

REMEDIACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS MEDIANTE OXIDACIÓN QUÍMICA Y COMPOST

Medina, R ^{1,2}; Di Clemente, N ¹ ; Rosso, J A ² y Del Panno, M T ^{1,*}

¹ CINDEFI (UNLP-CONICET). ² INIFTA (UNLP-CONICET).

*Autor de contacto: E-mail: tere@biol.unlp.edu.ar . Calle 50 y 115 N° 227, CP 1900. La Plata, Buenos Aires; Argentina. 54 0221 4843794

RESUMEN

La biorremediación tiene gran aceptación en la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos a pesar de sus limitaciones cuando se trata de mezclas complejas con policíclicos aromáticos (PAH), como la baja velocidad de biodegradación y baja biodisponibilidad. La bioestimulación con compost maduro, y la oxidación química directa del suelo son estrategias que podrían favorecer la accesibilidad al PAH, promoviendo su degradación. Con el fin de estudiar el efecto combinado de ambas estrategias, fueron preparados microcosmos de suelo crónicamente contaminado con PAHs (270ppm) para evaluar el efecto del agregado de compost (3g:7g); de la oxidación con persulfato de amonio y la acción combinada de oxidación y posterior estimulación con compost. El tratamiento oxidativo consistió en 3 aplicaciones del oxidante (3,5g%), con 24% de humedad a 30°C. Los microcosmos fueron incubados a 25°C durante 30 días. El suelo en estudio evidenció alta densidad de poblaciones bacterianas pero no actividad deshidrogenasa. La estimulación con compost incrementó la actividad deshidrogenasa y redujo parcialmente la toxicidad del sistema, sin disminuir significativamente la concentración total de PAHs. El tratamiento oxidativo redujo significativamente la concentración de PAHs y la densidad de poblaciones microbianas, aumentando la toxicidad. El posterior agregado de compost recuperó las poblaciones microbianas sin reducir los índices de toxicidad respecto del suelo original. La recuperación biológica, aunque parcial, dado que la actividad deshidrogenasa aumentó solo un 10% respecto de la bioestimulación, fue correspondida con un 70% de eliminación de PAH en 30 días.

PALABRAS CLAVE

Remediación; Hidrocarburos; Suelo.

INTRODUCCION

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH), son contaminantes ambientales ubicuos, principalmente producidos por fuentes antropogénicas, incluyendo la combustión incompleta de combustibles fósiles y biomasa, el tráfico vehicular y la liberación de productos del petróleo y sus derivados (Wang y col., 2009). Los PAH no solo constituyen un riesgo para el hombre y los animales, debido a sus propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas, sino que implican un riesgo potencial para el ecosistema de suelo (Pieper, S., 2004).

La biorremediación tiene gran aceptación como tratamiento para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos (Pandey y col., 2009). Sin embargo, el proceso tiene una aplicabilidad limitada cuando se trata de suelos contaminados con mezclas complejas de PAH, altamente hidrofóbicos. La baja solubilidad, conjuntamente con la tendencia a adsorberse a la materia orgánica del suelo, afectan directamente la biodegradación de los PAH, debido a la reducida transferencia de masas desde la matriz

de suelo hacia la interfase acuosa donde es asequible a los microorganismos, condicionando la biodisponibilidad del contaminante (Semple y col., 2007).

La oxidación química es una estrategia que ha sido considerada efectiva para superar las limitaciones de la biorremediación. El conjunto de técnicas que utilizan la inyección de oxidantes fuertes para remediar suelos y aguas contaminadas ha sido denominado ISCO (*in-situ* Chemical Oxidation). Entre los oxidantes más utilizados se encuentra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión permanganato (MnO_4^-) y el anión persulfato ($S_2O_8^{2-}$) (Huling y Pivetz, 2006). Estos oxidantes pueden transformar los contaminantes orgánicos en productos menos peligrosos y en algunos casos llegar hasta su degradación total generando H_2O y CO_2 (Chen y col., 2009).

