

BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS ALTAMENTE CONTAMINADOS

Ercoli, E.C.; Gálvez, J.A.; Di Paola, M.; Cantero, J. A.; Videla, S.; Medaura, C..

Laboratorio de Bioprocesos, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Cuyo. 5500 Mendoza. República Argentina. E-mail: eercoli@raiz.uncu.edu.ar

RESUMEN

Las técnicas de base biológica para remediación de sitios contaminados, conocidas con el nombre genérico de biorremediación, son actualmente materia de intenso debate especialmente en lo concerniente a su eficiencia desde el punto de vista técnico y económico, aunque se observa en los últimos años un notable incremento en su uso. Ya nadie duda que se trata de una poderosa herramienta tecnológica, especialmente para tratamientos a largo plazo. La *Environmental Protection Agency* de Estados Unidos identifica en los últimos años un importante número de sitios que han sido tratados usando métodos de biorremediación como *Tecnologías de Tratamiento Primario*.

Métodos biológicos de descontaminación han sido aplicados al tratamiento de suelos con alto y moderado contenido en hidrocarburos. El desarrollo ha estado especialmente orientado al tratamiento de suelos con alta concentración de hidrocarburos en experimentos de laboratorio y de campo. El seguimiento y control del proceso se ha realizado a través de la medición de hidrocarburos totales, nitrógeno amoniacal, fósforo disponible y recuento de microorganismos aeróbicos. Se ha partido de suelos con concentraciones de hidrocarburos totales en algunos casos superiores al 20 % (peso/peso) y en la mayor parte de los casos se ha trabajado estimulando la población microbiana autóctona. También se han realizado experiencias de inoculación con *cultivos mixtos definidos* de bacterias, levaduras y hongos. Se ha observado una mineralización creciente del hidrocarburo hasta prácticamente desaparecer al cabo de 18 meses de tratamiento. En todos los casos ha habido desarrollo de vegetación espontánea después del tratamiento.

INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos por hidrocarburos es un problema importante en la mayor parte de los países productores. Los procesos de biorremediación han sido exitosamente aplicados en limpieza de suelos y en la actualidad se cuenta con diversas tecnologías. La biorremediación es considerada como la más deseable aproximación a la remediación de suelos contaminados en contraste a alternativas mucho más costosas y de menor aceptación pública tales como la incineración. Las técnicas de biorremediación correctamente aplicadas son aceptables desde el punto de vista ecológico. La bioremediación implica el uso de microorganismos autóctonos o alóctonos para degradar contaminantes del suelo. Los tratamientos biológicos de degradación en suelo pueden ser eficientes y económicos si las condiciones de biodegradación son optimizadas. El proceso de degradación requiere control de variables operacionales tales como nutrientes, humedad y oxígeno.

La primer pregunta que se formula quien debe optar por una técnica biológica para tratamiento tanto in-situ como ex-situ es si resultará *eficiente*, es decir si será posible obtener tasas suficientemente altas de degradación a bajo costo y si se logrará limpiar el suelo hasta los niveles requeridos por las regulaciones ambientales, es decir si obtendrá un *aceptable punto final* en un periodo de tiempo acotado. Además se pregunta si son técnicas predecibles, factibles de ser cuantificadas en término de costos y beneficios. Y, como pregunta de fondo siempre presente, si es necesario o indispensable incorporar productos biológicos tales como cultivos microbianos para lograr buenos resultados.

Cada situación debe ser cuidadosamente evaluada previo a iniciar cualquier procedimiento de remediación para lo cual es necesario recurrir a la aplicación de protocolos que contemplen todas las etapas previas de laboratorio y pilotos de campo. No resulta simple extraer conclusiones de carácter general en cuanto a la aplicabilidad de este tipo de técnicas habida cuenta de la naturaleza *intrínsecamente heterogénea* tanto del suelo como del tipo de las poblaciones microbianas que lo habitan y la diversidad de contaminantes. El sistema suelo es *espacialmente variable* y está demostrado que las propiedades químicas que juegan un importante papel en los procesos de *adsorción* de contaminantes tales como pH, textura y materia orgánica, muestran una distribución altamente variable.

Es conocido que un suelo contaminado con hidrocarburos puede en forma espontánea a través de procesos biológicos no inducidos reducir el nivel de contaminación con el paso del tiempo (bioatenuación natural) hasta llegar en algunos casos a *revertir* casi completamente el deterioro causado por sustancias contaminantes, con excepción de algunos compuestos recalcitrantes que resisten la acción microbiana

tales como algunos PAH's. El suelo puede recuperar la cubierta vegetal. En otros términos, el sistema suelo es capaz de reaccionar frente al componente agresor activando mecanismos tales como el incremento de especies microbianas capaces de transformar moléculas complejas en sustancias inocuas. Para ello actúan mecanismos de autoselección de especies.

Pero en otras ocasiones el suelo permanece "indefinidamente" contaminado sin que se observen signos de recuperación alguna. Esto significa que los recursos naturales con que el suelo se defiende han sido sobrepasados y los procesos de recuperación espontáneos no tienen lugar. Entonces aquí surge la pregunta sobre si es posible estimular la biodegradación y cómo hacerlo.

Para encarar una solución es necesario conocer cuáles son los requerimientos básicos para que exista biodegradación en suelo. Ellos son: presencia de microorganismos degradadores, adecuadas condiciones nutritivas y ambientales y ausencia de sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano. Es además de fundamental importancia que las sustancias contaminantes estén disponibles al ataque microbiano, aspecto que es crítico ya que la mayor parte de los procesos biológicos en suelo son limitados por fenómenos de transporte de sustancias más que por limitantes biológicos. La razón de este fenómeno no resulta suficientemente clara. Se atribuye principalmente a los equilibrios de adsorción-desorción y la distribución no homogénea del contaminante en la materia sólida. Trabajos recientes analizan individualmente los tres tipos de limitaciones mencionadas: degradabilidad, difusividad y desorptividad. Algunos trabajos sugieren que la difusión desde los agregados es el mecanismo limitante en la degradación de hidrocarburos.

