

## Biodegradabilidad de las fracciones de resinas y asfaltenos por pseudomonas en suelo impactado con crudo mediano

Celeste Fernández<sup>1</sup>, Massiel Silva<sup>1</sup>, Juan C. Pereira<sup>2</sup>, Auxilia Mallia<sup>1</sup>, María J. Llobregat<sup>1</sup>, Vanessa Altomare<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Químicas, Facultad de Ingeniería, Departamento de Química Tecnológica

<sup>2</sup>Laboratorio de Investigaciones, Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología, Departamento de Química,

Universidad de Carabobo, Valencia, Edo. Carabobo, Venezuela.

Email: cfernand@uc.edu.ve

### Resumen

La presente investigación describe el proceso de biorremediación de suelos contaminados con un crudo mediano aplicando la técnica ex-situ en bio-reactores y con microorganismos exógenos, así como la influencia de los factores bióticos y abióticos. La metodología a emplear consistió principalmente en la caracterización del suelo virgen y suelo contaminado con crudo mediano de 25 °API, proveniente del estado Apure y conocido como crudo Guafita y determinar si los parámetros están fuera de la normativa ambiental que contemplan los manejos y recuperación de desechos peligrosos, después de esto se dispuso las muestras en cuatro biorreactores para su posterior tratamiento, uno de ellos funciona como suelo patrón o blanco y los otros fueron tratados con medio mínimo surfactante (MMS) que aportan nutrientes a las bacterias. A las diferentes muestras se les evaluó la degradación de las resinas y asfaltenos, hidrocarburos de alto peso molecular y de baja volatilidad utilizando espectroscopia de infrarrojo donde los grupos funcionales en el tiempo de muestreo se fueron reduciendo, esto se debe a que las bacterias en presencia de MMS proporcionan los requerimientos necesarios para atacar a la fracción del petróleo. Otro de los resultados relevantes fue el peso molecular promedio de asfaltenos, por osmometría de presión de vapor, que presentó una significativa diferencia entre el valor obtenido para el crudo sin tratamiento (2500 g/mol) y el crudo biotratado analizado el último día de la experiencia (1900 g/mol). Los resultados obtenidos en el espectro de infrarrojo y en el análisis de osmometría de presión de vapor permitieron conocer los grupos funcionales presentes, así como la dispersión de las moléculas logrado al disminuir la asociación entre ellas.

**Palabras Clave:** Asfaltenos, resinas, biorremediación, osmometría de presión de vapor (VPO).

## Bio-degradability of resins and asphaltene fraction content in medium-crude impacted soil by using pseudomonas

### Abstract

This investigation describes the bio-remediation process of soils which have been contaminated with medium crude oils by using ex-situ methods in bio-reactors with the help of exogenous microorganisms, as well as the influence of biotic and biotic factors. The methodology to use consisted mainly on the characterization of the virgin floor and polluted floor with raw medium of 25 °API, coming from the state Apure and well-known as raw Guafita and to determine if the parameters are outside of the environmental regulatory scheme that contemplate the handlings and recovery of dangerous waste, after this were prepared the samples in four biorreactores for later treatment, one of them works like patron or white floor and the other were treated with half minimum surfactante (MMS) that contribute nutritious to the bacterias. To the different samples they were evaluated the degradation of the resins and asphalt us, low volatility and high molecular weight hydrocarbons using infrared espectroscopia where the functional groups in the time of sampling were decreasing, due to that the bacterias in presence of MMS provide the necessary requirements to attack to the fraction of the petroleum. Another of the outstanding results was the molecular weight average of asphalts us, for steam pressure osmometry that presented a significant difference among the obtained value for the raw one without treatment (2500 g/mol) and the raw biotratado analyzed in the last day of the experience (1900 g/mol). The results obtained in the infrared spectrum and the steam pressure osmometry analysis allowed to know the actual functional groups as well as the dispersion of the molecules as a result a lower association among them.

