

LA BIOREMEDIACIÓ

ANNA MARIA SOLANAS

Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona.

Adreça per a la correspondència: Anna Maria Solanas. Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona. Diagonal, 645. 08028 Barcelona.
Adreça electrònica: *asolanas@ub.edu*.

RESUM

La biotecnologia de la bioremediació es basa a aprofitar les capacitats metabòliques dels microorganismes per degradar els contaminants químics presents en diferents matrius ambientals, majoritàriament sòls, incloent-hi les aigües subterrànies. Fins avui dia, la tipologia de contaminants amb la qual s'ha mostrat més eficaç són els hidrocarburs. En la majoria de casos es basa a estimular les poblacions microbianes presents a l'emplaçament mateix, atesa la seva adaptació a la presència dels contaminants. En altres ocasions s'afegeixen inòculs microbians obtinguts al laboratori amb les capacitats catabòliques adients. Abans de portar a terme una bioremediació s'han de conèixer les poblacions microbianes presents i els factors ambientals que les condicionen amb l'aplicació dels assaigs de tractabilitat. A diferència d'altres països europeus, el nostre país està tot just començant, a causa del retard en l'aparició de la legislació pertinent. No obstant això, atès que les estimacions efectuades a Catalunya xifren en unes trenta mil les activitats potencialment contaminants del sòl, l'aplicació de les normatives aparegudes recentment comportarà un impuls per a aquesta matèria. En el cas concret de Catalunya es descriuen tres casos desenvolupats a escala pilot. Finalment, s'apunten diferents aspectes necessitats d'investigació que haurien de permetre ampliar la tipologia de contaminants susceptibles de ser tractats i reduir el temps de procés.

Paraules clau: bioremediació, sòls contaminants, bioestimulació, bioreforç.

BIOREMEDIATION

SUMMARY

The biotechnology of the bioremediation is based on the metabolic capacities of the microorganisms to degrade the chemical pollutants in different environmental compartments, especially soil including underground waters. Until the present time, the type

of pollutants more suitable to be treated by bioremediation are the hydrocarbons. In most of cases it is based on stimulating the microbial populations present in the location, given their high adaptation to the presence of the pollutants. In other cases microbial inocula, obtained in the laboratory with the appropriate metabolic capacities, are added. Before carrying out a bioremediation it is important to know the microbial populations present in the site and the environmental factors that they condition the biodegradation process by means of the application of feasibility assays. Contrary to other European countries, our country is in its beginnings due to the delay in the pertinent appearance of the normative ones. Nevertheless, keeping in mind that the estimates made in Catalonia calculate potentially in 30.000 the pollutants activities of the soil, the application of the normative recently appeared behaved an impulse in the matter. In the case of Catalonia, three scale pilot cases are described. Finally, different needy aspects of research are aimed that must allow to enlarge the typology of susceptible pollutants of being treated by bioremediation as well as reduce the time of the process.

Key words: bioremediation, polluted soils, biostimulation, bioaugmentation.

LA CONTAMINACIÓ QUÍMICA DELS SÒLS

A partir de la segona meitat del segle xx, i d'una manera creixent, la humanitat s'ha trobat amb un important repte que amenaça tant la seva salut com la del planeta que habita: la contaminació química ambiental. El que durant molts anys hem qualificat com *progrés* en diferents àrees, com ara el transport, la higiene, la construcció, l'agricultura o la salut, ha implicat mobilitzar materials que estaven immobilitzats (com el cas del petroli o dels metalls pesants) o introduir nous productes de síntesi química (detergents, pintures, plàstics, materials aïllants, plaguicides, fàrmacs, etc.).

Aquests productes s'originen en el que podríem anomenar la *tecnosfera*, on s'integren totes les activitats que porten envers el seu ús: extracció, producció, emmagatzematge, transport, distribució i consum. Malauradament, part d'aquests productes químics escapen accidentalment o intencionadament cap a l'ecosfera, i produeixen una contaminació química del medi, ja sigui de l'atmosfera, de les aigües dolces o marines, del sediments o del sòl, incloent-hi les aigües subterrànies.

Mentre la depuració d'aigües residuals constitueix una pràctica molt antiga i molt estesa en el món occidental, les tecnologies per descontaminar els sòls han aparegut de manera més recent. Tot just a la Cimera de Rio, l'any 1992 (ONU, 1992), es va reconèixer la importància de la protecció dels sòls i dels seus usos potencials en el context d'un desenvolupament sostenible i, en particular, contra la contaminació procedent d'accions o activitats d'origen antròpic.