Cuando el proceso degradativo no acontece espontáneamente se debe a que algunos de estos factores está incidiendo negativamente: contaminante no biodegradable, carencia o deficiencia de microorganismos apropiados, inadecuadas condiciones nutritivo-ambientales o presencia de sustancias inhibidoras del desarrollo microbiano. Una alta concentración de contaminante puede resultar inhibitoria. Las herramientas primarias con que se cuenta para inducir un proceso degradativo espontáneo en suelo son varias pero principalmente se pueden mencionar las siguientes: aireación por medio del laboreo, incorporación de fertilizantes para provisión de nitrógeno y fósforo, humectación controlada. Si la concentración de hidrocarburos es excesivamente elevada será necesario reducirla por dilución con suelo limpio y si la concentración de microbios no es suficiente será necesario incorporarlos.

Incorporar o no microorganismos es un tema de amplia discusión y controversia. Por una parte no siempre es posible estimular la población microbiana autóctona. Por otra parte el uso de microorganismos exógenos suele ofrecer escasas o nulas ventajas. Generalmente, los inóculos incorporados suelen trabajar bien solo para condiciones muy específicas en cuanto a tipo de suelo y tipo de contaminante. En contraste, aquellos productos que están formulados para un *amplio rango* de suelos y tipos de contaminantes suelen no ser efectivos y su aplicación puede significar un gasto innecesario. La gran diversidad microbiana que normalmente presenta un suelo contaminado, especialmente cuando ha transcurrido un tiempo prolongado desde el momento en que aconteció la contaminación, en donde se encuentran especies adaptadas tanto a las características del suelo como al tipo de contaminante, hacen que difícilmente prosperen y predominen especies exógenas en el largo término. No obstante en algunos casos deben ser evaluados los beneficios de una incorporación de cultivos. Es importante el rol de algunas especies de hongos y levaduras capaces de producir exoenzimas iniciadoras del proceso de biodegradación.

DESARROLLO

Las técnicas de biorremediación generalmente son aplicadas en suelos con concentraciones de hidrocarburos totales del orden del 5 a 8 %, extendiéndose estos valores a rangos mayores para suelos fácilmente aireables. Es necesario puntualizar que la determinación cuantitativa de hidrocarburos en suelo es compleja ya que la mayor parte de las técnicas se basan en la extracción de las diversas fracciones por solventes. La solubilidad de dichas fracciones en distintos solventes es variable. De allí que, como se observa en la figura 1, según sea el método utilizado para determinación de hidrocarburos se obtendrán valores diferentes, que para determinados tipos de suelos e hidrocarburos pueden ser muy marcados. De esto surge la importancia de especificar claramente el método determinativo usado. Los componentes del petróleo son generalmente agrupados en cuatro clases de acuerdo a su solubilidad en solventes orgánicos: saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos. No todos los componentes del crudo son rápidamente degradables por lo tanto los métodos analíticos para medición de hidrocarburos deben ser adecuadamente seleccionados. Las parafinas de cadenas cortas son los sustratos fácilmente degradables por los microorganismos seguidos en orden descendiente por las parafinas de cadena larga, isoparafinas, cicloparafinas, aromáticos, heterocíclicos, resinas y asfaltenos. Los compuestos polares y los asfaltenos son generalmente considerados resistentes a la biodegradación. El material

remanente se denomina "hidrocarburos totales de petróleo" (*TPH, total petroleum hydrocarbon*) y es considerado biodegradable. El método EPA 418.1 es usado para determinar la fracción de TPH en suelo. El método no es preciso pero es considerado satisfactorio para establecer comparaciones relativas en un determinado protocolo. Otro método que ha sido usado para determinación de hidrocarburos en suelo en la norma ASTM D-473. También ha sido analizado en un estudio reciente el uso de extracciones sucesivas con Clorofomo, Hexano, Etanol, (CIHeEt).

Los métodos analíticos para determinación de hidrocarburos en suelo usados en este trabajo son: **Norma ASTM D 473**, Standard Test Method for Sediment in Crude and Fuel Oils by Extraction, Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1980. **Norma EPA 418.1**, Petroleum Hydrocarbons Total Recoverable, Spectrophotometric, Infrared. STORET N 45501, 1978. Extracción sucesiva con Cloroformo, Hexano, Etanol (**CIHeEt**). En algunos casos se ha incluido en la determinación la materia orgánica residual por calcinación y para diferenciarla de la anterior la denominamos CIHeEt+C.

En ensayos de campo, sin incorporación de inóculos microbianos, se han obtenido degradaciones del orden del 50 % en seis meses de tratamiento, partiendo de concentraciones de entre 9 y 18 % de hidrocarburos totales medidos por la técnica gravimétrica de extracción con Cloroformo, Etanol y Hexano. En el caso del suelo contaminado a una concentración de 18 % en hidrocarburos totales, cuando se incluye en la determinación el porcentaje de producto calcinado esta aumenta a aproximadamente 30%. Una fracción del material orgánico medido por calcinación corresponde a hidrocarburos no extraídos por solventes. En la figura 2 se observa la curva de degradación obtenida durante un periodo de seis meses en un ensayo de campo sin inoculación sobre una superficie de 2000 m². La degradación obtenida es de 51.69 %. Se partió de una concentración de 103.5 g/kg medidos por ASTM D-473.

En ensayos de campo trabajando con residuos a concentraciones superiores a 20 % (extracción CIHeEt) e inoculando con cultivos mixtos de hongos, levaduras y bacterias se obtuvo una mineralización casi completa del residuo después de 18 meses de tratamiento. En la fase inicial del proceso degradativo se observó el desarrollo de microorganismos filamentosos. La iniciación de procesos degradativos por este tipo de microorganismos, es ampliamente reportado en la literatura. En la figura 3 se observa el desarrollo in vitro del residuo de hidrocarburo totalmente cubierto con micelio. A raíz de esta observación de campo se diseñó un experimento de laboratorio usando suelo contaminado a dos concentraciones distintas -moderada y alta contaminación- con el objeto de evaluar la *incidencia del inóculo en la fase inicial* de la biodegradación para lo cual se realizaron experiencias breves, de 60 días de duración, en columnas aireadas.