**Key Words:** Asphaltenes, resins, bio-remediation process, vapor pressure osmometry (VPO).

## 1. INTRODUCCIÓN

Cuando se produce un derrame de petróleo se crea una fuente de contaminación en el suelo, esto puede ocurrir en cualquiera de las fases del proceso como son perforaciones, transporte, manejo, consumo, etc. En la industria petrolera se realizan investigaciones sobre recuperación de suelos contaminados con crudos aplicando tecnologías limpias, una de las modalidades más utilizadas por estas, es la biorremediación vía landfarming o composting que permite sanar el suelo contaminado de sustancias orgánicas a través del uso de diversos microorganismos, hasta obtener compuestos menos tóxicos [1]. Debido a esto, se quiso evaluar el proceso de biorremediación de un crudo mediano de API 25 proveniente del estado Apure y la influencia de está en las posibles modificaciones estructurales de la molécula de resinas y asfaltenos. Las resinas están constituidas por compuestos piridinicos, quinolinas, tiofenos, carbazoles, sulfóxidos y aminas y la estructura de los asfaltenos incluyen los agregados de poli aromáticos, fenoles, ácidos grasos, metaloporfirinas, estos hidrocarburos son recalcitrantes, difíciles de degradar, de gran tamaño y de cadenas complejas, son persistentes en el ambiente degradando la calidad del suelo y el desarrollo normal de las plantas y los microorganismos [1], es por ello que estos hidrocarburos deben ser removidos o su concentración debe ser reducida del ambiente.

Con este propósito se han utilizados procesos de degradación industrial tanto químicos como físicos, que pese haber demostrado su potencial para la recuperación de cientos de lugares contaminados, resultan relativamente inadecuados para la remoción de hidrocarburos complejos y además el costo de su aplicación resulta elevado [2]. La presente investigación esta dirigida a estudiar la influencia de los microorganismos en la estructura de los hidrocarburos complejos, asfaltenos y resinas, en un suelo contaminado con crudo mediano aplicando una biorremediación ex-situ.

## 2. METODOLOGIA

### Aislamiento de las cepas bacterianas

Se trabajó con una cepa aislada en investigaciones anteriores que utilizó un conjunto de bacterias asociadas a aguas de formación de dos fosas de recolección de la

compañía Corpoven: MED-10 y MED-17 (Edo. Anzoátegui) [3]. Estas bacterias fueron seleccionadas luego de una serie de pruebas bioquímicas de actividad enzimática que permitieron conocer su capacidad para degradar y metabolizar ciertos sustratos. También se realizó prueba para observar su cinética de crecimiento, su eficiencia en la producción de surfactantes y emulsificación de crudo, basado en estas pruebas los investigadores seleccionaron el grupo funcional ST31 [3]. Este inóculo bacteriano seleccionado fue cultivado en un medio enriquecido con nutrientes como sulfato, hierro, zinc, manganeso, fósforo, cloruro de sodio, amonio, molibdato y glucosa. El sustrato utilizado en la investigación fue crudo mediano de 25° API proveniente del Estado Apure el cual es denominado crudo Guafita.

### Muestreo y caracterización

El suelo a contaminar se caracterizó para de simular las condiciones de campo en el laboratorio, con el fin de monitorear y evaluar la biodegradación del contaminante presente en el suelo. Para esta investigación se utilizaron cuatro recipientes plásticos como biorreactores aproximadamente de 40 cm de largo, 34 cm de ancho y 27 cm de profundidad donde se prepararon cuatro muestras una con el suelo virgen y tres replicas con suelo contaminado saturado con la mezcla de biosurfactante y microorganismo ST31 (pseudomonas, así como también se establecieron las variables que permitan el seguimiento del biotratamiento como pH, temperatura, humedad y aireación, posteriormente se tomaron muestras de suelo inoculado con la cepa a los 0, 7, 14 y 30 días de incubación para determinar las concentraciones de hidrocarburos por el método gravimétrico.

Para la cuantificación de la fracción de asfalteno que compone el crudo mediano, se pesaron veinte gramos de muestra de suelo contaminado con el crudo, realizando la extracción en un equipo Soxhlet, estas fracciones fueron separadas mediante extracción con solventes con baja polaridad [4] y concentradas en un rota vapor obteniendo los hidrocarburos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos, luego se procedió a separar el asfalteno mediante extracción en un equipo Soxhlet con un solvente no polar, el sólido obtenido se guardó en atmósfera inerte. La solución que resulta de la precipitación de los asfaltenos constituyen los maltenos (resinas, saturados y aromáticos) que se separaron mediante una cromatografía líquida de adsorción en

columna sobre sílice gel, a fin de obtener las fracciones de resinas de hidrocarburos presentes en el crudo.

