

Un estudio realizado por Haritash y Kaushik (2009) analizó diferentes parámetros para mejorar la biorremediación, determinando que la eficiencia del proceso se puede aumentar mediante la combinación de microorganismos como algas, bacterias y hongos, para transformar a los contaminantes en formas menos peligrosas o inocuas.

Wang y colaboradores (2009) determinaron que la degradación de los Hidrocarburos Aromáticos

Policíclicos (HAP) en suelo se realizó a ritmos diferentes y en distinta medida, porque la tasa de transferencia de masa de los contaminantes orgánicos a la fase acuosa del suelo, es la clave que regula la velocidad de biodegradación.

En México la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental se han realizado investigaciones acerca de la degradación de hidrocarburos en suelo.

En el 2012, se realizó la determinación a nivel laboratorio, de la degradación de hidrocarburos en un suelo contaminado artificialmente, utilizando dos cepas de hongos: la cepa F (*Penicillium sp.*) aislada de madera en descomposición y la cepa HBG (*Aspergillus sp.*) aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos, dando como resultado un mayor porcentaje de degradación del 7.7% con la cepa F (Briseño, 2012).

En el 2013, se realizó un tratamiento con el hongo HBG para la remediación de un suelo contaminado con hidrocarburos mediante la técnica de bioaumentación. Esta cepa y el bagazo de caña fueron elegidos después de realizar un estudio previo de la actividad enzimática de cinco cepas desarrolladas en tres soportes ligninocelulósicos. Un aspecto relevante del estudio fue que el crecimiento del hongo HBG se vio afectado durante el tratamiento. Esto fue atribuido al elevado valor de pH del suelo, el cual no fue modificado. El porcentaje de biodegradación alcanzado después de cinco semanas de tratamiento fue 15.6 (Castaños, 2013).

Finalmente, en 2014 se realizó un trabajo para evaluar el efecto del pH del suelo en el desarrollo y la actividad enzimática de seis cepas de hongos. Las cepas estudiadas presentaron el mejor desarrollo y la mayor actividad enzimática a un pH de 5.0 (Juárez, 2014).

En este trabajo se determinó la capacidad de seis cepas de hongos para degradar hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en un suelo contaminado proveniente de la zona de explotación de la refinería de Coatzacoalcos, Veracruz. La nomenclatura aplicada para las cepas fue como sigue: HBG, HBC9, HBC12, M1H5, F y HBC7, y fueron desarrolladas previamente en bagazo de caña para su propagación antes de ser utilizadas en el tratamiento del suelo contaminado.

Metodología

Caracterización del suelo

Se utilizó un suelo contaminado con hidrocarburos proveniente de Coatzacoalcos, Veracruz. El suelo se trató previamente antes de caracterizarlo. El tratamiento

consistió en triturado, tamizado por una malla 10 y secado a temperatura ambiente.

Las determinaciones que se llevaron a cabo para la caracterización del suelo fueron: humedad, pH, nitrógeno total, nitrógeno inorgánico, fósforo, materia orgánica e hidrocarburos totales de petróleo (HTP). Esta caracterización tuvo como propósito evaluar el contenido de nutrientes y el grado de contaminación del suelo. Las determinaciones se hicieron por triplicado basándose en la NOM-021-SEMARNAT-2000 a excepción de la humedad y la determinación de HTP.

La determinación de la humedad se realizó mediante el método Dean-Starck. La humedad en la muestra se determinó formando una mezcla azeotrópica con tolueno, llevada a destilación y condensada en una trampa (Departamento de estudios y análisis de plaguicidas (IICA, 1988)

La determinación de HTP se realizó siguiendo la metodología descrita en Fernández et al. (2006) la cual consistió en una extracción por reflujo Soxhlet con diclorometano y la cuantificación por gravimetría.

Propagación de las cepas en el soporte

Se emplearon seis cepas diferentes: F, HBC12, HBC9, HBC7, HBG y M1H5 las cuales pertenecen al cepario del Laboratorio de Microbiología Ambiental. La cepa F fue aislada de madera en descomposición y las cinco restantes fueron aisladas de un suelo contaminado proveniente de la misma zona que el suelo utilizado en este estudio (Cruz et al., 2011).

