

# ADAPTACIÓN Y MONITOREO DE MICROORGANISMOS EN PROCESOS DE NITRIFICACIÓN EN AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA PETROLERA

## ADAPTATION AND MONITORING OF MICROORGANISMS IN PETROLEUM INDUSTRY WASTEWATER NITRIFICATION PROCESSES

Madero A<sup>1</sup>., Bravo G., Carvajal F<sup>2</sup>., Díaz M.

### RESUMEN

La remoción biológica de nitrógeno amoniacal se lleva a cabo en dos etapas sucesivas, la nitrificación y la desnitrificación. La nitrificación se estudió en un grupo de microorganismos aislados a partir de diferentes fuentes acuíferas: una ciénaga eutrificada y aguas residuales procedentes de dos plantas de tratamiento; una de tipo petroquímico y otra de origen doméstico. Los microorganismos se evaluaron en condiciones oxigénicas a 305K en un sistema semicontinuo. Se comprobó la buena adaptación de los microorganismos en aguas residuales de origen petroquímico en procesos de remoción de nitrógeno amoniacal.

**Palabras clave:** Nitrificación, eutrificación, biorremediación, amoníaco.

### SUMMARY

Biological removal of ammonia nitrogen is carried out in two successive stages, nitrification and denitrification. This work studied the nitrification process on microorganisms isolated from different aquifer sources: a eutrophicate pond and residual waters from two treatment plants (petrochemical and domestic)

**Keywords:** Nitrification, eutrophication, bioremediation, ammonia.

### INTRODUCCIÓN

En la industria muchos de los efluentes de aguas de desecho en los procesos de refinación del petróleo, se originan por el uso de vapor en los mismos. Posteriormente ocurren en forma simultánea la condensación del vapor y la del hidrocarburo. En la fase gaseosa del hidrocarburo se presentan compuestos como sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), amoníaco (NH<sub>3</sub>), ácido cianhídrico (HCN), fenoles y mercaptanos. Después de la separación del hidrocarburo, el vapor condensado contiene aceite y una mezcla de los anteriores componentes (Nalco, 1982).

Dichas aguas de desecho generalmente reciben el nombre de *aguas agrias* por su desagradable olor, característico del sulfuro de hidrógeno disuelto. Las cantidades de estos contaminantes en una corriente de agua agria, dependen del tipo de proceso de refinación en el que se origina la corriente, de los materiales alimentados al mismo, así como del nivel de presión al que se condensa el vapor dentro del proceso (Nalco, 1982). Este tipo de aguas se vierte a piscinas de oxidación, las cuales hacen parte de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) en donde se diluyen con otros tipos de aguas, disminuyendo su concentración de contaminantes.

Cuando se liberan en el ambiente el amoníaco y compuestos que contienen nitrógeno, se generan

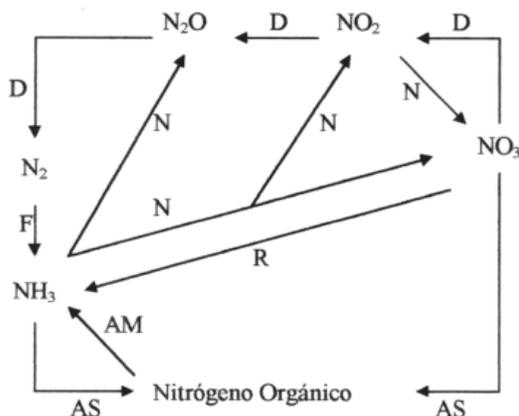
---

<sup>1</sup> Todos los Autores. Laboratorio de Biotecnología. ECOPETROL - Instituto Colombiano del Petróleo. A.A. 4185. Bucaramanga, Santander, Colombia. fcarvaja@reymoreno.net.co

<sup>2</sup> A quien debe ser enviada la correspondencia

serios problemas entre los cuales se pueden citar: eutricación en ciénagas y ríos, deterioro de la calidad del agua e incluso problemas de salud para los humanos (Gamo et al, 1996).