De igual manera se aplicó espectroscopía infrarrojo la cual es una propiedad altamente característica de un compuesto orgánico, y puede emplearse para establecer la identidad de dos sustancias y para revelar la estructura de una nueva, porque indica que grupos se encuentran en una molécula o no están en ella, análisis de osmometría de presión de vapor que permite medir la osmolalidad de fluidos fisiológicos y determinar el peso molecular promedio de polímeros disueltos en soluciones orgánicas o acuosas, a través de la presión de vapor de la solución que contiene el soluto y la presión de vapor del solvente puro.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El suelo a caracterizar presentó las propiedades de ser un suelo franco arenoso según la textura del suelo como se señala en la tabla 1.

Tabla 1. Parámetros físicos del suelo

Distribución del tamaño de partículas	Porcentaje (%)
Arena muy fina	57
Arena fina	9
Arena media	9
Arena gruesa	7
Arena muy gruesa	7
Limo	8
Arcilla	3
Clasificación textural	Franco arenosa

La textura del suelo afecta en gran medida la biorremediación, un suelo con un gran porcentaje de arena como se observa en la tabla, suele ser incapaz de almacenar agua suficiente y pierde grandes cantidades de

minerales nutrientes por lixiviación hacia el sub suelo, la evaluación textural del suelo indica que el proceso de biorremediación es viable según el decreto 2635 [5] donde establece que para la práctica de la técnica de biotratamiento sobre el suelo arable, el área de disposición final debe estar confinada por suelos de textura franca, o franco arenosa o franco limosa o franco arcillosa o acondicionado artificialmente y en este caso el suelo es de textura franco arenosa.

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos del análisis realizado al suelo empleado en el estudio (suelo virgen) y al suelo tratado después de la biorremediación a los treinta días.

El estudio de algunos elementos macronutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio es de suma importancia para detectar la fertilidad del suelo, es indicativo que estos valores no tienen concentraciones altas su pH es ligeramente básico [6], se puede observar que el contenido de fósforo y de potasio aumento lo que conduce a un suelo mas fértil.

Con respecto al parámetro aceite y grasas el suelo virgen esta por debajo de la norma y el suelo contaminado después de tratado tiene una alta concentración de hidrocarburos que no fueron removidos al aplicar el biotratamiento. Con respecto a la pérdida de nitrógeno este se debe a la presencia de bacterias que utilizan esta fuente de alimentación en su crecimiento.

Los valores obtenidos para los metales totales (Cr, Cd, Zn) se encontraron por debajo de los límites máximos permisibles establecido en el Decreto No. 2635, en el artículo 53, se describe que en la practica del biotratamiento el desecho no debe exceder las concentraciones máximas permisibles en lixiviados, los valores antes y después del tratamiento cumplen con los requerimientos establecidos, garantizando la actividad de los microorganismos presentes para la degradación de hidrocarburos, ya que estos pueden afectar negativamente al organismo cuando su nivel supera cierto limite [7].

Tabla 2. Parámetros físico - químicos del suelo virgen y del suelo biotratado

Parámetro	Unidad	Rango permisible	Valor del suelo virgen	Valor del suelo biotratado a los treinta días
pH	Adm.	5-8	7,92	7,43
Conductividad Eléctrica	mmhos/cm.	< 3,5	0,015	0,19
Cloruros Totales	ppm	< 2.500	448	116,28
Aceites y Grasas	%peso	< 1	< 0,05	15,14
TPH	% peso	1-10	<1	< 0,05
Arsénico	mg/kg	25	< 0,05	4,7
Mercurio	mg/kg	1	< 0,05	<0,05
Plata	mg/kg	5	< 0,05	<0,05
Selenio	mg/kg	2	< 0,05	<0,05
Plomo	mg/kg	150	5,89	<0,05
Cromo	mg/kg	300	18,14	<0,05
Zinc	mg/kg	300	2,71	<0,05
Cadmio	mg/kg	8	< 0,05	<0,05
Bario	mg/kg	20.000	43,58	254
Fósforo Total	mg/kg	NR	49,9	52,3
Potasio	mg/kg	NR	0,00651	0,9
Nitrógeno	mg/kg	NR	251	178

En cuanto al pH, el monitoreo arrojó resultados mayores a 7,2 durante toda la experiencia (ver tabla 3), lo que significa que se mantuvieron las condiciones adecuadas en el suelo en cuanto a esta variable, dado que los valores requeridos para que se logre una favorable actividad enzimática están comprendidos entre 5,5 y 8,8; y los óptimos para una degradación de crudo están entre 6,5 y 8,0.