La combinación de las ISCO con tratamientos de biorremediación ha sido aplicada en la recuperación de suelos contaminados (de Souza E Silva y col., 2009). La técnica de oxidación directa puede modificar la disponibilidad del PAH promoviendo su degradación (Fukushima y col., 2003), dependiendo su eficiencia de las propiedades del suelo y de las características de los PAHs contaminantes (Lemaire y col., 2013). Sin embargo los efectos colaterales de los procesos de oxidación sobre las propiedades biológicas del suelo han sido solo parcialmente estudiados a través de ensayos de toxicidad de los productos generados durante el tratamiento (Palmroth y col., 2006) y existe escasa la información respecto del impacto de este tipo de tratamiento sobre la diversidad de la comunidad microbiana del suelo y su funcionalidad (Mora y col., 2014). La eficiencia de la acción combinada de las técnicas ISCO con biorremediación aplicada a suelos crónicamente aun esta en discusión dada la diversidad de suelos y los casos de contaminación.

En este contexto el trabajo propone investigar el efecto combinado de la estimulación con compost maduro y oxidación con persulfato en la remediación y recuperación biológica de un suelo crónicamente contaminado con PAHs.

MATERIALES Y METODOS

Suelo. El suelo de textura franco, crónicamente contaminado fue recolectado de un predio petroquímico de la región La Plata-Ensenada. El material fue tamizado (3 mm) y acondicionado mediante riego.

Oxidación del suelo contaminado. Una porción de suelo crónicamente contaminado fue tratado con persulfato de amonio según 3,33 g de oxidante/100 g de suelo seco. El oxidante se agregó en tres veces, cada 3 días, por aspersión sobre la tierra incubada a 30°C.

Estimulación con compost maduro- Bioestimulación. Se evaluó el efecto de un único agregado de compost maduro sobre la tierra tratada y sin tratar. En base a estudios previos, se seleccionó la proporción 7g suelo seco: 3 g compost seco.

Microcosmos. Fueron preparados tres sistemas por tratamiento, evaluando la biodegradación del suelo original (SB), la estimulación (SE), la oxidación (SOx) y la estimulación post oxidación (SOxE) durante 30días a 25°C, con monitoreos semanales.

Determinaciones físicas y químicas. Periódicamente fueron determinados el pH, conductividad y potencial redox. Se determinó la concentración de hidrocarburos en suelo (Alifáticos y PAH) luego del tratamiento mediante GC-FID. Brevemente, 5 g de

suelo se mezclaron con 10 g de sulfato de sodio anhidro. La extracción se realizó de acuerdo al método 3550B. Los extractos fueron inyectados en un cromatógrafo gaseoso Clarus 500 para su análisis y contrastados contra patrones de concentración conocida. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Determinaciones microbiológicas. Se realizó el recuento de bacterias heterótrofas en agar R2 (Reasoner & Geldreich, 1985), bacterias degradadoras de PAHs mediante el número más probable (Wrenn, B. & Venosa, A. 1996) y recuento de hongos en agar Rosa de Bengala (Vecchioli y col., 1990). Se completó la caracterización con el recuento bacterias solubilizadoras de fósforo inorgánico (Figueiredo de Vasconcellos y col., 2010), luego de los tratamientos.

Se evaluó la actividad deshidrogenasa (Thalman A., 1968). Unos 5 g de muestra fueron incubados durante 24 h con cloruro de trifenil tetrazolio (TTC) en buffer TRIS-HCl pH 7,4. Luego de la incubación, la reacción se detuvo agregando 40 mL acetona y agitando a intervalos durante las dos horas de extracción. Se determinó la absorbancia a 546nm correspondiente al trifenil formazan (TPF) producido.

Toxicidad aguda. Se determinó de la toxicidad residual en suelo a través del test de germinación de semilla (*L. sativa*) (US EPA 712-C-96-154. (OPPTS 850.4200), 1996) evaluando el porcentaje de inhibición en la germinación y en la elongación radicular.

$$IG\% = \frac{(Gc - Gn)}{Gc} * 100 \quad IE\% = \frac{(Lc - Ln)}{Lc} * 100$$

Donde Gn es el número de semillas germinadas por dilución; Gc es el número de semillas germinadas en el control; Ln es el promedio de longitud de la dilución y Lc es el promedio de longitud radicular del control.