En el ciclo del nitrógeno (Figura 1) como ocurre con otros ciclos, existe un equilibrio dinámico que puede ser alterado deliberada o inadvertidamente por actividades agrícolas, industriales o por causas naturales. Lo anterior produce la acumulación de materiales intermedios en el ciclo, muchos de los cuales son tóxicos (Kuenen, en Ferguson 1987).



**Figura 1. Ciclo Del Nitrógeno**

D: Denitrificación. AS: Asimilación. AM: amonificación. N: Nitrificación. F: Fijación de nitrógeno. R: Desasimilación de nitrato reducido.

El ciclo del nitrógeno consta de diversas etapas en las cuales se produce la transformación de los diversos compuestos nitrogenados. Cuando se presenta un desequilibrio en algunas de sus rutas, puede darse un problema ecológico. Por ejemplo, el exceso de amoníaco y algunos de sus asociados oxidados (nitrito,  $\text{NO}_2^-$  y nitrato  $\text{NO}_3^-$ ) promueven la proliferación de algas, que entre otros efectos, causan la disminución del oxígeno en las aguas (eutricación). El nitrito y en algunas circunstancias el nitrato, son tóxicos y se les ha asociado en algunas enfermedades como la metahemoglobinemia en los niños, (Wang et al, 1995). También se han asociado a las cianobacterias en la producción de ciertas toxinas venenosas incluso para los humanos. Además, los compuestos nitrogenados están implicados en el problema de la lluvia ácida. (Kuenen, en Ferguson 1987).

Estas circunstancias hacen necesario implementar técnicas que conlleven al control del amoníaco y sus derivados. Los métodos biológicos son una alternativa válida frente a otros procesos fisicoquímicos entre los cuales se citan el atrapamiento en columnas, la absorción por carbono y la oxidación con dicromato entre otros (Barnhart, 1976). El uso de procesos microbiológicos

elimina los compuestos de una manera económica, limpia y eficiente (Grosso et al, 1995).

Para la remoción de amoníaco se requieren microorganismos nitrificantes que ejecutan la conversión del ion hasta nitrato pasando por nitrito. En el proceso intervienen microorganismos autótrofos especializados como los géneros *Nitrosomonas* spp., *Nitrosococcus* spp., *Nitrobacter* spp. De igual forma algunos heterótrofos como *Arthrobacter* spp. y algunos hongos como *Aspergillus* spp. (Kuenen, en Ferguson 1987).

El uso de tratamientos biológicos en aguas residuales de refinerías petroleras, ha sido citado previamente (Tyagi et al, 1993), donde se reportan microorganismos inmovilizados en poliuretano, con porcentajes de remoción del 99% a partir de 30 ppm de amonio, en estadios de tiempo alrededor de cinco semanas, sin tener en cuenta el período de arranque.

El presente trabajo se realizó con el fin de obtener un grupo de microorganismos útiles en procesos de nitrificación, los cuales se adaptaron a las aguas residuales industriales de refinerías petroleras para la remoción de amoníaco.

## METODOLOGÍA GENERAL

### Caracterización Inicial de los efluentes

En la tabla 1 se muestra la caracterización química parcial del agua residual empleada en los ensayos (Grosso et al, 1995).

**Tabla 1. Caracterización parcial de la corriente de refinería empleada en los ensayos**

PARÁMETRO	VALOR
Fenoles totales ( $\text{gm}^{-3}$ )	20 - 180
Nitrógeno total ( $\text{gm}^{-3}$ )	40 - 50
Grasas y aceites ( $\text{gm}^{-3}$ )	100 - 200
Fósforo total ( $\text{gm}^{-3}$ )	13,4
Cloruros ( $\text{gm}^{-3}$ )	40 - 100
pH	6 - 9
DQO	200 - 600

### Medio de cultivo

El medio está diseñado para el cultivo de microorganismos nitrificantes autótrofos; por tal razón no contiene fuentes de carbono orgánicas.