Tabla 3. Variación de la temperatura y el pH en suelo durante el biotratamiento

Día de Muestreo	Temperatura del Suelo (T <sub>s</sub> ± 0,5) °C	Concentración de Protones (pH ± 0,01) Adim.
0	28,0	7,59
7	26,0	7,24
14	29,0	7,68
30	28,0	7,43

Con respecto a la temperatura, se mantuvo aproximadamente constante en 28° C durante todo el biotratamiento, valor apropiado que constituye una condición esencial (25° a 45° C) para el crecimiento de los microorganismos mesófilos inoculados en el suelo [8].

La humedad no fue un parámetro que se controló cuantitativamente sino que, se reguló de manera cualitativa de acuerdo a las necesidades del suelo; es decir, cuando se observó sequedad en él se le agregó el Medio Mínimo Surfactante hasta humedecerlo completamente sin crear excesos acuosos.

Cabe destacar, que la humedad ejerce un efecto regulador sobre las poblaciones de microorganismos ya que determina el contenido de agua entre los intersticios del suelo, el cual es un requisito fundamental para las transformaciones enzimáticas; porque las bacterias la utilizan como medio de transporte de los nutrientes hacia el interior de la célula y fuera de ella.

Por su parte, la aireación fue un factor imprescindible para asegurar el suministro de oxígeno que se requiere para llevar a cabo las actividades microbianas en condiciones aerobias y así agilizar su vía metabólica. En tal sentido, el suelo se aireó durante 10 minutos cada dos días durante todo el biotratamiento.

En cuanto a la gravimetría de las fracciones de resinas y asfaltenos, por ser compuestos de alto peso molecular y por ende de baja volatilidad, presentan un

comportamiento estable a lo largo del tratamiento, manteniéndose su porcentaje másico en aproximadamente 16 y 12% respectivamente como se observa en la Figura 1, excepto el observado en las resinas el día 14, que sin lugar pudo ocurrir debido a un exceso de solvente en la muestra o por falta de un mezclado uniforme en los biorreactores.

Al aplicar el análisis de espectroscopía infrarrojo a las fracciones de resinas, se observó la aparición de bandas características de alargamientos C-H de los aromáticos, de los metilos y del metileno en todas las muestras analizadas, bandas de flexión en el plano y fuera de él de los C-H aromáticos respectivamente, haciendo énfasis en que las primeras de ellas prácticamente desaparecen en la última fase del bioproceso; también se evidenció la flexión anular carbono-carbono (C-C) fuera del plano de los aromáticos, el cual disminuye considerablemente en el día 30 si se compara con los días anteriores, y el alargamiento carbono-carbono (C-C) de los aromáticos, el cual se mantuvo prácticamente invariable al igual que el sobretono de los aromáticos. (Ver figura 2).

Esta diferencia entre los espectros; deja entrever que la mezcla de moléculas complejas de las resinas sufrió una somera modificación, que no fue posible comprobar con análisis especiales adicionales tales como la Resonancia Magnética Nuclear.