Las cepas fueron sembradas por picadura en botellas Roux, las cuales contenían agar extracto de malta estéril y se incubaron a 28 °C durante tres semanas para su desarrollo. Una vez que se observó crecimiento en las botellas Roux, se preparó una suspensión de esporas maduras de cada una de las cepas (Figura 1) para ser utilizadas como inóculo. Posteriormente, las cepas fueron desarrolladas en bagazo de caña para su propagación antes de ser utilizadas en los tratamientos de biorremediación.

Para el crecimiento de las cepas en el soporte se utilizaron 6 refractarios donde se colocaron 300 g de suelo en cada recipiente, sobre el suelo se agregaron 9 gramos de bagazo de caña como soporte de crecimiento para los hongos y 150 mL de medio salino con el propósito de proporcionar la humedad y los nutrientes necesarios para el desarrollo de las cepas. La composición del medio salino por litro de medio fue: 5.0 g de glucosa, 2.0 g de fosfato dibásico de potasio (KH_2PO_4), 0.5 g de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.1

g cloruro de calcio (CaCl_2) y 0.3 g de cloruro de amonio (NH_4Cl). Los refractarios con suelo, soporte y medio fueron esterilizados dos veces en autoclave a 15 kg/cm² durante 20 minutos para asegurarse de la ausencia de microorganismos. Se agregaron 150 mL de inóculo de las cepas en los refractarios con suelo, soporte y medio estéril, una cepa por refractario. Se dejaron por tres semanas a condiciones ambientales para su propagación en el soporte, manteniendo la humedad mediante la adición de agua estéril cuando fue necesario. De igual manera se preparó un refractario utilizado como blanco con suelo, soporte, medio y sin inóculo.

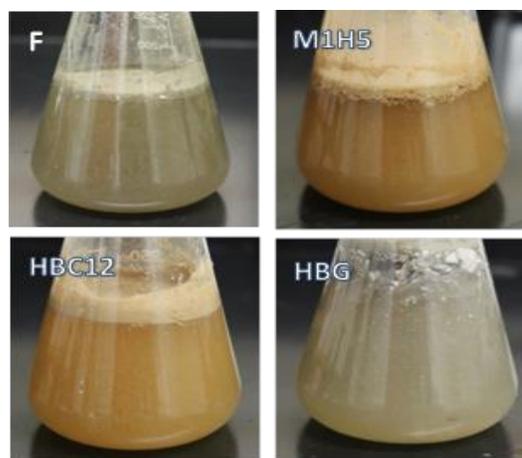


Figura 1. Suspensión de esporas.

Biorremediación del suelo

Para dar inicio al proceso de biorremediación, el bagazo con las cepas desarrolladas sobre él, fue mezclado con el suelo contaminado con hidrocarburos. Los tratamientos fueron mantenidos en condiciones ambientales durante 6 semanas y se tomaron muestras cada dos semanas para llevar a cabo la determinación de HTP remanentes. Se obtuvo de cada tratamiento, una muestra compuesta de cinco puntos aleatorios, la cual fue mezclada y secada a 50 °C. La determinación de HTP en el blanco únicamente se realizó al inicio y al final del tratamiento siguiendo el mismo procedimiento de muestreo y para la determinación de HTP remanentes.

Resultados y discusión

Caracterización del suelo

En la tabla 1 se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica del suelo contaminado con hidrocarburos y su clasificación de acuerdo con lo establecido en la NOM-021-SEMARNAT-2000.

Para este suelo se determinó una concentración de 11,464.5 ppm de HTP, un pH que lo clasifica como un suelo medianamente alcalino, normal para este tipo de suelo, un porcentaje muy alto de nitrógeno total y un contenido bajo de nitrógeno inorgánico, mientras que los contenidos de fósforo y de materia orgánica son clasificados como medio. El contenido de materia orgánica se debe en parte a la cantidad de HTP presente en la muestra. El contenido de humedad por el método Dean-Stark fue de 10%.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica del suelo y su clasificación de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000.