Se empleó un medio de cultivo salino cuya composición fue la siguiente:  $\text{CaCO}_3$  0,003  $\text{g/dm}^3$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3,7  $\text{g/dm}^3$ ;  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1  $\text{g/dm}^3$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2  $\text{g/dm}^3$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,04  $\text{g/dm}^3$ ; indicador rojo de fenol 0,5  $\text{cm}^3/\text{dm}^3$ ; EDTA-Fe 0,1  $\text{cm}^3/\text{dm}^3$ . Todos son reactivos analíticos de Merck (Merck, Darmstadt).

### Aislamiento de microorganismos a partir de fuentes acuíferas.

Con el fin aislar microorganismos nitrificantes y desnitrificantes, para la formulación de un grupo bacteriano de aplicación en el tratamiento de las aguas residuales de refinerías, se consideraron tres fuentes: una planta de tratamiento de aguas domésticas, en la cual ocurren procesos oxigénicos y anoxigénicos; una ciénaga donde se evidencian problemas de eutricación y las aguas residuales de procesos de refinación del petróleo.

Las muestras se sembraron en volúmenes de 50 ml del medio ya descrito con  $1000 \text{ mg/dm}^3$  de  $\text{N-NH}_3$ . Se incubaron por 25 días a  $305\text{K}$  y con agitación constante de  $130 \text{ rpm}$ . Al finalizar este tiempo se efectuó un primer pase al 10% en el mismo medio y se mantuvieron por 25 días mas sin agitación. De esta forma se conformó un solo grupo microbiano denominado *Quimi*.

Implementación de un sistema semicontinuo para la adaptación de los microorganismos a las aguas residuales de origen petroquímico

El grupo *Quimi* se inoculó al 10% del volumen total en  $3.5 \text{ dm}^3$  de medio de cultivo en un erlenmeyer de  $5 \text{ dm}^3$ , volúmenes que facilitaron el análisis y ejecución del sistema. Se suministró aireación continua y se emplearon trampas de ácido bórico al 2% p/v (APHA, 1992), para determinar el amonio disuelto arrastrado por el aire.

El sistema se mantuvo por 86 días a  $305 \text{ K}$ , a pH básico (entre 7 y 8). Para visualizar el cambio de pH se utilizó como indicador en el medio de cultivo el rojo de fenol. Además, se catalogó como semicontinuo por la adición semanal del mismo medio de cultivo salino estéril ( $500 \text{ ml}$ ) y la toma de muestras sucesivas, para determinar la presencia de iones amoníaco, nitrato y nitrito.

Inicialmente se empleó el medio mencionado y a los 35 días de incubación se procedió a alimentar el sistema con aguas residuales de la industria petrolera, cuya concentración se aumentó gradualmente hasta que el volumen fuera el 100% de dichas aguas, lográndose con ello la adaptación paulatina de los microorganismos aeróbicos a dichas aguas. En la tabla 2 se muestran tanto el tiempo de adición como el porcentaje de agua residual utilizado.

Tabla 2. Tiempo de adición y porcentaje de agua residual utilizado en los procesos de adaptación

ADICIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN (días)	% DE AGUA RESIDUAL
1	36	20
2	43	40
3	53	60
4	65	80
5	75	100

Con respecto a la cuantificación de los microorganismos, al finalizar el montaje se elaboraron recuentos bacterianos en placa empleando el medio salino mencionado con agar-agar al 1.5%, agar nutritivo y se implementó la técnica de NMP (Schmidt et al, 1965; APHA, 1992) con la microbiota adaptada, con el fin de verificar la presencia de autótrofos nitrificantes en el mismo medio.