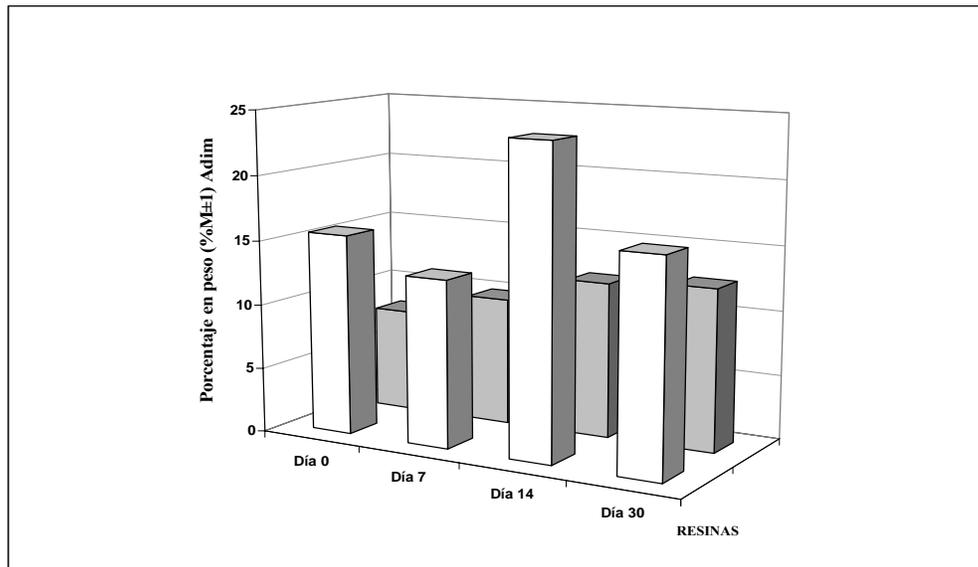


Figura 1. Comportamiento de las resinas y asfaltenos durante el biotratamiento

En los asfaltenos la aplicación de la espectroscopía infrarroja permitió conocer los grupos funcionales presentes en la mezcla molecular compleja que constituye

esta fracción [9,10], lo que aporta una valiosa información en cuanto a su estructura, para todas aquellas investigaciones que actualmente se desarrollan en el área.

(Ver figura 3). Se determinó la presencia de bandas de alargamiento metílico, las cuales aumentaron su intensidad a medida que transcurrió el biotratamiento, lo que sugiere un cambio en la estructura molecular del asfalteno, después del séptimo día de evaluación, este mismo comportamiento se precisa en las bandas de alargamiento del grupo hoxidrilo (OH) en el cual se observó que aumentó significativamente para la toma de muestra del día 30 con respecto al día 14, incremento que pudo ocurrir como consecuencia de la acción de las reacciones enzimáticas en las cadenas más vulnerables a la oxidación en esta mezcla. Es posible que compuestos con grupos polares en su estructura que hayan sido degradados por los microorganismos muestren mayor afinidad por la fracción asfaltenos. La presencia de

bandas tales como la del grupo funcional ciano ( $C\equiv N$ ) en la región  $2273-2200\text{ cm}^{-1}$  es indicativo de lo anterior.

En cuanto al peso molecular promedio de esta mezcla de asfaltenos, presentó una significativa diferencia entre el valor obtenido para el crudo sin tratamiento (2500 g/mol) y el crudo biotratado analizado en el último día de la experiencia (1900 g/mol); esto indica que la estructura física de los agregados de los asfaltenos, sufrió una modificación al dispersar sus moléculas logrando disminuir la asociación entre ellas, lo que conduce a una reducción en el peso molecular; debido a la posible generación de compuestos polares como consecuencia de la actividad enzimática de los microorganismos.

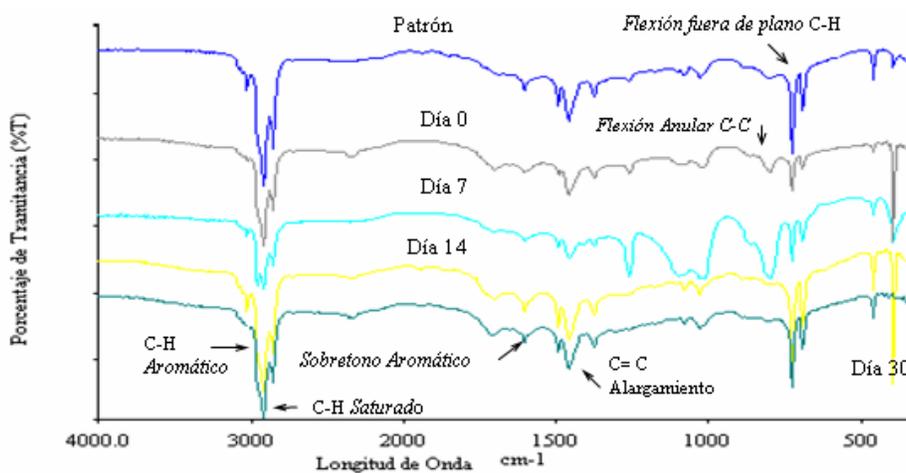


Figura 2. Espectrografía infrarroja de las fracciones de resinas presentes en el suelo durante la biorremediación