Del análisis de las curvas de este experimento de laboratorio se pueden ver los siguientes resultados: en altas concentraciones, aproximadamente 100 g/kg de hidrocarburos extractables por CIHeEt la concentración de hidrocarburos disminuye con el tiempo en forma casi paralela y no se observan diferencias significativas, lo que implicaría que en estas concentraciones no ofrece ventajas el uso de inóculos (figura 4). A bajas concentraciones aproximadamente 50 g/kg de hidrocarburos extractables por CIHeEt, en la primer fase del tratamiento se observan diferencias apreciables entre suelo inoculado y no inoculado, es decir se alcanzan concentraciones más bajas y se logran tasas de degradación mayores (figura 5). Si se analizan el efecto de la concentración de microorganismos sobre la degradación, en el caso de alta concentración cuando se inocula se observa que la población microbiana inicial es alta (1 E07) al principio del ensayo, sube cuatro órdenes de magnitud y luego cae al nivel inicial. La degradación alcanzada es del 23 % en el primer mes y de 36 % al segundo mes. Esta caída de la masa de microorganismos se traduce en una disminución de la tasa de degradación, posiblemente por un efecto de biodisponibilidad del hidrocarburo del suelo. Si se considera el comportamiento del suelo no inoculado, se encuentra que los microorganismos inicialmente están en una concentración tres órdenes de magnitud inferior, aumentan su concentración 2 órdenes de magnitud y luego disminuyen su concentración al 40 % del máximo alcanzado.

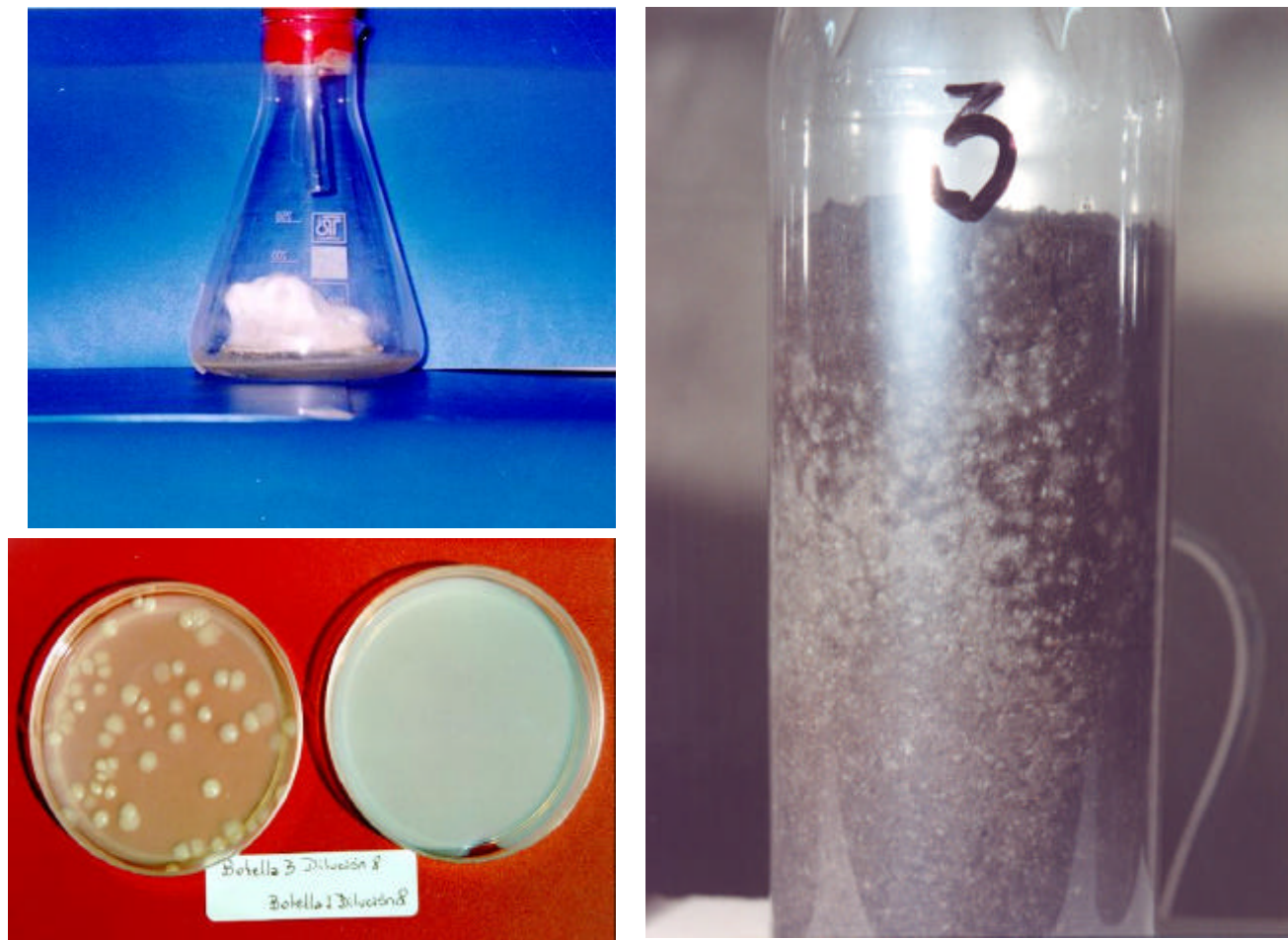


Figura 3. Ataque microbiano a suelos altamente contaminados y colonias de levaduras degradadoras de hidrocarburos.

La degradación es 15 % menor que en cuando se inoculó y la variación de las tasas de degradación también difieren en un 15 % (figura 6). Si se analiza el experimento a bajas concentraciones, el suelo inoculado inicia con una alta concentración microbiana (2 E07), sube un orden de magnitud y luego sigue creciendo sin llegar a incrementar otro orden de magnitud (7 E08). La degradación observada es muy alta en el primer mes (35 %) y luego disminuye sin llegar a la tercera parte de la tasa observada en el primer mes (43 % de degradación global). En cambio cuando se estimulan los microorganismos autóctonos, primero se produce un incremento muy elevado de la masa microbiana y se logra una baja degradación (2,3 %), mientras que en el segundo mes de tratamiento se produce un incremento significativo de la tasa de degradación lográndose una degradación total de 25 % (figura 7).

