



Ensayo de biorremediación asistida de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo en la Patagonia Sur de la Argentina

Por **Ing. Carlos Moreno Andrade** e
Ing. Livio Daniel Gismondi, Petrobras Energía S.A.

Trabajo seleccionado por el Comité Organizador del 1.º Congreso Latinoamericano y 3.º Nacional de Seguridad, Salud Ocupacional y Medio Ambiente.

Utilizando experiencias con bacterias sicrotolerantes realizadas en zonas de bajas temperaturas como la Antártida, se realizó un ensayo de biorremediación asistida en un yacimiento con suelos contaminados en la provincia de Santa Cruz.

Las experiencias realizadas utilizando bacterias para la degradación de hidrocarburos de petróleos en suelos son variadas. La biorremediación es una herramienta efectiva para mejorar la degradación de contaminantes en suelo.

Ensayos como los realizados en la Antártida, utilizando bacterias sicrotolerantes, demostraron una importante eliminación abiótica de los contaminantes que osciló entre el 40% y el 60% de las cargas iniciales, los resultados que se obtuvieron fueron favorables también para suelos con contaminación aguda y sistemática.

Teniendo como base esta información, se realizó en el yacimiento Campo Boleadoras, en la provincia de Santa Cruz, operado por Petrobras Energía S.A., un ensayo de biorremediación utilizando 1000 m³ de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. La finalidad de este ensayo fue revalidar la eficiencia de la técnica de tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburo por biorremediación asistida en zonas de bajas temperaturas. La prueba se realizó utilizando microorganismos aeróbicos, con el predominio de bacterias del género *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Artrobacter*, *Bacillus*; protozoos y hongos del género *Aspergillus* y *Oidium*.

El ensayo se inició a finales del verano de 2009 para evaluar la respuesta del tratamiento en la condición climática más adversa que se puede presentar en el área de estudio. Entre los meses de abril y agosto, con temperaturas promedio de 3,4 °C, se alcanzó una disminución de la concentración de contaminantes aproximada del 62,77%, lo que corroboró los resultados obtenidos a bajas temperaturas en la región antártica.

Primeros pasos

En 1922 se inició la actividad de explotación de hidrocarburos en el sur de la provincia de Santa Cruz. Debie-

ron transcurrir 71 años para la entrada en vigencia de la primera norma de regulación ambiental, una condición particular que permitió la acumulación de suelos contaminados con hidrocarburos en el transcurso del tiempo.

En virtud de esta problemática, se iniciaron tareas de investigación para aplicar técnicas de remediación que permitieran revertirla, teniendo como premisa la aplicación de métodos sustentables desde el punto de vista técnico y económico, dado que la ubicación de los yacimientos en la zona sur de la provincia se caracterizan por la dispersión geográfica, el clima adverso y la heterogeneidad de los suelos.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la eficiencia del método de biorremediación asistida utilizando microorganismos aeróbicos y priorizando su realización in situ.

Desarrollo

Metodología: etapas del tratamiento

El ensayo se inició en febrero de 2009 con un volumen de suelo aproximado de 1000 m³ proveniente de distintos yacimientos de la operación de Petrobras Energía S.A., con el fin de evaluar el comportamiento de la biorremediación en la condición climática más adversa de la zona (entre los meses de abril y agosto, con temperaturas promedio de 3,4 °C).

Para la realización del tratamiento se utilizó un predio adecuado bajo las exigencias del Decreto Reglamentario 712, Anexo X de la Ley Provincial N.º 2567 Residuos Peligrosos.

El suelo contaminado se distribuyó en un espesor de aproximadamente 30 a 40 cm, utilizando maquinaria agrícola (tractor con implementos: arado y pala niveladora) y permitiendo el secado del suelo por exposición de su superficie al aire y al sol con el fin de obtener su homogeneización.



Una vez que el suelo fue mezclado y homogeneizado, con un valor óptimo de humedad, se procedió a su trituration para lograr el tamaño de partícula adecuado para el armado de las biopilas, las cuales fueron armadas en capas sucesivas de 20 a 30 cm de espesor de suelo contaminado, aplicando nutrientes (fósforo y potasio) en forma de fertilizante y una inoculación con biopreparados mediante riego, hasta lograr su altura y geometría definitivas.