MARC LEGISLATIU

L'any 1995 el Govern espanyol va aprovar el Pla Nacional de Recuperació de Sòls Contaminats. En aquest pla es van inventariar un total de 18.142 activitats industrials, a partir de les quals es van catalogar 4.532 emplaçaments com a potencialment contaminats. D'acord amb aquesta situació, es va veure la necessitat urgent d'implantar una legislació sobre la contaminació de sòls.

A Catalunya, la Junta de Residus del Departament de Medi Ambient i, concretament, el Departament de Sòls, va realitzar un estudi (Busquet, 1997) que va servir per elaborar la *Guia d'avaluació de la qualitat del*

sòl: criteris provisionals de qualitat del sòl a Catalunya (CQS).

L'any 1998 es va promulgar la Llei de residus (10/1998), que va incloure un capítol de sòls contaminats. En aquesta llei es requeria a les comunitats autònomes (CA) que fessin un inventari de sòls contaminats, i s'inclouia un mandat al Govern central mateix per publicar una llista d'activitats potencialment contaminants i per establir criteris i estàndards que permetessin avaluar el risc per a la salut humana i per al medi ambient. Malauradament, la normativa estatal en matèria de sòls contaminats no va arribar fins set anys després. L'any 2005 es va publicar el Reial Decret 9/2005 (RD), que estableix la relació d'activitats potencialment contaminants del sòl i els criteris i estàndards per a la declaració d'un sòl com a contaminat.

Aquest retard en la disponibilitat d'instruments normatius s'ha traduït en un retràs, tant pel que fa al desenvolupament de tecnologies adequades per part de les empreses del sector, com pel que fa a la conscienciació de la societat sobre la problemàtica que presenten els sòls contaminats i la necessitat de protegir-los. Mentre països europeus com Alemanya, Dinamarca o els Països Baixos disposen d'una llarga experiència en aquest camp, el nostre país es troba tot just al començament.

A aquesta situació hem d'afegir que el nostre país encapçala el rànquing de països europeus pel que fa a activitat constructora. Aquest fet ha portat a fer que molts ajuntaments hagin canviat els usos de moltes hectàrees de sòl industrial a sòl urbà. Malauradament, aquesta situació, juntament amb el buit legal esmentat, ha portat al que podríem anomenar la *cultura de l'excavació i l'abocador*, que suposa l'excavació dels sòls contaminats i el seu trasllat a abocadors controlats, estratègia molt poc sostenible.

En aquest sentit, un punt important del RD, i que s'esmenta al preàmbul, és que per

a la descontaminació d'un sòl s'han de prioritzar les millors tècniques disponibles en funció de les característiques de cada cas, i han d'aportar solucions permanents, de manera que prevalguin aquelles tecnologies que evitin la generació de residus. En concret, l'article 7 diu que es prioritzen les tècniques de remediació *in situ* que evitin el trasllat de terres als dipòsits controlats.

Actualment a Catalunya existeix un esborrany de decret per a la contaminació del sòl, que està en fase de consulta pública. Aquest decret és l'adaptació de la regulació estatal per donar compliment al que el RD estableix per a les CA. Cal fer ressaltar el fet que consolida la idea d'aplicar les millors tècniques disponibles, així com la prioritzaació de les tecnologies de recuperació *in situ* i en segon lloc les *on site/ex situ* mitjançant tractaments de la terra excavada.

És, per tant, previsible, que l'aplicació d'aquest Reial Decret comportarà un impuls en la matèria, atès que les estimacions efectuades a Catalunya xifren en unes trenta mil les activitats potencialment contaminants del sòl i, per tant, subjectes al compliment del RD.

LA IMPORTÀNCIA DELS MICROORGANISMES EN L'ELIMINACIÓ DELS CONTAMINANTS QUÍMICS

Quan un contaminant arriba a l'ecosfera comencen a actuar a sobre seu diferents processos físics, químics i biològics que dirigiran el que anomenem el seu *destí ambiental*. Imaginem el cas d'una marea negra. Malgrat que la primera imatge que hi associem és la d'una au bruta de petroli, és a dir, una imatge macroscòpica, existeix tot un món microscòpic que ens passa desapercebut.