CONCLUSIONES

Las experiencias realizadas a largo de más de ocho años en laboratorio y en procedimientos de campo para tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos (más de 200 000 m³ de suelo), nos permite concluir que en la gran mayoría de los casos la población microbiana autóctona reacciona favorablemente a la estimulación (aireación, fertilización, humectación), haciendo innecesario el agregado de cultivos microbianos. No obstante, hemos observado que en algunas circunstancias el agregado de cultivos microbianos puede resultar beneficioso. En cuanto a los ensayos de *laboratorio* en columnas aireadas, del análisis de las curvas obtenidas en 60 días de proceso, surge que la mayor tasa de degradación se logra a bajas concentraciones de hidrocarburo con inoculación de cultivos microbianos (hay una gran masa de microorganismos y bajo efecto inhibitorio del hidrocarburo sobre los mismos). A altas concentraciones se tiene un comportamiento intermedio, en donde hay diferencias del orden de 15 % en la degradación alcanzada, siendo ligeramente mayor en el caso del suelo inoculado. (La incidencia de la inoculación en la fase inicial de suelos altamente contaminados es objeto de estudio actualmente en nuestro laboratorio).

BIBLIOGRAFÍA

- 1-J.A.Field, De. de Jong, G.Feijoo-Costa y J.A.M.de Bont. (1993). Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. Elsevier Science Publishers Ltd. 0167-7799/93/\$6.00
- 2- M.R.Trejo Hernández. Oxidación enzimática de compuestos tóxicos. 1996.Review para el curso de tratamiento de residuos. Morelos, México,
- 3-S.Roussos y I.Perraud-Gaime. Fisiología y Bioquímica de Microorganismos Utilizados en Procesos de Fermentación en Medio Sólido. E. Galindo Ediciones. 1996. Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería , pp. 341-348.
- Soc. Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. 1996.
- 4-S.Goszczyński, A. Paszczyński, M.B. Pasti-Grigsby, R.L.Crawford. 1994.New Pathway for degradation of Sulfonated Azo Dyes by Microbial Peroxidases of *P. cryosporium* and *S. chromofuscus*.Journal of Bacteriology, Mar. 1994, p. 1339-1347.
- 5-S.D.Aust y J.A.Bumpus. Biodegradation of Halogenated Hydrocarbons. 1987.National Environmental Publications Information. EPA. Environmental Research Brief. 1.600M87012.
- 6- M.K.Bacic y D.C.Yoch. Jan 1998. In vivo characterization of Dimethylsulfoniopropionate Lyase in the Fungus *Fusarium lateritium*. Applied Environmental microbiology.. p.106-111, Vol.64 N°1.
- 7-Durrant.L.R. March 1996.Degradation of Lignocellulosic Materials By Facultatively Anaerobic Soil Fungi. LABS 2. p.7-9.
- 8-Matheus,D.R., Okino,L.K., Grandi,R.A.P,Bononi,V.L.R. March 1996.Fungi from organochlorine-contaminated Soil. LABS 2. p.134-135.
- 9-Rodrigues,E.G.C., Menezes,E.P., Santa Anna, L.m.M., Vital,R.L., Sebastian,G.V.. March 1996.Oil Degrading microorganisms. LABS 2. p.144.
- 10-Verstraete W., Top E., Vanneck P., De Rore H. and Genouw G. Lessons from the Soil. Centre for Environmental Studies, University of Ghent, Coupure L 653, 9000 Ghent, Belgium.
- 11-Errampalli D., Trevors J.T., Lee H., Leung K., Cassidy M., Knoke K., Marwood T., Shaw K., Blears M.and Chung E.1997. Biorremediation: A Perspective. Journ.of Soil Contamination, 6(3):207-218.
- 12-Strauss H.S.Ph.D. 1997. Is Biorremediation a Green Technology? Journ. of Soil Contamination, 6(3):219-225.
- 13-Piehl M.F. and Paerl H.W. 1996. Enhanced biodegradation of diesel fuel through the addition of particulate organic carbon and inorganic nutrients in coastal marine waters. Biodegradation 7: 239-247.
- 14- Löser C. Seidel H., Zehnsdorf A. Stottmeister U. 1998. Microbial degradation of hydrocarbons in soil during aerobic/anaerobic changes and under purely aerobic conditions.Appl.Microbiol.Biotechnol 49:631-636.
- 15- Jang-Young Lee, Jae-Rang Roh and Hak-Sung Kim. 1993. Metabolic Engineering of *Pseudomonas putida* for the Simultaneous Biodegradation of Benzene, Toluene and p-Xylene Mixture. Biotech. and Bioeng. Vol. 43, Pp.1146-1152.
- 16-Löser C., Seidel H., Hoffmann P. and Zehnsdorf A. Bioavailability of Hydrocarbons during Microbial Remediation of a Sandy Soil. 1998. Appl. Microb. Biotechnol., In Press.
- 17- Kyu-Jin Yum and J.J. Peirce. 1997. Statistical determination of Steady State Condition in Biorremediation Tests. Biotechnology Letters, Vol. 19, N° 8, pp. 763-769.
- 18- Breidenbach C. and Müller R. 1995. Which Parameters Influence the Degradative Abilities of Added Microorganisms in soil? 1995. Contaminated Soil'95, 1163-1164.
- 19- Walter M.V., Nelson E.C., Firmstone G., Clayton M.J. Simpson S. and Spaulding S. 1997. Surfactant Enhances Biodegradation of Hydrocarbons: Microcosm and Field Study. Journ. of Soil Contamination, 6(1): 61-77.
- 20- Radwan S.S., Sorkhoh N.A., El-Nemr I.M. and El-Desouky A.F. 1997. A feasibility study on seeding as a bioremediation practice for the oily Kuwaiti desert. Journ. of Applied Microbiology 83, 353-358.
- 21- Pradhan S.P., Paterek J.R., Liu B.Y., Conrad J.R. and Srivasta V.J. 1997. Pilot Scale Bioremediation of PAH-Contaminated Soils. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 63-65.
- 22- Salanitro J.P., Dorn P.B., Huesemann H., Moore K.O., Rhodes Y., Rice Jackson L.M., Vipond T.E. Western M.M. and Wisniewski H.L. 1997. Crude Oil Hydrocarbon Bioremediation and Soil ecotoxicity Assessment. Env. Sci.and Technol.31, 1769-1776.
- 23- Balba M.T., Al-Daher R. and Al-Awadhi N. 1997. Bioremediation of Oil- Contaminated desert Soil: the Kuwaiti Experience. Environment International, Vol. 24, N° 1/2, pp. 163-173.
- 24- Gen-Hsung Lin, Nancy E. Sauer and Teresa J. Cutright. 1996. Environmental Regulations: A Brief Overview of their Applications to Bioremediation. International Biodeterioration and Biodegradation 1-8.

