



Biorremediación de un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo

Pilar Brettes, Josu Berganza e Ibai Nafarrate

GAIKER Centro Tecnológico, Basque Research and Technology Alliance (BRTA)

En este estudio se ha evaluado el potencial de la biorremediación para la descontaminación de un suelo contaminado con hidrocarburos procedentes de un vertido de combustible de un depósito de almacenamiento. A partir de los datos de la caracterización fisicoquímica y microbiológica del suelo contaminado, se diseñó un ensayo de bioestimulación utilizando diferentes enmiendas (compost, residuos del prensado de la manzana del procesado de elaboración de la sidra, urea y nitrato amónico) para evaluar la eficacia de cada condición ensayada en la reducción del contenido de hidrocarburos en el suelo. Las condiciones con enmiendas de compost y residuos de procesado de sidra mostraron las mayores reducciones en el contenido de hidrocarburos.

PALABRAS CLAVE: Biorremediación; Bioestimulación; Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPH); Enmiendas Orgánicas.

In this study, the potential of bioremediation for the decontamination of a soil contaminated with hydrocarbons from a fuel spill from a storage tank was evaluated. Based on the physicochemical and microbiological characterization data of the contaminated soil, a biostimulation trial was designed using different amendments (compost, apple pressing residues from the cider making process, urea and ammonium nitrate) to evaluate the effectiveness of each tested condition in reducing the hydrocarbon content in the soil. The conditions with compost amendments and cider processing residues showed the greatest reductions in hydrocarbon content.

KEYWORDS: Bioremediation; Biostimulation; Total Petroleum Hydrocarbons (TPH); Organic Amendments.

CONTEXTO PREVIO

En base al resumen previo de la presentación del artículo, de forma simultánea, se aislaron microorganismos presentes en el suelo capaces de utilizar hidrocarburos como única fuente de carbono y energía. Se aislaron 14 cepas microbianas con diferentes perfiles bioquímicos y se identificaron mediante secuenciación masiva. De las catorce cepas aisladas se seleccionaron siete, en función de su nivel de riesgo biológico y de las evidencias procedentes de revisiones bibliográficas que las asociaban con la capacidad de biodegradar hidrocarburos. Las cepas finalmente seleccionadas pertenecían a los géneros *Rhodococcus* sp., *Gordonia* sp., *Achromobacter* sp., *Nocardioides* sp., *Pseudarthrobacter* sp. y *Luteibacter* sp.

Estas cepas se evaluaron en cultivos puros para determinar su capacidad de degradar hidrocarburos con el objetivo de evaluar su idoneidad para ser utilizadas en un futuro en una estrategia de bioaumentación aplicable a suelos contaminados con hidrocarburos. Estos aislamientos se relacionaron positivamente con la eficiencia de eliminación de TPH en ensayos a escala microcosmos.

INTRODUCCIÓN

La contaminación de los suelos debida a derrames de los depósitos de almacenamiento de combustible supone un grave peligro medioambiental. Además, la mayoría de los compuestos que componen los combustibles fósiles tienden a permanecer en el medio ambiente durante un largo periodo de tiempo. Estos contaminantes presentan diferentes riesgos para la salud humana y la ambiental.

La opción utilizada mayoritariamente para la gestión de estos suelos contaminados ha sido la excavación y disposición en vertedero, al resultar una opción rápida y económica, aunque medioambientalmente insostenible y poco eficiente. Esta opción implica el desplazamiento de la contaminación de una zona a otra, sin abordar su tratamiento. El problema sigue existiendo y es un

legado que se deja a las siguientes generaciones.

Aunque ciertamente no existe una técnica ideal o única aplicable a todos los casos y situaciones de contaminación de un suelo (al fin y al cabo, una gran variedad de factores determina la selección de las mejores técnicas y prácticas disponibles) es un hecho que en la actualidad existe una clara voluntad de potenciar técnicas más sostenibles de descontaminación.

En la última década, con el impulso del gran pacto verde europeo, nos hemos concienciado de la importancia de la salud, tanto de la humana como medioambiental, y por ello se está apostando por las tecnologías basadas en la naturaleza (*Nature-based Solutions* - NbS). Una de ellas es la biorremediación que, en contraste con las técnicas tradicionales, presenta ventajas importantes como su menor coste y, sobre todo, su menor impacto ambiental, lo que redundará en la protección de la integridad y funcionalidad de los ecosistemas y en la aceptabilidad social como tecnología limpia y sostenible.