Així que es produeix un vessament de petroli al mar, els seus components, majo-

ritàriament hidrocarburs, estan subjectes a processos físics, químics i biològics (vegeu la figura 1). Alguns només provoquen el canvi de compartiment ambiental, com l'evaporació o la sedimentació, ja que fan que els hidrocarburs passin de l'aigua a l'atmosfera o de la columna d'aigua al sediment. D'altres suposen un canvi d'estat físic o químic, com la dissolució o les reaccions químiques espontànies. De tots, destaquem dos processos, que són la *fotooxidació* i la *degradació microbiana*, els únics que suposen la transformació dels hidrocarburs en productes totalment innocus, com l'anhidrid carbònic i l'aigua, és a dir, que provoquen la mineralització del contaminant i, per tant, l'eliminació del problema. Ara bé, mentre la fotooxidació només actua sobre les superfícies irradiades pel Sol, la degradació microbiana pot actuar en tota la columna d'aigua, al sediment i a les zones costeres afectades, atesa la ubiqüitat dels microorganismes.

Sens dubte, el principal procés d'eliminació dels contaminants químics de qualsevol emplaçament contaminat és la degradació

microbiana (Bordons i Constanti, 1999; Talley, 2006). Sense por d'equivocar-nos, podríem dir que si no fos pels microbis, en especial pels bacteris, els nostres mars estarien plens d'hidrocarburs. A títol d'exemple, els mars catalans reben aproximadament unes vint mil tones d'hidrocarburs a l'any, procedents de petits accidents o d'operacions rutinàries dels vaixells, malgrat que estan prohibides.

Ens sorprèn que els bacteris tinguin la capacitat d'alimentar-se i créixer amb aquests compostos? Si recordem que aquests petits organismes són a la Terra des de fa més de tres mil cinc-cents milions d'anys, no ens costarà entendre que durant aquest llarg període de temps hagin pogut desenvolupar unes capacitats metabòliques increïblement variades i diversificades, que els permeten metabolitzar compostos químics que per a nosaltres i per a la majoria d'organismes molt més organitzats resulten molt estranys i no metabolitzables. Nosaltres, a aquesta escala evolutiva, fa només un instant que som a la Terra, i per això la nostra

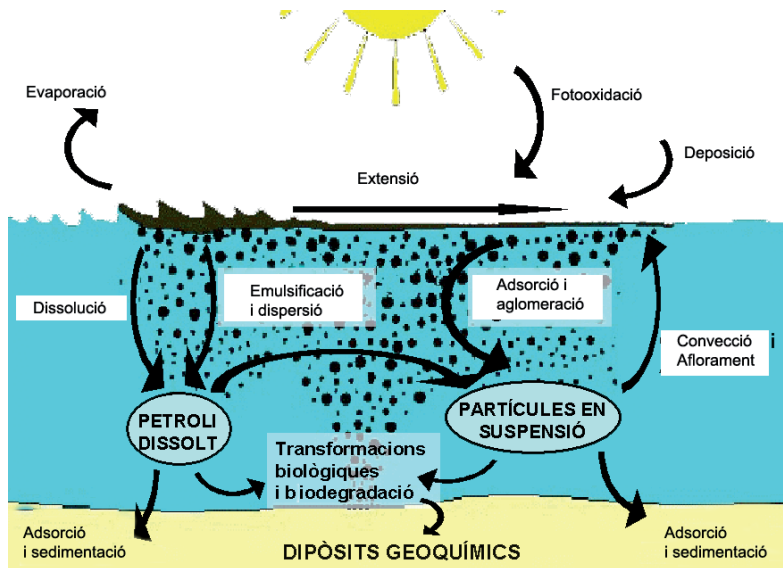


FIGURA 1. Destí ambiental d'un vessament de petroli. Font: Núria Jimenez.

inventiva metabòlica és extraordinàriament simple.

LA BIOREMEDIACIÓ

Tenint en compte la capacitat innata que presenten els microorganismes per destruir els contaminants del nostre medi, aprofundir en el coneixement del procés per poder-lo controlar, accelerar i millorar constitueix l'objectiu de molts microbiòlegs ambientals des de les últimes dècades del segle passat. La informació generada conjuntament amb la d'altres disciplines, com ara la hidrogeologia o l'enginyeria, ha configurat una nova biotecnologia anomenada *bioremediació*.

La bioremediació es basa en l'aprofitament de les capacitats metabòliques dels microorganismes per a la destrucció dels contaminants dels sòls, sediments, platges i aigües subterrànies (Alexander, 1999). Com veiem, el tractament d'aigües residuals no queda inclòs en el terme *bioremediació*, atesa la seva antiguitat; en aquest cas, parlem de *tractament biològic*. La bioremediació ha aparegut en el moment en què ens hem hagut d'enfrontar amb sòls, platges i aigües subterrànies contaminats o amb aigües residuals industrials molt específiques, situació produïda en les darreres dècades.