RESULTADOS Y DISCUSION

El suelo en estudio presentó una concentración de PAH de 274,21±80 ppm con predominio de fenantreno y pireno. El análisis fisicoquímico evidenció un suelo franco, con pH ligeramente alcalino, 3,78% de materia orgánica y 181±70 µS de conductividad. Los valores de población bacteriana heterótrofa, degradadora de PAH y fúngica fueron 4,27.10⁷; 3,6.10⁵ y 6.10⁵ UFC/gss respectivamente, indicando la presencia de poblaciones potencialmente activas. No fue detectada la presencia de poblaciones solubilizadoras de fosfato. No fue detectada actividad deshidrogenasa, probablemente debido a la cronicidad de la contaminación. Es importante destacar que la actividad deshidrogenasa revela el estado de toda la comunidad microbiana, mientras que los recuentos estiman solo poblaciones cultivables.

En el ensayo de toxicidad se apreció un 50% de inhibición de la germinación y la formación de raíces más largas, pero más finas y enredadas que el control, demostrando un efecto fitotóxico.

Durante la incubación del suelo original (SB), no se evidenciaron cambios en las poblaciones bacterianas ni en la actividad deshidrogenasa (Figs. 1 y 2). El descenso del índice de germinación y de elongación no se correspondió con un normal desarrollo de las raíces, evidenciado un claro efecto fitotóxico (Fig. 3), y no se detectó reducción en la concentración de PAHs.

Tabla 1: Propiedades del suelo original, y luego de los tratamientos

Propiedades	Tratamientos					
	SCC	SB (d30)	SE (d30)	SOx (d0)	SOx (d30)	SOxE (d30)
pH	8.4 (0.1)	7.4 (0.1)	7.9 (0.1)	7.0 (0.1)	7.48 (0.1)	7.26 (0.13)
Potencial redox (mV)	238 (14)	244.4 (11)	221.7 (1.3)	340.8 (0.8)	193.9 (6.3)	189.0 (8.2)
PAH (ppm)	270 (80)	280 (70)	210 (3)	200 (30)	164 (24)	76 (30)

Referencias: SCC (suelo crónicamente contaminado); SB (suelo biodegradado); SE (suelo estimulado); SOx (suelo oxidado); SOxE (suelo oxidado y estimulado). Valores promedio de tres determinaciones; entre paréntesis, desvío estándar.

La estimulación con compost maduro (SE) no produjo cambios significativos en la densidad de poblaciones bacterianas manteniéndose en los valores iniciales durante todo el ensayo. (Fig. 1). La actividad deshidrogenasa aumentó significativamente luego de la estimulación (Fig. 2), aunque no se correspondió con un descenso en la concentración total de PAHs (Tabla1). Sin embargo, se observó una significativa disminución en la concentración de fenantreno (41.4%). El agregado de compost no produjo cambios significativos sobre la toxicidad del suelo tratado (Fig.3).

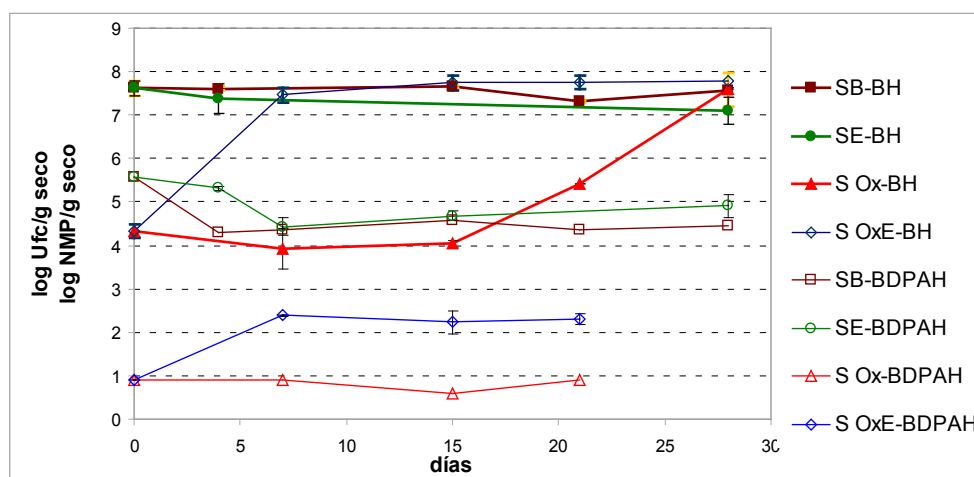


Figura 1: Evolución de las poblaciones bacterianas heterótrofas (BH) y degradadoras de PAH (BDPAH) durante los tratamientos.