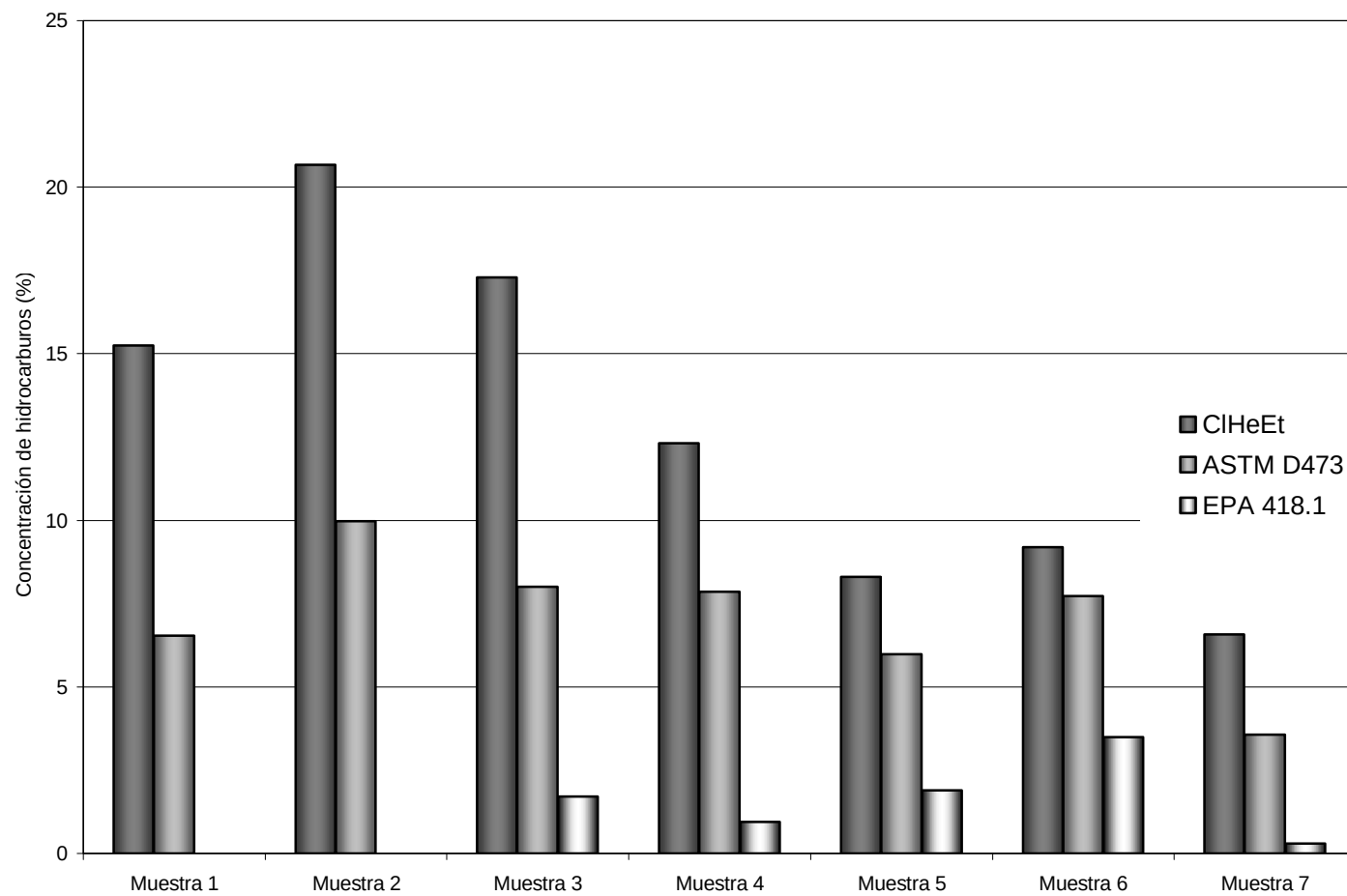


Figura 1. Comparación de concentración de hidrocarburos totales según distintas técnicas analíticas