La biorremediación puede definirse como el uso de organismos vivos, entre los que se encuentran los microorganismos, para degradar o eliminar compuestos contaminantes. En particular, es un proceso en el que los contaminantes orgánicos presentes en el medio ambiente son degradados por microorganismos para finalmente convertirlos en compuestos inocuos.

La biorremediación está reconocida como una tecnología de tratamiento para los suelos contaminados por petróleo [1] y se considera rentable y respetuosa con el medio ambiente. Las principales estrategias de biorremediación son la bioaumentación y la bioestimulación [2-4].

La bioaumentación consiste en la introducción en el medio contaminado de un cultivo enriquecido con uno o varios microorganismos con capacidades para la degradación del contaminante objetivo [5]. La inoculación de estas bacterias exógenas pue-

de acelerar la eliminación de dichos contaminantes y, por tanto, reducir el tiempo de tratamiento. Sin embargo, estos microorganismos tienen que competir con las poblaciones microbianas autóctonas ya presentes en el ecosistema del suelo, y que están muy adaptadas a este entorno. Por ello, esta estrategia muchas veces no da unos resultados positivos. [6].

El proceso de bioestimulación consiste en la adición de nutrientes esenciales como son el nitrógeno y el fósforo, con el objetivo de estimular el crecimiento y la actividad metabólica de la población microbiana autóctona del suelo [7-9]. Esto se debe a que los microorganismos necesitan principalmente carbono (C) para generar nueva biomasa. Los contaminantes y los compuestos orgánicos naturales del suelo suelen proporcionar una cantidad adecuada de carbono, pero la disponibilidad de otros nutrientes esenciales como el nitrógeno (N) o el fósforo (P) puede ser insuficiente en comparación con la cantidad de carbono. La relación óptima de estos nutrientes C:N:P oscila entre 100:5-10:0.5-1 [10, 11]. No obstante, un exceso de nutrientes puede alterar el equilibrio de nutrientes, provocando un déficit de oxígeno [12].

Por otro lado, la generación de residuos orgánicos, tanto de origen animal como vegetal, ha aumentado en los últimos años, en paralelo con el crecimiento de la población. El compostaje es el principal proceso de estabilización de residuos sólidos agrícolas y residuos sólidos urbanos (RSU) [13]. El uso de biomásas recicladas, como es el compost, se ha convertido en los últimos años en un importante procedimiento agronómico, que puede contribuir al reciclaje de la materia orgánica y restaurar la fertilidad de los suelos.

Teniendo en cuenta todo esto, este estudio se planteó con el objetivo de demostrar la eficiencia de la estrategia de bioestimulación para la biorremediación de un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo (TPH) y la implicación en el proceso de microorganismos del

propio suelo con capacidades degradadoras de estos contaminantes. En el estudio se comparó el efecto de la adición de enmiendas orgánicas derivadas del tratamiento de residuos (compost) y de procesos alimentarios (residuo del prensado de manzana para la producción de sidra) y de fertilizantes, tanto sales orgánicas (urea) como inorgánicas (nitrato amónico) en la biodegradación de los hidrocarburos del suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS MUESTREO Y CARACTERIZACIÓN DEL SUELO CONTAMINADO

El suelo contaminado se encontraba en una antigua fundición que lleva cerrada más de 20 años. En unos trabajos de recuperación del terreno de esta ruina industrial se encontró enterrado un antiguo depósito de combustible fósil. El tanque se había roto por efecto del tiempo y se encontró que los últimos restos del combustible se habían derramado por el subsuelo. La zona fue excavada dejando el suelo contaminado apilado en el exterior del terreno, junto con el tanque de combustible que se gestionó como residuo peligroso.

Antes de comenzar el estudio se tomaron distintas réplicas de este suelo contaminado para el análisis microbiológico y fisicoquímico (Tabla 1). Estas muestras se compusieron de diferentes submuestras tomadas aleatoriamente con el fin de tener una muestra

representativa de todo el suelo excavado (Figura 1).

La caracterización microbiológica ha consistido en un recuento del total de microorganismos aerobios y una estimación del total de microorganismos presentes en el suelo mediante amplificación por PCR de los genes 16S rRNA conservados.

El pH y la conductividad se analizaron por electrometría. El contenido en carbono, nitrógeno y fósforo se analizó por infrarrojo (IR), fotometría y espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP/MS), respectivamente.