Se construyeron 4 biopilas hasta totalizar un volumen aproximado –de acuerdo con el esponjamiento inicial– de 1.100 m³. A los efectos de mantener la oxigenación y los valores de humedad óptimos para el proceso y el desarrollo de los microorganismos activos, se procedió al riego con inóculo bacteriano de las biopilas, con frecuencia semanal.

Con la premisa de no incorporar especies foráneas, se realizó la determinación cuantitativa de microflora autóctona. La población promedio de los microorganismos se encontró entre $2,5-5,5 \times 10^5$ y $1,3-3,4 \times 10^4$ ejemplares.

Debido a la compactación paulatina originada en las operaciones de riego, se realizaron 3 aperturas y volteo previo al período invernal, lo cual devolvió a la masa de suelo el esponjamiento y la capacidad de oxigenación de la biomasa.



Muestreo

Se realizaron seis muestreos con una frecuencia mensual, se extrajeron 44 muestras en cada uno para la determinación de los siguientes parámetros:

- Hidrocarburos totales de petróleo mediante técnica EPA 418.1 (a todas las muestras).
- Todos los analíticos de la Tabla 9 del Anexo II del Decreto 831/93 Reglamentario de la Ley N.º 24.051 de Residuos Peligrosos que indica los niveles guía de calidad de suelos para diferentes usos (en el muestreo inicial a un *pool* conformado por cada biopila, luego un *pool* conformado por todas las muestras y solamente aquellos analitos que hayan dado en el muestreo inicial valores por encima del límite para uso agrícola).

Las concentraciones iniciales de hidrocarburos en suelos rondaron un promedio del 7,2%, 7,9%, 6,0% y 4,7% para las biopilas 1, 2, 3 y 4 respectivamente.

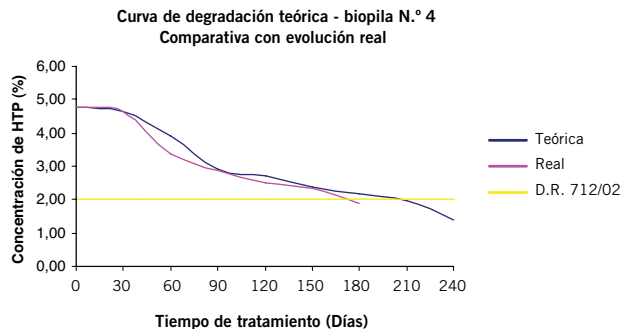
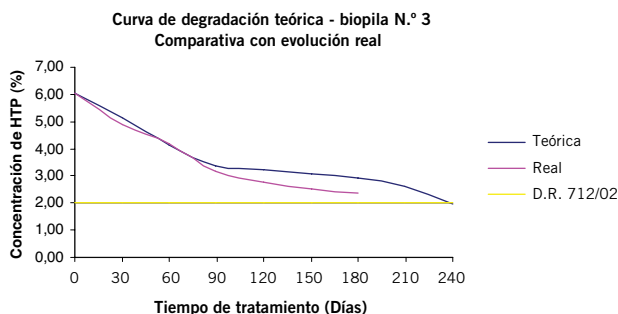
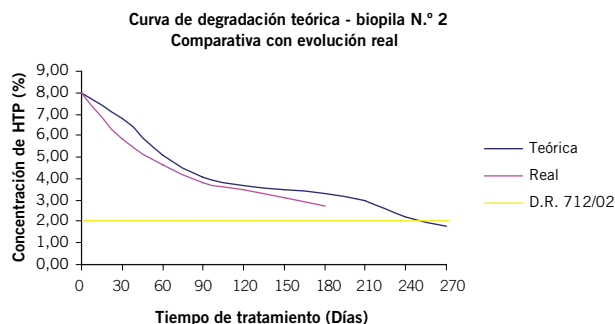
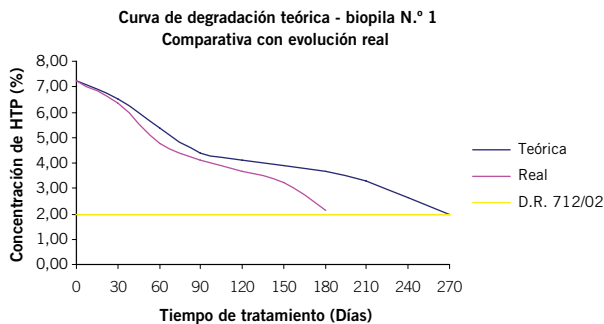


Se observó el desarrollo de colonias de hongos autóctonos en dos de las cuatro biopilas, distribuidas en toda la masa de suelo. Para su desarrollo, estos hongos requieren de condiciones mucho más rigurosas que los microorganismos que conforman el inóculo, por lo que se presumió que el desarrollo bacteriano era óptimo, presunción que espera confirmarse mediante el análisis microbiológico del suelo.