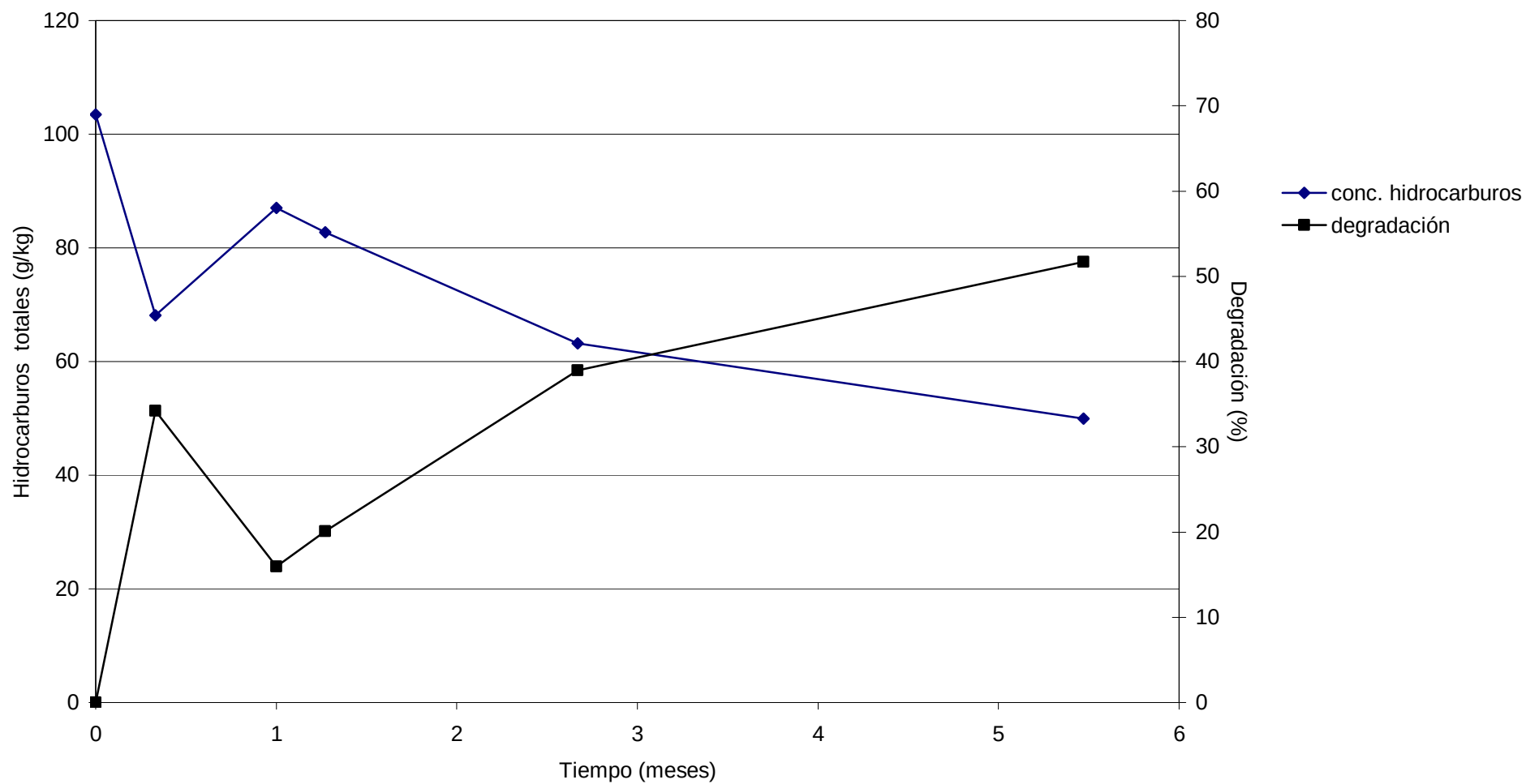


Figura 2. Biodegradación de hidrocarburos en enavos de campo (area de tratamiento: 2000 m²)

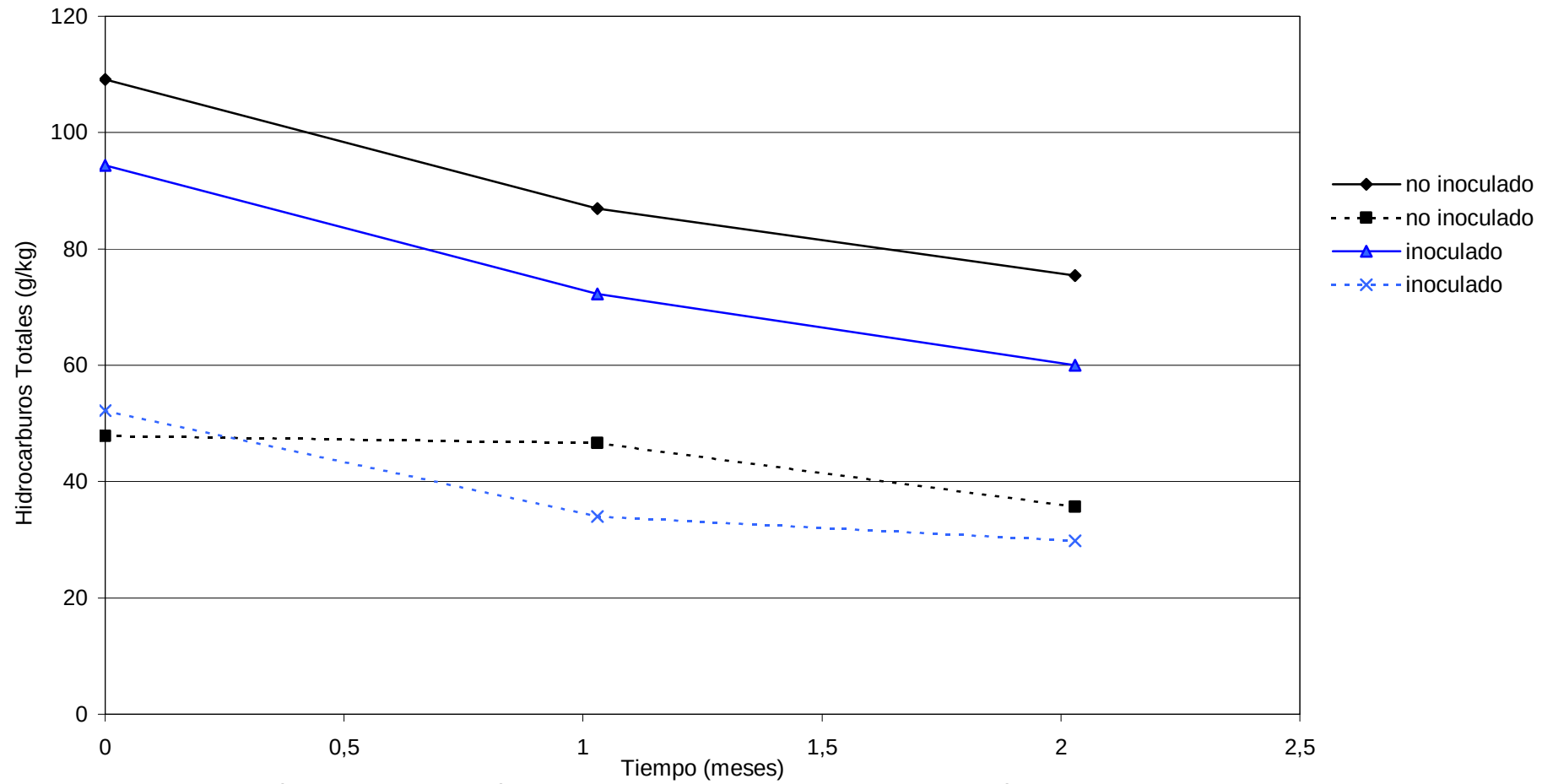


Figura 4. Influencia del inóculo y la concentración de Hidrocarburos Totales sobre la biodegradación. Ensayos de laboratorio en columna de suelo aireada.