### Determinación analítica.

Los análisis de nitrito, nitrato y amoníaco se realizaron colorimétricamente utilizando un espectrofotómetro Cary Varian modelo 1E. El amoníaco se midió por el método del reactivo de Nessler (APHA, 1992), el nitrato por el método de Caron y Bacquet por la reacción con el salicilato de sodio en medio básico y el nitrito por el método del reactivo de Zambelli (García de Aya, 1983).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación del grupo de microorganismos *Quimi* en un sistema semicontinuo.

Con los datos obtenidos en este procedimiento se comprobó inicialmente la necesidad de tiempos prolongados de incubación (36 días) con porcentajes apreciables de remoción de ion amonio, del orden del 88%.

Fue necesario ajustar la concentración de ion amonio adicionándolo en la solución de nutrientes con el fin de asegurar su suministro en el sistema. Por lo tanto, para cuantificar correctamente las tasas de remoción, se tuvo en cuenta la cantidad de nitrógeno presente luego de la adición de medio fresco al sistema.

En la tabla 3 pueden observarse porcentajes significativos de remoción de amoníaco del cual se deduce que los microorganismos metabolizaron concentraciones entre  $24,60 \text{ mg/dm}^3$  y  $730.25 \text{ mg/dm}^3$ . Los resultados fueron de gran importancia, pues se comprobó la capacidad adaptativa de las bacterias a las condiciones del medio, cuya composición incluyó volúmenes crecientes de aguas residuales de la industria petrolera (Figura 2).

A lo largo del ensayo se observaron concentraciones significativas de iones nitrito y en menor grado de iones nitrato, lo cual podría sugerir que la velocidad de la reacción nitrificante en este caso, estaría determinada por la segunda etapa de la nitrificación que oxida nitrito a nitrato en forma aeróbica.

Para determinar el ion amonio que se liberó durante el proceso, se emplearon sistemas de captura (ácido

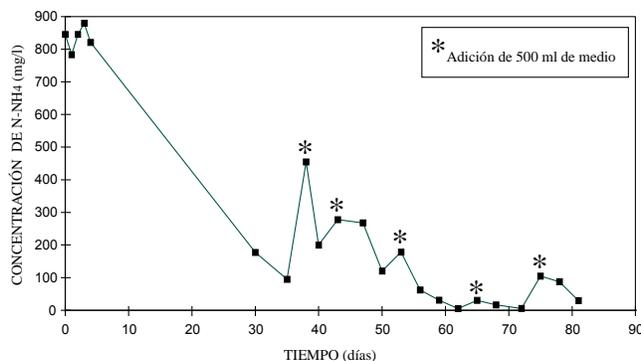
bórico 2% p/v), de tal manera que quincenalmente se cuantificó, encontrándose valores que no superaron los 0.26 mg/dm<sup>3</sup>. Esto reflejó que la disminución de ion amonio detectada en el sistema, correspondió a procesos biotransformantes.

**Tabla 3. Evaluación del proceso nitrificante con el grupo de microorganismos «Quimi».**

MONITOREO O DEL SISTEMA	Tiempo (días)	pH	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/dm <sup>3</sup> )
			mg/dm <sup>3</sup>	% de Biotransformación	(mg/dm <sup>3</sup> )	
INICIO		8.4	825.05			ND
1		8.03	845.90		3.71	2.46
2	1	7.79	783.95		1.01	1.92
3	2	7.80	845.70		1.19	2.44
4	3	7.86	880.00		1.57	4.48
5	4	7.69	821.05		1.49	8.56
6	30	8.70	177.56		14.37	170
7	35	8.20	94.80	88	14.37	242.2
adición 1*	36	7.98	729.45		ND	ND
8	36	6.71	<u>454.96</u>		26.06	80.98
9	40	6.78	200.23	56	9.17	249.9
adición 2	43	8.40	1175.9		ND	0.06
10	43	9.18	<u>277.76</u>		9.05	204.8
11	47	9.3	267.90		11.95	433.3
12	50	6.5	120.56	57	48.8	219.7
adición 3	53	8.41	1175.9		ND	ND
13	53	7.90	<u>178.46</u>		8.78	203.3
14	56	NR	62.59		21.46	311.8
15	59	NR	30.97		18.08	386.0
16	62	8.29	5.28	97	35.32	384.6
ADICIÓN 4	65	7.81	302.65		ND	ND
17	65	8.22	<u>30.36</u>		14.6	346.5
18	68	6.69	16.45		18.10	379.5
19	72	7.94	5.76	81	23.0	390.6
ADICIÓN 5	75	7.48	797.70		ND	ND
20	75	7.82	<u>104.95</u>		8.59	338.2
21	78	NR	87.70		16.24	386.7
22	81	6.70	29.43		19.54	431.9
23	84	6.80	14.44	86	21.25	458.9