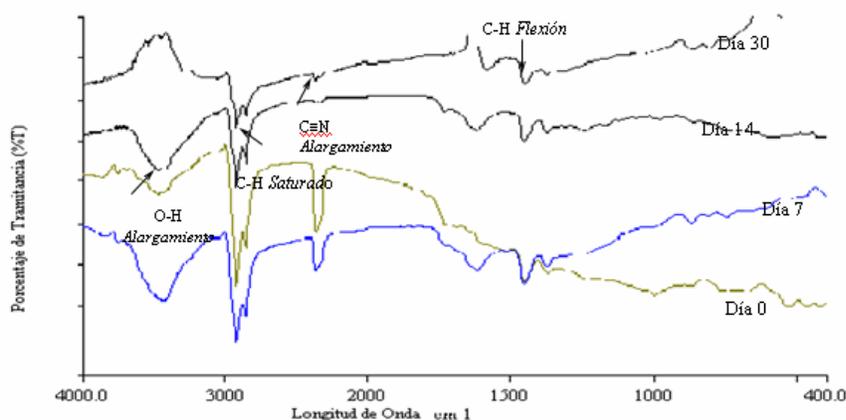


Figura 3. Espectroscopia infrarroja de las fracciones de asfaltenos presentes en el suelo durante la biorremediación

#### 4. CONCLUSIONES

De acuerdo al estudio de caracterización del suelo virgen se tiene que éste es de naturaleza franco arenoso. Las variables establecidas para controlar el biotratamiento fueron pH, temperatura, humedad y aireación. El pH se mantuvo en valores apropiados mayores a 7,2, lo que contribuyó con una favorable actividad enzimática en el suelo; la temperatura permaneció dentro del rango de valores requeridos para el desarrollo de los microorganismos mesófilos inoculados en el suelo y la humedad fue una condición que se controló solo de manera cualitativa según las necesidades del suelo. La aireación se realizó de forma interdiaria. Gravimétricamente, las fracciones de resinas y asfáltenos presentaron un comportamiento estable antes, durante y después de realizar el bioproceso. Además, se observó una somera modificación molecular en las resinas, la cual no se pudo soportar con análisis adicionales al realizado. De acuerdo a los resultados obtenidos en el espectro infrarrojo y en la osmometría de presión de vapor para los asfáltenos, se logró una modificación en la estructura física de los agregados que constituyen esta fracción.

#### 5. REFERENCIAS

- [1] Infante Carmen. 2005. Biorremediación de Suelos Contaminados con Hidrocarburos. Facultad de Agronomía. Postgrado Ciencia del Suelo. Universidad Central de Venezuela.
- [2] Parales R; YU C., Parales J., Gibson D. T. 2001. Expanding the limits of naphthalene dioxigenase as a biocatalyst. ASM Conference of Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3). Puerto Rico. pp. 6.
- [3] Bastardo, H. & Rangel, O. 1995. Production of Biosurfactants from Heavy Crude Oil Deposited in Oil Pits. Proceeding of III International Congress. Energy, Enviroment and Technological Innovation. 2:3-10.
- [4] Carrión, N., Escalona, A., Ramírez, E., Moños, P., Itriago, A., Montes, L., Rosa-Brussín, M. Y Sepúlveda, G. 1986. Análisis de Crudos Pesados, parte 1: Separación en Familias de Hidrocarburos. Acta Científica. Venezuela. 37:140-146.
- [5] Gaceta Oficial. Republica de Venezuela. 1998. Normas para el Control de la Recuperación de

Materiales Peligrosos y el Manejo de los Desechos Peligrosos (gaceta oficial extraordinaria n0 5245).

- [6] Bravo, P. 2000 "Aspecto Básicos de Química de Suelos" ediciones de la Universidad Ezequiel Zamora, Barinas.
- [7] Doelman P., E. Cansen, M. Michels y M. Van Til. 1994. Effects of heavy metals in soil on microbial diversity as show by the sensitivy-resistance. Index, an ecologically relevant parameter. Biol. Fertil Soil. 17:177-184.
- [8] Ercoli, E.; Galvez, J.; Muler, R.; Stotmeister, U. (1998). "Tratamiento intensivo de suelos biorremediados en reactores airlift". UFZ- Bericht Biorremediation of polluted areas Luise Berthe-Corti (Hrgs). 18. 146-155.
- [9] Morrison, Robert y Boyd, Robert. 1976. Química Orgánica. Fondo Educativo Interamericano, S.A. Estados Unidos.
- [10] Silverstein, R. M; Bassler, G. C y Morrill, T. C. 1974. "Espectrometría infrarroja". 3ra Edición. John Wiley & Sons. Inc. Estados Unidos.