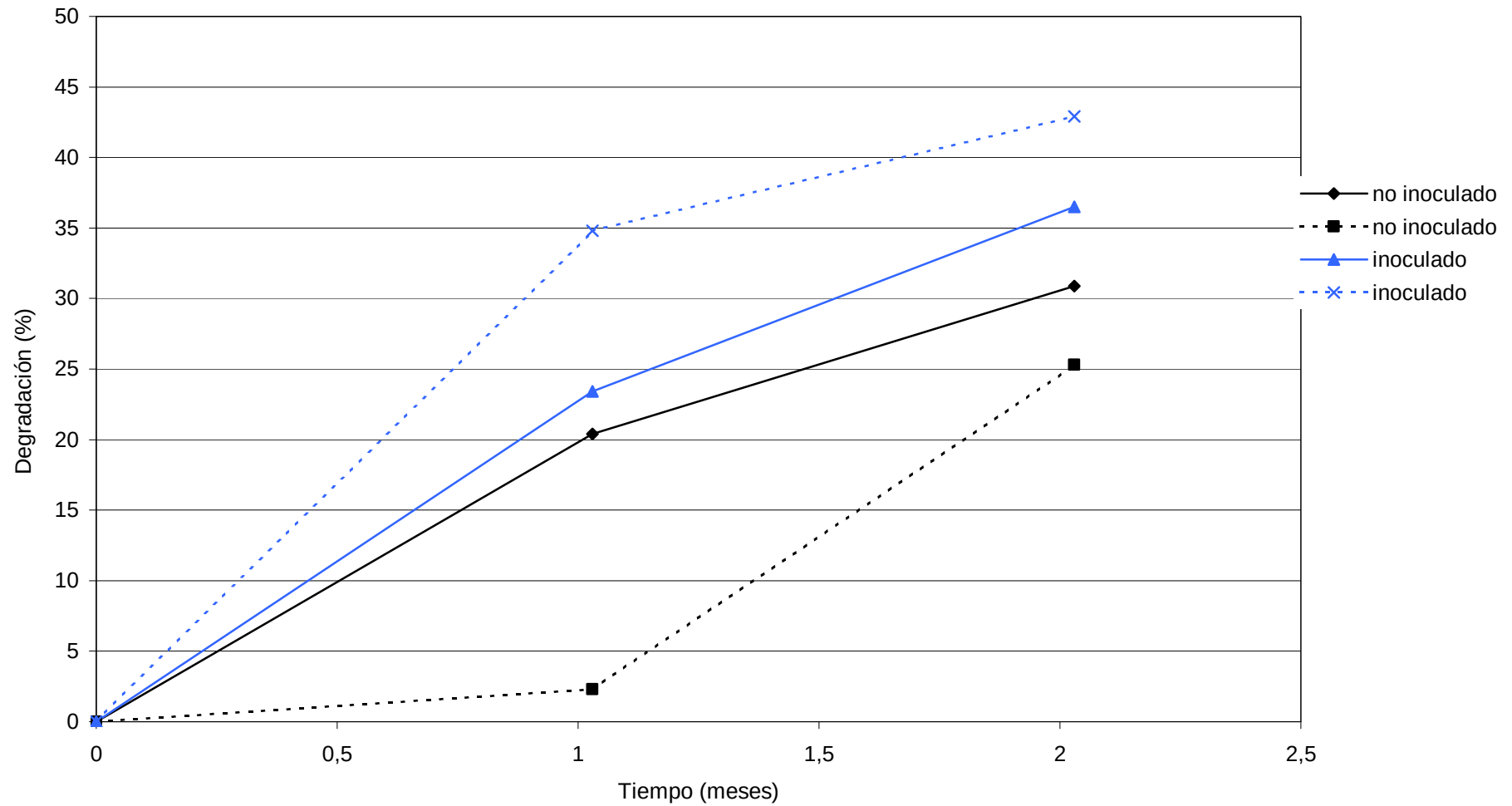


Figura 5. Influencia del inóculo y la concentración de Hidrocarburos Totales sobre la biodegradación. Análisis porcentual. Ensayos de laboratorio en columna de suelo aireada.