El análisis de hidrocarburos (TPH C10-C40) se realizó por cromatografía de gases y detector de ionización por llama (GC/FID).

CONFIGURACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL ESTUDIO

Para este estudio se prepararon distintas condiciones de bioestimulación, comparando la adición de enmiendas orgánicas (compost y residuo de manzana) y de sales ricas en nitrógeno (urea y nitrato amónico) ya que es el nitrógeno el elemento desbalanceado del ratio de carbono, nitrógeno y fósforo (C:N:P) del suelo contaminado.

Para cada condición (Tabla 2) se prepararon cubetos con 1 kg de la muestra de suelo con las distintas enmiendas. Las enmiendas orgánicas se adicionaron al suelo en estado sólido en una relación en peso de 85:15 suelo:enmienda. Las sales nitrogenadas se añadieron en disolución en agua ultrapura, de tal manera que la

FIGURA 1. Imagen del muestreo del suelo contaminado con hidrocarburos



TABLA 1.

RESULTADOS MEDIOS DEL ANÁLISIS POR TRIPLICADO DEL SUELO CONTAMINADO EXPRESADO SOBRE PESO SECO DE MUESTRA

Parámetros	Unidades	Suelo contaminado
pH		8,38
Conductividad 25 °C	µS/cm	339
Carbono total	% (w/w)	4,60
Nitrógeno total	mg/kg	787
Fósforo total	mg/kg	762
Hidrocarburos totales C10-C40	mg/kg	1000
Microorganismos aerobios totales	ufc/g	4,2E+05
Estimación microorganismos totales por PCR 16S rRNA	Copias genoma/g	4,0E+08

TABLA 2.

CONDICIONES DEL ESTUDIO DE BIOESTIMULACIÓN

Control biótico
Enmendado con compost
Enmendado con residuo del triturado de manzana
Adición de urea (C:N:P) (100:5:2)
Adición de nitrato amónico (C:N:P) (100:5:2)
Adición de nitrato amónico (C:N:P) (100:10:2)

relación C:N:P se ajustó a 100:5:1. Para el nitrato amónico se preparó una condición más con un ajuste de C:N:P a 100:10:1. También se preparó un control biótico con el suelo contaminado sin adición de enmiendas ni nutrientes.

Las muestras se mantuvieron con la humedad en el entorno del 70 % de la capacidad de campo mediante la adición de agua ultrapura. Los suelos se voltearon periódicamente para aumentar la tasa de aireación. Los cubetos se mantuvieron cubiertos con una lona oscura, en el interior del laboratorio a temperatura ambiente.

Durante el tratamiento que duró 140 días se tomaron mensualmente muestras de suelo para el análisis microbiológico y para la cuantificación del contenido en TPH.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS

Para aislar los microorganismos biodegradadores de hidrocarburos presentes en el suelo contaminado, se incubaron las muestras de suelo recogidas en un caldo Bushnell Haas, con las sales mínimas necesarias para los microorganismos, al que se añadieron hidrocarburos en forma de aceite mineral, como única fuente de carbono. Estas muestras se incubaron durante 7 días a 30°C con agitación orbital, posteriormente, se realizaron 4 reincubaciones sucesivas en el mismo medio de cultivo con el objetivo de seleccionar las cepas de microorganismos capaces de crecer con los hidrocarburos como única fuente de carbono.

Tras las sucesivas incubaciones en el medio líquido, las muestras resultantes se sembraron en agar Bushnell Haas con aceite mineral y se incubaron a 30 °C durante 72 horas con el objetivo de aislar colonias independientes. Se seleccionaron 14 colonias diferentes en función de su distinta morfología colonial y de los distintos perfiles metabólicos determinados mediante pruebas bioquímicas.

Finalmente, las cepas aisladas se

analizaron por secuenciación masiva, con la tecnología Illumina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la monitorización (Figura 2) realizada durante el tratamiento de bioestimulación se observó un aumento de los microorganismos aerobios totales, siendo mayor este crecimiento en las condiciones donde se habían aplicado las enmiendas orgánicas, alcanzando 2,1E+07 ufc/g en la condición de tratamiento del suelo con el residuo del triturado de manzana. En las condiciones de atenuación natural y en las tratadas con las sales

de nitrógeno también se observó un incremento en el número de microorganismos que, o bien se mantuvo o bien decreció ligeramente mientras duró el tratamiento. Sin embargo, en la condición de control biótico se observó que el número de microorganismos decreció ligeramente, no llegando a superar un contenido de 5,0E+04 ufc/g.