Val a dir que existeixen tecnologies alternatives a la bioremediació, però, com hem dit en el cas de les marees negres, la bioremediació suposa la veritable eliminació dels contaminants perquè els converteix en anhídrid carbònic i aigua. L'excavació i posterior gestió en abocador, els tractaments fisicoquímics o la incineració comporten el trasllat del problema o la generació de residus, i no l'eliminació. A més, la bioremediació és una tecnologia compatible amb el desenvolupament sostenible i de baix cost comparada amb d'altres tecnologies fisicoquímiques. Aquesta tecnologia ha estat majoritària en diferents països europeus com

Alemanya, Dinamarca i França. En el cas d'Alemanya, la bioremediació va ser majoritària en els anys noranta. A títol d'exemple, l'any 1998 el 98 % de les plantes de tractament fixes eren biològiques (Ulrici, 2001).

TIPOLOGIES DE BIOREMEDIACIÓ

Existeixen diferents tipus de bioremediació en funció de l'estratègia microbiològica i del lloc on es porti a terme. Tenint en compte que el sòl està format per una zona insaturada i una part saturada o aigües subterrànies, segons sigui la zona afectada per la contaminació el tractament s'haurà d'adaptar a les característiques diferencials dels dos compartiments (Singh i Tripathi, 2007). En el cas de les marees negres és susceptible de tractar per bioremediació el litoral afectat, les roques i les sorres, i no pas el mar obert (Sabaté *et al.*, 2003).

Atenuació natural. Es parla de bioremediació intrínseca o atenuació natural quan no es porta a terme cap intervenció i ens limitem a portar un seguiment de la disminució de la contaminació que es produeix com a conseqüència de l'activitat metabòlica de les poblacions microbianes de l'emplaçament mateix. Aquesta situació es pot produir en algunes gasolineres que presentin una baixa contaminació (Álvarez Pedro, 2006).

Bioestimulació. Si el que fem és afavorir el creixement de les poblacions que ja existeixen mitjançant l'addició de productes que millorin la seva activitat metabòlica, parlem de bioestimulació. Partint del coneixement dels factors que condicionen un procés de bioremediació, la bioestimulació suposarà ajustar les característiques de l'emplaçament contaminat a les necessitats dels microorganismes, mitjançant el subministrament d'agents bioestimulants, com ara oxigen o nutrients (Singh i Ward, 2004).

Bioreforç. Finalment, si s'afegeixen microorganismes que tinguin les capacitats

catabòliques adequades que no tenen els autòctons, parlem de bioreforç. En el cas que les poblacions microbianes de l'emplaçament contaminat no puguin degradar els contaminants presents, es pot portar a terme la inoculació de soques bacterianes o fúngiques amb les capacitats catabòliques específiques (Viñas *et al.*, 2002). No obstant això, cal tenir present que aquests consorcis microbians es fan créixer en unes condicions controlades i constants en el laboratori i, per tant, es trobaran amb uns bacteris autòctons molt més competitiu i més ben adaptats a la presència de depredadors, inhibidors i tòxics, així com a les condicions particulars de pH i temperatura de l'emplaçament (Alexander, 1999).

Bioremediació in situ. Quan no es porta a terme l'excavació del sòl, els agents bioestimulants, com ara l'oxigen o els inòculs, s'han de proporcionar mitjançant pous d'injecció o galeries d'infiltració adequades a la part afectada, ja sigui la zona insaturada, les aigües subterrànies o ambdues.

Aquest tipus d'intervenció, malgrat que és molt menys costosa que l'excavació i el tractament posterior, presenta l'inconvenient de l'heterogeneïtat del subsòl i la necessitat que els agents bioestimulants accedeixin als llocs on es troba el contaminant. És per això que s'obtidran millors resultats amb sòls més homogenis. No obstant això, en els darrers anys han aparegut una sèrie de productes nous que permeten optimitzar el subministrament d'aquests agents. Un exemple en són els alliberadors lents d'oxigen (Koenigsberg i Mahaffey, 2001).

Bioremediació on site/ex situ. Si la contaminació afecta la zona insaturada, una vegada excavat el sòl es pot tractar amb diferents tecnologies. Una és dipositar el sòl damunt d'un altre sòl i llaurar-los: es tracta de l'anomenat *landfarming*. Aquesta tecnologia va ser la primera a utilitzar-se, per la seva simplicitat. Més recentment s'han introduït les biopiles. Es tracta de construir una pila de

sòl i subministrar-hi els activadors que es necessitin. Si es construeix amb xarxes de tubs de PVC que permetin el subministrament dels agents bioestimulants, parlem de biopiles estàtiques. Si el que fem és afegir l'aigua i els agents bioestimulants cada vegada que es remena la pila de sòl, es parla de biopila dinàmica. El tractament és *on site* quan la biopila es realitza en el mateix emplaçament, i *ex situ* quan es porta a una planta de tractament. En el cas de les aigües subterrànies el tractament *on site* suposa bombejar les aigües a reactors en superfície, on són tractades i posteriorment reinjectades a l'aquífer.