Parámetro	Resultado	Clasificación
pH	7.6	MEDIANAMENTE ALCALINO
Nitrógeno Total %	2.5	MUY ALTO
Nitrógeno Inorgánico PPM	14.6	BAJO
Materia Orgánica %	3.1	CLASE MEDIA
Fósforo $\frac{mg\ P}{kg\ de\ suelo}$	11.1	MEDIO
Humedad %	10	
Hidrocarburos totales de petróleo (ppm)	11,464.5 ± 59.2	

Propagación de las cepas en el soporte

El crecimiento de las seis cepas sobre bagazo fue visible a los 5 días de ser inoculadas, se observó que las cepas HBG, HBC7 y F mostraron un crecimiento abundante cubriendo la mayor parte de la superficie del soporte (Figura 2). Las otras cepas HBC9, M1H5 y HBC12 mostraron un buen crecimiento pero necesitaron de alrededor de 10 días para cubrir el soporte en la misma proporción que las tres anteriores.

Al final de la etapa de propagación, todas las cepas presentaron un buen crecimiento en el bagazo. Las cepas HBG, HBC7 y F fueron las que mostraron el mejor crecimiento en el soporte durante esta etapa.

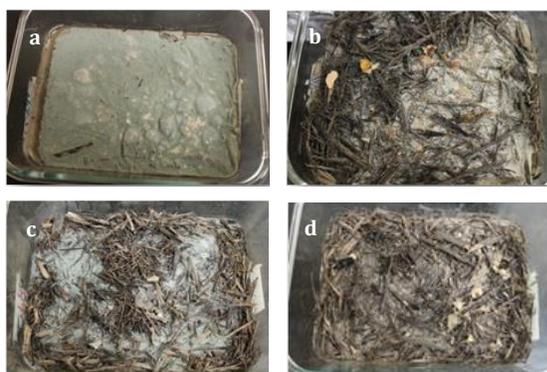


Figura 2. Crecimiento de las cepas en bagazo a los 5 días (a) HBG, (b) HBC7, (c) F y (d) HBC12.

Biorremediación del suelo

En la primera semana de tratamiento se observó un evidente crecimiento de las cepas HBG, HBC7 y M1H5. Las cepas F, HBC9 y HBC12 mostraron un crecimiento menor comparado con las anteriores.

En la figura 3 se muestran los resultados del proceso de biorremediación de las seis cepas durante las 6 semanas de tratamiento. Como se observa las cepas HBC7, M1H5, y F tuvieron la mayor actividad durante las 2 primeras semanas logrando una remoción de HTP de 34.2, 29.5, y 23.9%, respectivamente. La cepa HBC9 en las dos primeras semanas no mostró ninguna degradación, sin embargo en las siguientes cuatro semanas alcanzó un 31.1% de remoción de HTP. Al final del tratamiento la cepa HBC7 fue la que logró la mayor remoción de HTP, con un porcentaje del 38.6.

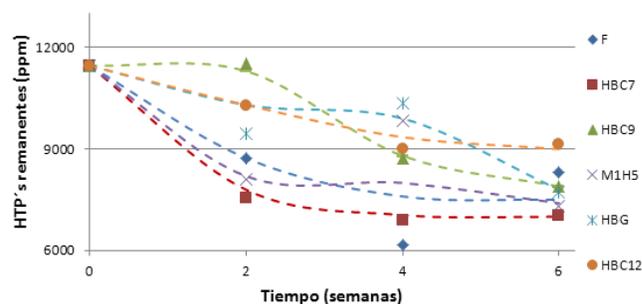


Figura 3. Hidrocarburos remanentes en los procesos de biorremediación.

Como lo muestra la tabla 2, la cepa HBC7 fue la que alcanzó la mejor remoción de HTP, 38.6%, seguida por la cepa M1H5 con un 36.3%. Estas cepas mostraron un buen crecimiento durante el proceso de biorremediación por lo que sería importante poner atención a estas cepas para futuros proyectos.

Tabla 2. Porcentajes de remoción de HTP's después de 6 semanas de tratamiento.