ND: No detectable

\* ADICIÓN 1, 2, 3, 4 y 5: Corresponde a las respectivas proporciones medio sintético : aguas residuales, mencionadas en la metodología. Los valores subrayados ilustran las concentraciones establecidas en el sistema, una vez que se ha adicionado el medio con las aguas residuales.



**Figura 2. Evaluación de la concentración de ion amonio utilizando el grupo de microorganismos Quimi**

Se observó la disminución del pH, debido a la liberación de hidrogeniones durante la reacción nitrificante, aunque hay algunos valores relativamente altos por la adición de las aguas residuales cuyo pH osciló alrededor de 8.0.

Con respecto a la cuantificación de los microorganismos presentes en el grupo microbiano se efectuaron recuentos

bacterianos en placa, alrededor de 55 X 10<sup>5</sup> ufc/cm<sup>3</sup> en agar salino y agar nutritivo, confirmando de este modo la presencia de microorganismos heterótrofos. Con la técnica de NMP se encontró un valor de 14 X 10<sup>4</sup> NMP/100 cm<sup>3</sup>. Este valor, unido a la ausencia de microorganismos en el medio de agar nutritivo y al resultado positivo para las pruebas cualitativas de nitrato y nitrito evidencia la presencia de microorganismos autótrofos.

Vale la pena anotar que los resultados encontrados, ratifican la correcta adaptación y la actividad nitrificante de los microorganismos a las aguas residuales industriales, donde podrían darse fenómenos inhibitorios, debido a las altas concentraciones de fenol, lo cual ha sido objeto de estudio en diversas publicaciones (Wood et al, 1981; Ramakrishna et al, 1983; Mueller et al, 1985 y Hockenbunrg, 1977).

En ensayos simultáneos no reportados aquí, el grupo de microorganismos Quimi se evaluó en condiciones de microaerobiosis para determinar su capacidad desnitrificante en un medio salino diferente, con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. Además se valoró en forma cualitativa, la formación de productos gaseosos, empleando campanas de Durham. El grupo mostró buenos porcentajes de reducción de nitrato; un 60% de reducción en cinco días hasta un 95% en cuarenta días, con 100 mg/dm<sup>3</sup> de concentración inicial con respecto al nitrato. Se detectó la formación de burbujas con lo que se sugiere su aplicación en sistemas completos de remoción amoniacal.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. El sistema necesita inicialmente tiempos prolongados de incubación (36 días) en medio sintético para obtener porcentajes apreciables de remoción de ion amonio, del orden del 88%.
2. El grupo de microorganismos Quimi biotransformó entre 24,60 mg/dm<sup>3</sup> y 730,25 mg/dm<sup>3</sup> de nitrógeno amoniacal.
3. La presencia de iones nitrito y nitrato en el medio de cultivo indicó la existencia de procesos nitrificantes.
4. El grupo de microorganismos Quimi conformado por microorganismos heterótrofos y autótrofos se adaptó a las aguas residuales industriales y demostró ser una asociación apropiada en los procesos nitrificantes, a pesar de la existencia de compuestos inhibitorios como el fenol y cloruros, entre otros.
5. Se sugiere implementar sistemas de inmovilización celular para reducir los tiempos de residencia y optimizar los resultados para proceder a un escalado.