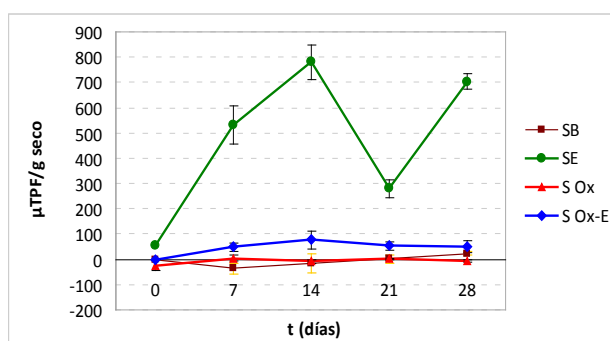


Figura 2: Evolución de la actividad deshidrogenasa durante los tratamientos.

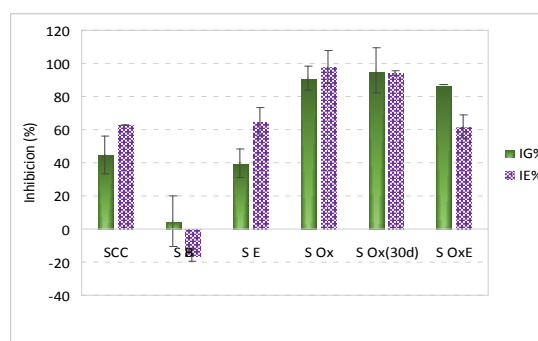


Figura 3: Toxicidad de los extractos de suelo luego de los tratamientos. IG%, inhibición de germinación; IE% inhibición de elongación de la raíz.

La bioestimulación del suelo implica la incorporación de materia orgánica fácilmente degradable y una comunidad asociada con el fin de estimular la actividad degradadora de la comunidad autóctona, siendo la biodisponibilidad del contaminante uno de los factores limitantes (Plaza y col., 2009). Considerando la relativamente alta densidad de poblaciones y la baja eficiencia de eliminación de PAHs por el tratamiento de bioestimulación, es probable que la actividad biológica observada fuera principalmente a expensas de la materia orgánica fácilmente asimilable, no logrando un significativo incremento de la biodisponibilidad de los PAHs contaminantes.

La oxidación del suelo contaminado con persulfato (SO_x) redujo ligeramente el pH y aumentó significativamente su conductividad (921 μ S). Se evidenció un significativo descenso de las poblaciones bacterianas heterótrofas y degradadoras, en aproximadamente 3 y 4 órdenes de magnitud, respectivamente, Fig.1. La toxicidad del suelo resultó significativamente incrementada por la oxidación, no evidenciándose una eliminación significativa de PAHs. Luego de 15 días de incubación, la población heterótrofa aumentó progresivamente hasta alcanzar el valor correspondiente al SB, sugiriendo la selección y establecimiento de poblaciones autóctonas adaptadas a la nueva condición de la matriz. Sin embargo no se detectaron cambios en la actividad deshidrogenasa, Fig. 2. Luego de 30 días de incubación la toxicidad no evidenció cambios significativos, sin embargo el porcentaje de eliminación de PAH alcanzó un 40%. La estimulación con compost del suelo recientemente oxidado (S OxE) permitió la recuperación de la población heterótrofa en una semana. Sin embargo, la actividad deshidrogenasa aumentó solo un 10% de lo alcanzado en el microcosmo SE, evidenciando un efecto inhibitorio de la matriz oxidada sobre la actividad enzimática, que no fue neutralizado por el agregado del compost. Finalmente, el tratamiento de estimulación post oxidación logró una eliminación de PAHs del 70% en 30 días, sin cambios significativos en los índices de toxicidad respecto del suelo original, pero sí reduciendo el porcentaje de inhibición de raíz, que fuera significativamente aumentado por la oxidación.

CONCLUSION

Las propiedades del suelo, destacando su historia previa de contaminación, son factores determinantes en los tratamientos de remediación. El suelo en estudio no evidenció actividad deshidrogenasa, probablemente debido al tipo de contaminación crónica de PAH y al bajo contenido de materia orgánica. La estimulación con compost maduro resultó efectiva, aunque inespecífica, reduciendo parcialmente la toxicidad del sistema sin disminuir significativamente la concentración total de PAHs.