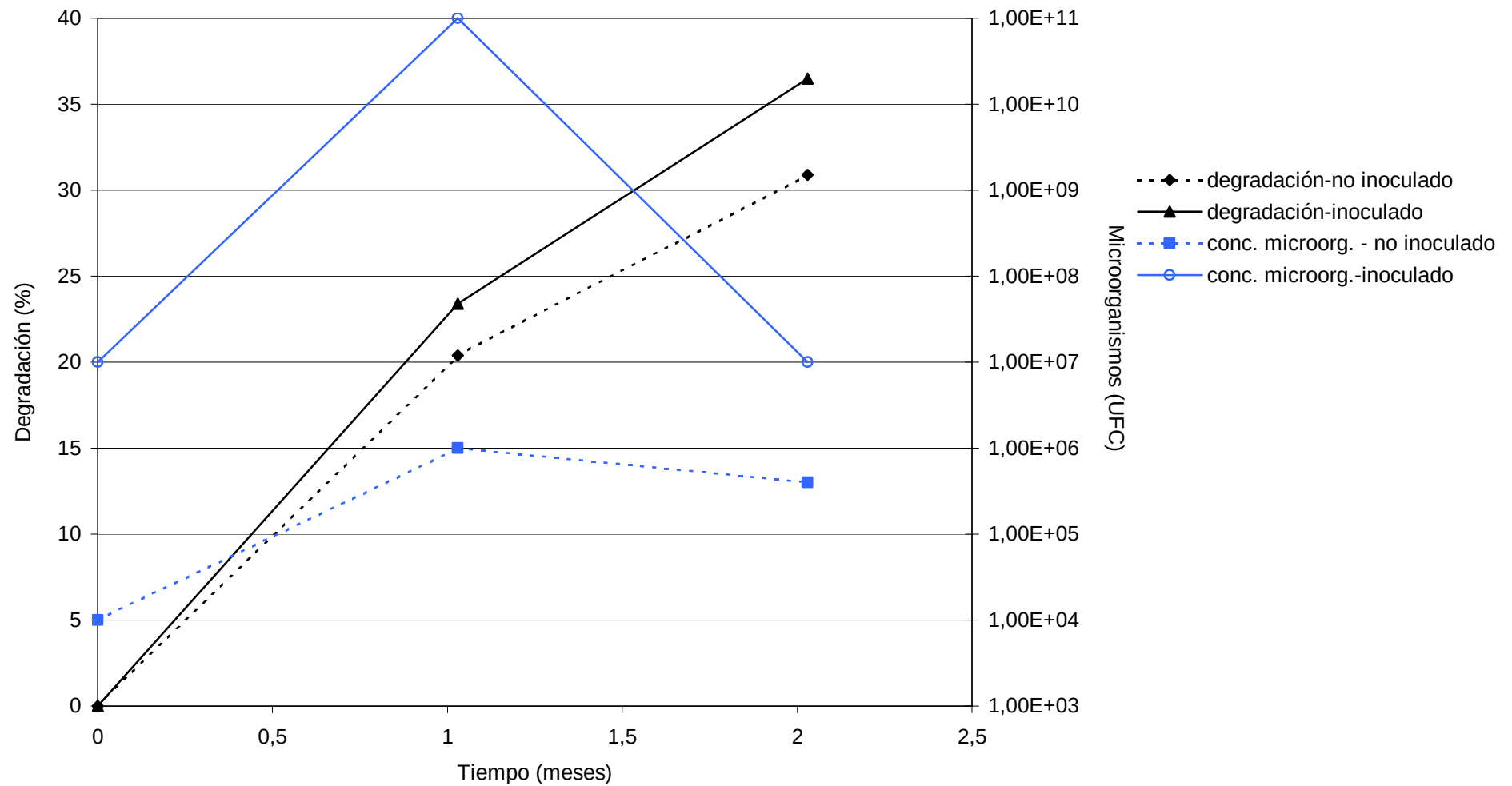


Figura 6. Efecto del inóculo en concentraciones altas de Hidrocarburos Totales

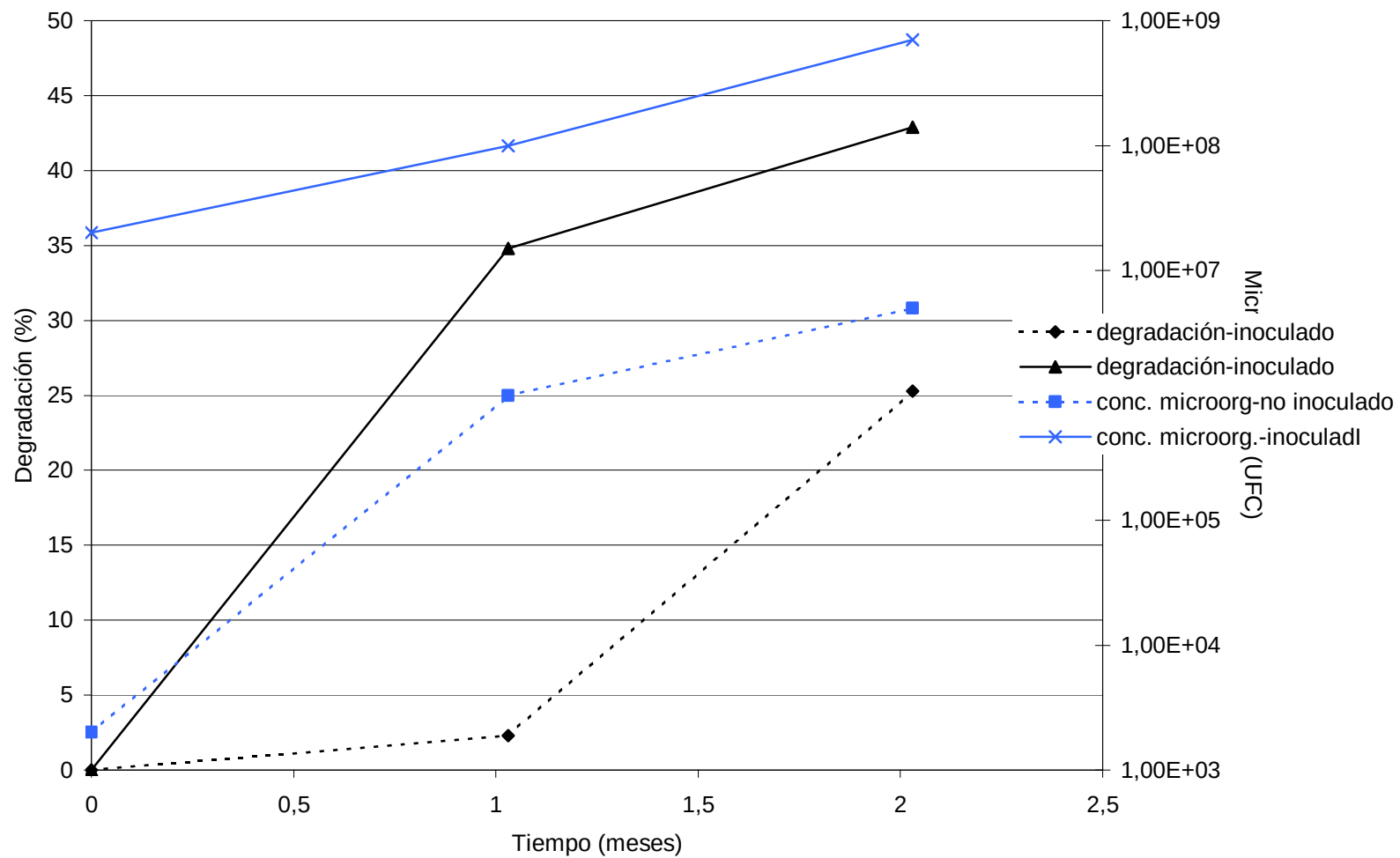


Figura 7. Efecto del inóculo en concentraciones bajas de Hidrocarburos Totales