En paralelo, la concentración de hidrocarburos (Figura 3) se mantuvo constante en todas las condiciones, excepto en los tratamientos con enmiendas orgánicas en los que se produjo una disminución en su concen-

FIGURA 2. Evolución del número de microorganismos aerobios mesófilos (ufc/g) durante los 140 días del estudio de bioestimulación, para las diferentes condiciones ensayadas

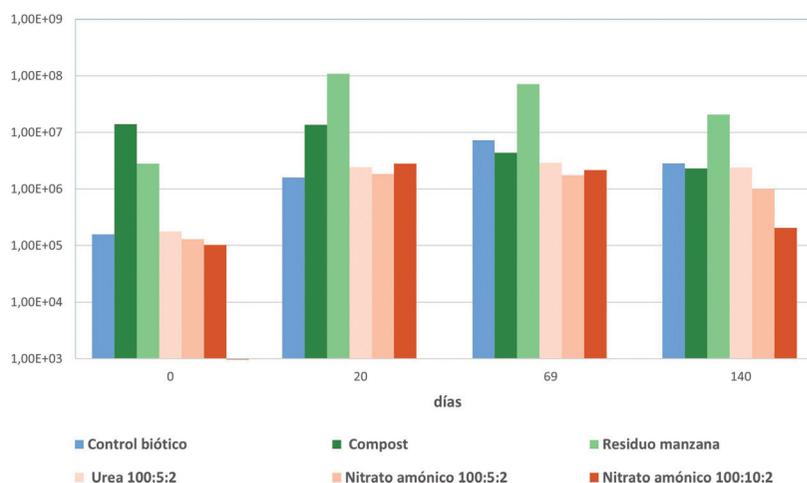
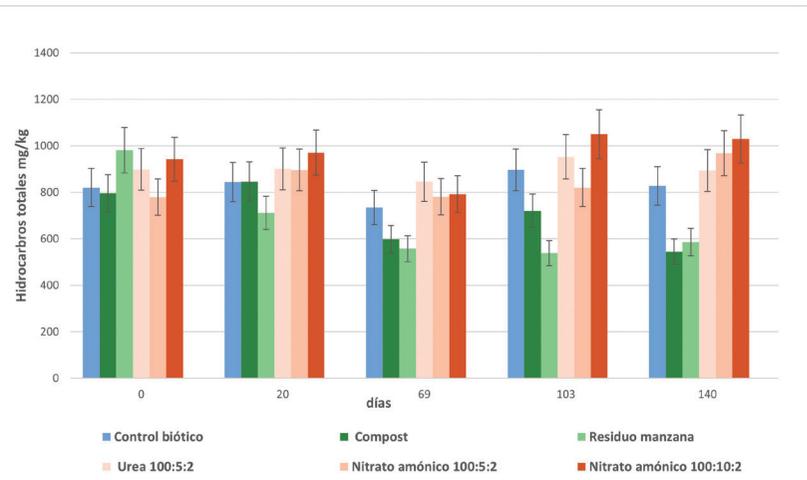


FIGURA 3. Evolución del contenido en hidrocarburos totales del petróleo (mg/kg expresados sobre peso seco) durante los 140 días del estudio de bioestimulación, para las diferentes condiciones ensayadas



tración. Así, el rendimiento de reducción de hidrocarburos fue del 31 % y del 40 %, para el tratamiento con compost y con el residuo de triturado de manzana, respectivamente.

Esto concuerda con estudios que han demostrado que las enmiendas orgánicas son más eficaces para aumentar el contenido de materia orgánica del suelo e incrementar la actividad microbiana que los fertilizantes inorgánicos [14]. Otros investigadores han realizado hallazgos similares que demuestran que es más probable que los nutrientes orgánicos se liberen en el medio ambiente lentamente y durante un periodo más largo, y con un impacto beneficioso en el microbioma del suelo [15-16].

En el proceso de aislamiento de las cepas degradadoras de hidrocarburos (Figura 4) presentes en el suelo contaminado se obtuvieron 14 cepas distintas. Estas 14 cepas bacterianas aisladas del suelo se identificaron mediante secuenciación masiva del gen 16S rRNA utilizando los primers bacterianos universales 27F y 1492R.