El tratamiento oxidativo aplicado, redujo significativamente la concentración de PAH, con un drástico descenso de poblaciones microbianas, que pudo ser recuperado rápidamente luego de la incorporación de compost. Esta recuperación biológica, aunque parcial, fue correspondida con una eficiente eliminación de PAH en 30 días. Considerando que, los comparativamente mayores índices de toxicidad producidos por la oxidación son indicadores de nuevos compuestos en la matriz, un mayor tiempo de incubación podría conducir eventualmente, a la selección y establecimiento de nuevas comunidades activamente degradadoras.

REFERENCIAS

- Chen, Ch., Wub, P., Chung, Y(2009). Coupled biological and photo-Fenton pretreatment system for the removal of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) from water. *Bioresource Technology*, 100: 4531–4534.
- De Souza E Silva PT, Valdinete Lins Da Silva, B De Barros Neto, Marie-Odile Simonnot (2009). Phenanthrene and pyrene oxidation in contaminated soils using Fenton's reagent. *Journal of Hazardous Materials*, 161 (2-3): 967-973.
- Figueiredo de Vasconcellos; Pinheiro da Silva; Ribeiro; Nogueira Cardoso (2010). Isolation and screening for plant growth-promoting (PGP) actinobacteria from *Araucaria angustifolia* rhizosphere soil. *Sci. Agric.* v.67, n.6, p.743-746.
- Fukushima M., Ichikawa H., Kawasaki M., Sawada A., Morimoto K., and Tatsumi K. (2003). Effects of humic substances on the pattern of oxidation products of pentachlorophenol induced by a biomimetic catalytic system using tetra (p-sulfophenyl)porphineiron(III) and KHSO₅. *Environ Sci Technol* 37:386–394.
- Huling S.G. and Pivetz B.E. (2006). In-situ Chemical Oxidation. USEPA/600/R-06/ 072, 28 July.
- Lemaire J, BuèsM, Kabeche T, Hanna K, SimonnotM-O (2013) Oxidant selection to treat an aged PAH contaminated soil by in situ chemical oxidation. *J Environ Chem Eng* 1:1261–1268
- Mora, V; Madueño, L; Peluffo, M; Rosso, J A; Del Panno, M T and Morelli, I S (2014). Remediation of phenanthrene-contaminated soil by simultaneous persulfate chemical oxidation and biodegradation processes. *Environ Sci Pollut Res* DOI 10.1007/s11356-014-2687-0
- Palmroth M., Langwaldt J., Aunola T., Goi A., Puhakka J. and Tuhkanen T (2006). Treatment of PAH-contaminated soil by combination of Fenton's reaction and biodegradation. *J Chem Technol Biotechnol* 81: 598–607.
- Pandey J., Chauhan A. and Jain R.K. (2009). Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of *in situ* bioremediation. *FEMS Microbiol Rev* 33: 324–375.
- Pieper S (2004) <http://opus.kobv.de/tuberlin/volltexte/2004/301/>.
- Plaza, C., Xing, B., Fernandez, J.M., Senesi, N., Polo, A (2009). Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by humic acids formed during composting. *Environ. Pollut.* 157, 257–263.
- Reasoner, D., Geldreich, E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol.* 49:1-7.
- Semple K.T., Doick K.J., Wick L.Y. and Harms H (2007). Microbial interactions with organic contaminants in soil: definitions, processes and measurement. *Environ Pollut* 150: 166–176.
- Thalman A (1968). Zur Methodik der bestimmung der dehydrogenaseaktivität im boden mittels triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) *Landwirtsch Forsch* 21:249–258.
- Vecchioli G., Del Panno M.T. y Pinceira M.T (1990). Use of selected autochthonous soil bacteria to enhance degradation of hydrocarbons in soil. *Environmental Pollution*, Vol. 67, p. 249-258.
- Wang K., Shen Y., Zhang S., Ye Y., Shen Q., Hu J. and Wang X (2009). Application of spatial analysis and multivariate analysis techniques in distribution and source study of polycyclic aromatic hydrocarbons in the topsoil of Beijing, China. *Environ Geol* 56:1041–1050.
- Wrenn, B.A., Venosa, A.D (1996). Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Canadian Journal of Microbiology*.