**AGRADECIMIENTOS**

Los autores expresan sus agradecimientos a la Ingeniera

Química Sabrina Restrepo y a la Tecnóloga Química Esperanza Torres Bautista por sus valiosos aportes en la consecución de los resultados.

**BIBLIOGRAFÍA**

**Apha, Awwa, Wef.** «Standard methods for the examination of water and wastewater», 18 de, E.U.A., 1992.  
**Barnhart, E.** 1976. «Nitrogen as a consideration in industrial pollution control», *Water* 167 (73) 221 - 226.  
**Gamo, E.** 1996. «Eliminación biológica de nitrógeno en aguas residuales». *Ingeniería Química*, septiembre 333-341  
**García de Aya, R.** 1983. «Análisis químico y bacteriológico en el control de aguas», Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.  
**Grosso, J.L., Díaz, M.P. y León G.** 1995. «Biodegradación de fenoles en aguas residuales de la industria petrolera»  
**Hockenburg, M. y Grady C.** 1977. «Inhibition of nitrification effects of selected organic compounds», *j. Wat. Pollut. Control Fed.*, 49:768 - 777.  
**Kuenen, J.G. y Robertson A.** 1987. «Ecology of nitrification and denitrification» en Ferguson, S.J. «The nitrogen and sulphur cycles» Universidad de Cambridge, P. 162-218.  
**Nalco Chemical Co.** 1982. «Manual del agua», McGraw - Hill, E.U.A., 1982.

**Mueller, J., Wu, K. y Kaczmarek, S.** 1985. «Nitrification in refinery wastewater treatment», *Proc. Ind. Waste Comp.* 40 th: 507 - 522.  
**Ramakrishna, C. y Sethunathan, N.** 1983. «Inhibition of heterotrophic and autotrophic nitrification in bacterial cultures by carbaryl and 1-naphtol», *J. Applied Bacteriol.*, 54:191 - 195.  
**Schmidt, E., Belser, L.** 1965. «Nitrifying Bacteria», En: *Methods of soil analysis. Part 2*; C.A. Black, Edt. American Soc Agronomist, Madison, WI, p.1027-1042.  
**Tyagi, R.D., Tran, F.T. y Chowdhury, A.K.M.M.** 1993. «Biodegradation of petroleum refinery wastewater in a modified rotating biological contactor with polyurethane foam attached to the disks». *Wat. Res.* 27: 91-99.  
**Wang, J., Baltzis, C. y Lewandowski, G.** 1995. «Fundamental denitrification kinetic studies with *Pseudomonas denitrificans*», *Biotechnol. Bioeng.*, 47:26 - 41.  
**Wood, L., Hurley, B. y Matthews, P.** 1981. «Some observations on the biochemistry and inhibition of nitrification», *Wat. Res.*, 15:543 - 551.

# Nuestro *servicio*

la mejor herramienta para su laboratorio

EQUIPOS - ELEMENTOS - REACTIVOS



AM. ASESORIA & MANTENIMIENTO LTDA.  
 DIAGONAL 145A No. 34-44 OF. 103  
 a.m.ltda@imsap.net.ec



**ASESORIA & MANTENIMIENTO LTDA.**

**R A I N I N**

MICROPIPETAS

**E P P E N N D O R F**

MICROCENTRIFUGAS

**T E C H N E**

HIBRIDIZACION - TERMOCICLADORES

**S A N T A C R U Z**

ANTICUERPO - MARCADORES

**M J R E S E A R C H**

TERMOCICLADORES

**S T R A T A G E N E**

BIOLOGIA MOLECULAR - ELECTROFERESIS