Evolución de la degradación

En los siguientes gráficos se puede apreciar el avance de la biorremediación durante 180 días de tratamiento, observando en el intervalo de 90 a 180 días la degradación de hidrocarburo que corresponde al período invernal del año 2009, donde la temperatura promedio fue de 3,4 °C.



Validación de la información

Dada la cantidad de muestras realizadas durante los primeros 150 días de tratamiento, se procedió a realizar un análisis para establecer si la media aritmética de concentraciones de cada biopila era una variable representativa de su estado real, y cuál era el grado de certidumbre acerca del avance de la degradación en función de los resultados obtenidos.

Para ello se realizó un procedimiento de análisis de varianza –Anova– que utiliza una sola variable numérica, medida en los elementos de la muestra para probar la denominada *hipótesis nula de igualdad de medias poblacionales*. Para nuestro caso, esta variable es la concentración de hidrocarburos totales de petróleo.

La hipótesis nula que se prueba en el Anova es que las poblaciones que se estudian tienen el mismo valor de la media (μ) para la variable dependiente. La hipótesis nula (H_0) en Anova es:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 \dots = \mu_n$$

En la prueba Anova se reúne evidencia muestral de cada población bajo estudio y se usan estos datos para calcular un factor estadístico muestral, F . Después se lo compara con un factor estadístico muestral crítico, F_C . Si $F < F_C$, se contradice la hipótesis nula y se rechaza; de lo contrario se acepta.

En el caso bajo estudio, las representaciones materiales de los términos estadísticos mencionados son las siguientes:

Tabla 1. Análisis de varianza. Biopila 1. Avance de proceso a los 30 días de tratamiento.

Resumen						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Concentración inicial HTP	12	86,918	7,243166667	3,196065788		
Concentración HTP a 30 días	12	76,362	6,3635	4,383054636		
Análisis de varianza						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4,642880667	1	4,642880667	1,225176645	0,280303592	14,38025502
Dentro de grupos	83,37032467	22	3,789560212			
Total	88,01320533	23				

- Variable numérica medida: concentración de hidrocarburos totales de petróleo en el suelo bajo tratamiento.
- Muestra: la totalidad de los resultados analíticos de las muestras de suelo.
- Población de datos: los resultados analíticos de las muestras de suelo obtenidos en cada muestreo mensual.
- Media poblacional: promedio de concentraciones de HTP de cada biopila determinado en función de los muestreos mensuales.

En términos reales, el análisis de Anova permitió establecer que los promedios de concentración mensuales de cada biopila son un parámetro acertado para calcular el avance en el proceso, con un error del 0,01%. Se presentan a continuación, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos para la biopila N.º 1, que son similares a los obtenidos para las demás biopilas.

La hipótesis nula en este caso es que los promedios de concentración son suficientemente diferentes al inicio del tratamiento comparados con los resultados obtenidos a los días de tratamiento considerados en cada caso, como para estimar válido el avance desde el punto de vista estrictamente estadístico.

Primer caso de estudio: avance inicial del proceso

Se consideraron los resultados obtenidos en el muestreo correspondiente a los primeros 30 días de tratamiento respecto a los resultados iniciales.

Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 1.

El valor de F resultó menor que el valor crítico para F, por lo tanto, la hipótesis se descartó, y el avance del proceso debió ser reconsiderado.

El proceso en este período no ha sido del todo efectivo. Esta es una cuestión lógica y puede ocurrir debido a que el inóculo de bacterias atravesó durante este período una fase estacionaria de adaptación (*lag phase*), en la cual se están sintetizando las nuevas enzimas y rutas metabólicas para poder biodegradar los hidrocarburos.