De estos aislamientos se seleccionaron 7 en base a su nivel de riesgo biológico y a las evidencias de revisiones bibliográficas que las asociaban con la capacidad de biodegradar hidrocarburos. Las cepas finalmente seleccionadas pertenecían a los géneros *Rhodococcus* sp., *Gordonia* sp., *Achromobacter* sp., *Nocardioi-des* sp., *Pseudarthrobacter* sp. y *Luteibacter* sp.

Las cepas aisladas se evaluaron en cultivos puros independientes para determinar la capacidad en solitario de cada cepa para degradar hidrocarburos. Los resultados de los cultivos mantenidos durante 12 días (Figura 5) muestran que la cepa *Gordonia amicalis* es la que presenta la mayor capacidad de biodegradación de hidrocarburos en solitario, llegando a alcanzar una reducción de TPH del 85 %.

CONCLUSIONES

Se ha demostrado que la estrategia de bioestimulación de las especies

FIGURA 4. Bacterias aisladas del suelo contaminado con hidrocarburos

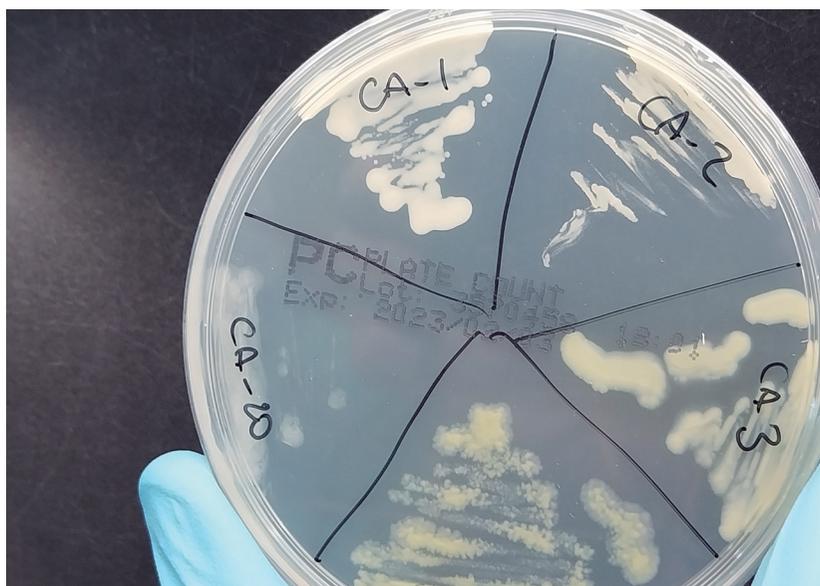
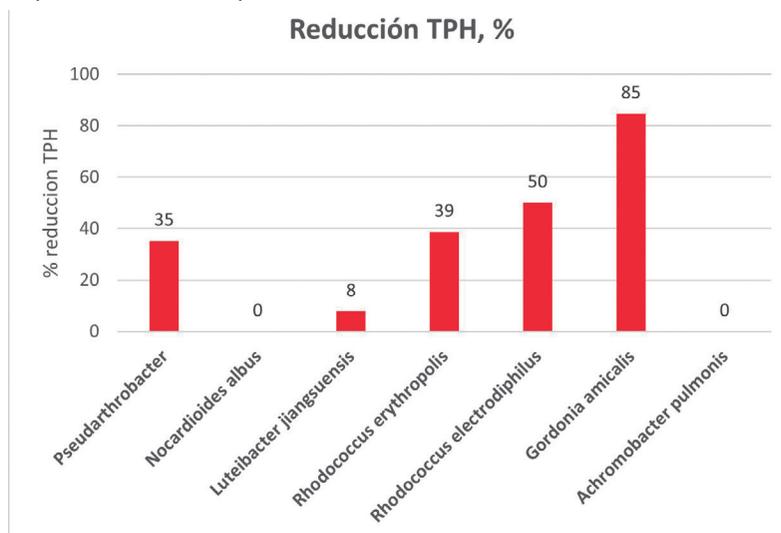


FIGURA 5. Rendimiento del consumo de hidrocarburos de los cultivos puros independientes de las cepas microbianas aisladas del suelo contaminado



bacterianas autóctonas de un suelo contaminado con hidrocarburos (TPH), con enmiendas orgánicas, favorece la biodegradación de estos compuestos contaminantes. También se ha demostrado que un suelo con hidrocarburos puede contener microorganismos con capacidades degradadoras, pero que estos necesitan ser adecuadamente estimulados para metabolizar los compuestos contaminantes.