Cepas	% de Degradación	HTP's Remanentes (ppm)
F	27.5	8306.8
HBC7	38.6	7035.9
HBC9	31.1	7896.0
M1H5	36.3	7305.1
HBG	32.6	7727.4
HBC12	20.2	9143.8



Conclusiones

El suelo presentó un pH con valores correspondientes a un suelo normal, un porcentaje de nitrógeno total muy alto y el contenido de fosforo fue clasificado como clase media de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000, características favorables para el desarrollo de las cepas.

Las seis cepas de hongos evaluadas fueron capaces de crecer en el suelo contaminado con hidrocarburos, también fueron capaces de remover parte de los HTP's presentes, siendo las cepas HBC7, M1H5, HBG y HBC9 las que presentaron los mayores porcentajes de remoción: 38.6, 36.3, 32.6 y 31.1%, respectivamente.

Se observó una relación directa entre el crecimiento del micelio en el bagazo, de las cepas HBG y HBC7 y su capacidad de degradación, ya que con ellas se obtuvieron los mejores resultados. Aun cuando no se observó el mismo crecimiento en bagazo de las cepas HBC9 y M1H5, su capacidad de remoción de HTP fue comparable con las dos cepas mencionadas anteriormente.

Se mencionan algunas recomendaciones para futuros proyectos en biorremediación de suelos con hidrocarburos:

- Aumentar el tiempo de desarrollo de los hongos en el bagazo, para favorecer la síntesis del sistema enzimático degradador, lo cual ocurre cuando los hongos crecen previamente en un sustrato de apoyo, realizándose el proceso llamado co-metabolismo.
- Mantener la humedad a un nivel adecuado tanto en el soporte como en el suelo, ya que se comprobó que es un factor determinante tanto para el desarrollo de las cepas como para el proceso de biorremediación.
- Ya que de acuerdo a las referencias consultadas, se han reportado tiempos del proceso mayores de seis semanas, se recomienda prolongar el tiempo del tratamiento hasta por 8 semanas, para determinar si el porcentaje de remoción aumenta y la cantidad de HTP remanentes son inferiores a los límites establecidos en NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.
- Considerar en un futuro, el estudio de la aplicación de las cepas combinadas en un consorcio para comprobar un efecto de sinergia, ya que todas tuvieron un cierto porcentaje de degradación de HTP's.

Referencias

Briseño M.M. (2012). Aplicación de hongos degradadores de madera para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Proyecto Terminal en Ingeniería Ambiental, Universidad Autónoma Metropolitana Azcapotzalco, México.

Castaños N.A. (2013). Remediación de un suelo contaminado con hidrocarburos mediante la técnica de bioaumentación. Proyecto Terminal en Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana Azcapotzalco, México.

Cruz C.M.R., Cuevas D.M.C., Sánchez D.L.F., Rodríguez S. J., Alamina N.G., Castañeda B.M.T., Ávila J.M., García F.F. (2011). Perfil microbiano durante el proceso de composteo de hidrocarburos adicionando residuos de caña de azúcar. 20 Conferencia de Química. Cuba.

Departamento de estudios y análisis de plaguicidas IICA. (1988). Manual de métodos analíticos de formulaciones de plaguicidas. México D.F. Serie de Publicaciones Misceláneas.

Fernández L.L.C.; Rojas A.N.G., Roldán C.T.G. Ramírez I.M. E.; Zegarra M.H.G., Uribe H.R., Reyes Á.R.J., Flores H.D., Arce O.J.M. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. México.

Haritash A.K., Kaushik, C.P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, 169: 1-15.

Juárez D.O.G. (2014). Estudio del efecto del pH en la degradación de hidrocarburos en suelo con hongos. Proyecto de Integración en Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana Azcapotzalco, México.

Manahan S.E. (2007). Introducción a la Química Ambiental. Ediciones Reverté. 1ª Edición. México.

NOM-021-SEMARNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.

NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación.

Wang C., Sun H., Li J., Li Y., Zhang Q. (2009). Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in soils. *Chemosphere*, 77: 733-738.