Segundo caso de estudio: avance del proceso a los 60 días

Se consideraron los resultados obtenidos en el muestreo correspondiente a los primeros 60 días de tratamiento respecto de los resultados iniciales.

Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 2.

El valor de F resultó mayor que el valor crítico para F, por lo tanto, la hipótesis se comprobó y el avance del proceso se consideró válido.

La biodegradación de los hidrocarburos comenzó a generar una disminución en su concentración. A diferencia del período anterior considerado, se puede aseverar con un 99,99% de certeza que el avance fue del 34,53%. Esto es esperable, ya que se superó la fase estacionaria de adaptación y los microorganismos se encuentran mejor adaptados a este tipo de suelos, y que las nuevas enzimas y rutas metabólicas empiezan a ser

Tabla 2. Análisis de varianza. Biopila 1. Avance de proceso a los 60 días de tratamiento.

Resumen						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Concentración inicial HTP	12	86,918	7,243166667	3,196065788		
Concentración HTP a 30 días	12	76,362	6,3635	4,383054636		
Concentración HTP a 60 días	12	56,9035	4,741958333	1,716288748		
Análisis de varianza						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	38,63701579	2	19,3185079	6,234854498	0,005047358	5,451754985
Dentro de grupos	102,2495009	33	3,098469724			
Total	140,8865167	35				

Tabla 3. Análisis de varianza. Biopila 1. Avance de proceso a los 150 días de tratamiento

Resumen				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Concentración inicial HTP	12	86,918	7,243166667	3,196065788
Concentración HTP a 30 días	12	76,362	6,3635	4,383054636
Concentración HTP a 60 días	12	56,9035	4,741958333	1,716288748
Concentración HTP a 90 días	12	49,43	4,119166667	1,302135606
Concentración HTP a 120 días	12	44,34	3,695	0,852281818
Concentración HTP a 150 días	12	38,945	3,245416667	0,541018265

Análisis de varianza						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	149,479199	5	29,8958398	14,9593328	8,4032E-10	4,69233427
Dentro de grupos	131,8992935	66	1,998474144			
Total	281,3784925	71				

utilizadas por las diferentes especies incorporadas a través del inóculo bacterianas.

Tercer caso de estudio: avance del proceso a los 150 días

Se consideraron los resultados obtenidos en el muestreo correspondiente a los primeros 150 días de tratamiento respecto a los resultados iniciales.

Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 3.

El valor de F resultó mayor que el valor crítico para F, por lo tanto, la hipótesis se comprobó y el avance del proceso se consideró válido.

En forma análoga al caso anterior, se puede establecer con un 99,99% de certeza que el avance del proceso es del 55,19% de degradación.

Si se observan los valores de F y F_{c} , se percibe que la diferencia es mucho mayor que en el caso anterior. Esto implica una mayor certeza y un proceso más acentuado de degradación.

Desler S.A., Informe de Avance, julio de 2009.

Desler S.A., Informe de Avance, agosto-septiembre de 2009.

Desler S.A., Informe de Avance, octubre de 2009.

Desler S.A., Informe de Avance, noviembre de 2009.

Lucas y col., *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando bacterias antárticas sicrotolerantes*, 2008.

Conclusiones

- Se alcanzó una disminución de la concentración de contaminantes del 62,77%, lo que corrobora los resultados obtenidos a bajas temperaturas en la región antártica.
- En función de los resultados alcanzados en el ensayo realizado, se demuestra la eficiencia de la técnica de biorremediación asistida en la zona sur de la provincia de Santa Cruz, Argentina. ■

Bibliografía

Desler S.A., Propuesta Técnica Tratamiento de Suelos, agosto de 2008.

Desler S.A., Informe de Avance abril de 2009.

Desler S.A., Informe de Avance, mayo de 2009.

Desler S.A., Informe de Avance, junio de 2009.

Los autores de este trabajo quieren agradecer al Ing. Darío Edgardo Dube (de Petrobras Energía S.A), al Ing. Carlos Dingenan (Desler S.A.), al Ing. Agr. Mario Abel Díaz (de la Secretaría de Medio Ambiente de la Provincia de Santa Cruz) y a la Ing. Alejandra Wladimirsky (de la Secretaría de Medio Ambiente de la Provincia de Santa Cruz).