Agradecimientos

Esta investigación se enmarca dentro del proyecto SYMBIOREM del programa europeo HORIZON EUROPA (Grant Agreement ID:101060361 Agradecimiento a la unidad de Biotecnología y Ciencia del Microbioma,

Departamento de Farmacia y Biotecnología de la Universidad de Bolonia.

Bibliografía

- [1] Cerqueira, V.S., Peralba, M.D.C.R., Camargo, F.A.D.O., Bento, F.M., 2014. "Comparison of bioremediation strategies on soil impacted with petrochemical oily sludge". *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 95, 338-345.
- [2] Benyahia, F., Embaby, A.S., 2016. "Bioremediation of Crude Oil Contaminated Desert Soil: Effect of Biostimulation, Bioaugmentation and Bioavailability in Biopile Treatment Systems". *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13, 219.
- [3] Polyak, Y.M., Bakina, L.G., Chugunova, M.V., Mayachkina, N.V., Gerasimov, A.O., Bure, V., 2018. "Effect of remediation strategies on biological activity of oil-contaminated soil—A field study". *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 126, 57-68.
- [4] Safdari, M.-S., Kariminia, H.-R., Rahmati,

M., Fazlollahi, F., Polasko, A., Mahendra, S., Wilding, W.V., Fletcher, T.H., 2018. "Development of bioreactors for comparative Study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated". *Soil. J. Hazard Mater.*, 342, 270–278.

[5] Ramadass, K., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R., 2018. "Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil: Impact of bioaugmentation mediated by *pseudomonas* spp. on bioremediation". *Sci. Total. Environ.*, 636, 968–974.

[6] Garbisu, C., Garaiurrebaso, O., Epelde, L., Grohmann, E., Alkorta, I., 2019. "Plasmid-Mediated Bioaugmentation for the Bioremediation of Contaminated Soils". *Frontiers in Microbiology*, 8, 1966.

[7] Kauppi, S.; Sinkkonen, A.; Romantschuk, M., 2011. "Enhancing bioremediation of diesel-fuel-contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation". *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 65, 359–368.

[8] Yaman, C., 2020. "Performance and Kinetics of Bioaugmentation, Biostimulation, and Natural Attenuation Processes for Bioremediation of Crude Oil-Contaminated Soils". *Processes*, 8, 883.

[9] Abed, R.M.; Al-Sabahi, J.; Al-Maqrashi, F.; Al-Habsi, A.; Al-Hinai, M., 2014. "Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments". *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 89, 58–66.

[10] Zhang, K.; Wang, S.; Guo, P.; Guo, S., 2021. "Characteristics of organic carbon metabolism and bioremediation of petroleum-contaminated soil by a mesophilic aerobic biopile system". *Chemosphere*, 264, 128521.

[11] BATELLE, 1996. "Biopile design and construction manual - Technical Memorandum, TM-2189-ENV".

[12] Mekonnen, B.A., Aragaw, T.A., Genet, M.B., 2024. "Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: a review on principles, degradation mechanisms, and advancements". *Front. Environ. Sci.*, 12:1354422.

[13] Chen, M., Xua, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., Zhang, J., 2015. "Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs". *Biotech. Adv.*, 33, 6 (1), 745-755.

[14] Macci, C.; Doni, S.; Peruzzi, E.; Mennone, C.; Masciandaro, G., 2019. "Biostimulation of soil microbial activity through organic fertilizer and almond tree association. *Land Degrad. Dev.*, 27, 335–345.

[15] Liu, Z.; Rong, Q.; Zhou, W.; Liang, G., 2017. "Effects of inorganic and organic amendment on soil chemical properties, enzyme activities, microbial community and soil quality in yellow clayey soil". *PLoS ONE*, 12, e0172767.

[16] Zhao, Y.; Chen, Y.; Dai, H.; Cui, J.; Wang, L.; Sui, P., 2021. "Effects of organic amendments on the improvement of soil nutrients and crop yield in sandy soils during a 4-year field experiment in Huang-Huai-Hai Plain, Northern China". *Agronomy*, 11, 157. 

Abreviaturas

NbS: Nature-based Solutions

C: Carbono

N: Nitrógeno

P: Fósforo

RSU: Residuos Sólidos Urbanos

TPH: Total Petroleum Hydrocarbons

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RNA: Ácido Ribonucleico

Ribosómico

IR: Infrarrojo

ICP/MS: Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo

GC/FID: Cromatografía de Gases y Detector de Ionización por Llama

UFC: Unidades Formadoras de Colonias