Fins avui dia, la tipologia de contaminació amb la qual la bioremediació s'ha mostrat més eficaç és la derivada del petroli i derivats; per tant, amb els contaminants que pertanyen a diferents tipologies d'hidrocarburs, com els alifàtics o els hidrocarburs aromàtics policíclics (HAP).

FACTORS QUE CONDICIONEN LA BIOREMEDIACIÓ

Tenint en compte que la bioremediació suposa una interacció entre els contaminants presents en un emplaçament, el lloc on es troben i els microorganismes autòctons, els factors que condicionaran el procés estaran relacionats amb aquests tres protagonistes (Atlas i Philip, 2005).

Malgrat que ens hem referit al gran potencial catabòlic dels microorganismes, no serà difícil entendre que, atesa la gran variabilitat d'estructures químiques dels contaminants, no tots presentaran el mateix grau de biodegradabilitat. Si tornem a recordar que els microorganismes són a la Terra des de fa aproximadament tres mil cinc-cents milions d'anys, és a dir, des de l'aparició de la vida, és raonable pensar que la biodegradabilitat dels productes químics estarà relacionada amb el temps que fa que es troben a

la Terra i, per tant, amb el grau d'adaptació a la seva presència que han pogut desenvolupar els sistemes enzimàtics dels microorganismes.

Feta aquesta consideració, els productes químics que es troben en el nostre entorn els podem classificar en tres categories: els compostos, com les proteïnes, que formen part dels organismes, que anomenem biogènics i que són a la Terra des de l'aparició de la vida; els hidrocarburs, que provenen de transformacions de compostos biogènics i que són presents a la Terra des de fa milions d'anys i, finalment, els compostos que són resultat d'una síntesi química feta per l'home, com els plaguicides, i que, tenint en compte l'escala geològica del temps, podem dir que fa només un instant que es troben al nostre entorn. Aquests últims els anomenem *xenobiòtics*, és a dir 'estrany's', ja que estan molt allunyats de l'estructura química dels compostos biogènics. La biodegradabilitat d'aquestes tres categories de compostos és decreixent, des dels compostos biogènics, que són intrínsecament biodegradables, fins als xenobiòtics, amb els productes més recalcitrants, passant pels hidrocarburs, amb graus de biodegradabilitat variable depenent de l'estructura.

De fet, un contaminant és més difícil de degradar en la mesura que presenti una estructura química amb substituents diferents dels dels compostos biogènics, que s'anomenen *grups xenobiòtics*. Per exemple, la presència del clor fa que un compost sigui més resistent a la biodegradació i a més, de manera proporcional al nombre d'àtoms d'aquest element. Així, el clorur de metilè és més biodegradable que els bifenilpoliclorats o PCB (Talley, 2006).

La biodegradació d'un contaminant pot ser parcial i pot donar lloc a un intermediari més oxidat, o pot ser oxidat d'una manera terminal a anhidrid carbònic, aigua i compostos inorgànics (Alexander, 1999). En una bioremediació aquest últim succés és el

més desitjat, malgrat que quan hi ha la producció d'un intermediari, és força freqüent que un altre microorganisme present pugui acabar de mineralitzar-lo.

Per mineralitzar un contaminant els microorganismes necessitaran les condicions adients per portar a terme el seu metabolisme. Si el metabolisme és aeròbic necessitaran oxigen, i si és anaeròbic necessitaran la presència de l'acceptor d'electrons específic, com ara el nitrat o el ferro. En el cas dels hidrocarburs, el metabolisme més eficaç és l'aeròbic. Així mateix, el contingut d'aigua o humitat serà un factor clau, com també ho són el pH i la salinitat.

La majoria dels contaminants només estan formats per carboni (C), hidrogen (H) i halògens com el clor o el brom. Ara bé, les cèl·lules dels microorganismes, a més de C i H, tenen nitrogen (N) i fòsfor (P) en moltes macromolècules, com les proteïnes, els lípids o els àcids nucleics, per la qual cosa, si el contaminant és utilitzat pels microorganismes presents per créixer, és a dir, per formar noves cèl·lules, es necessitarà la presència de N i P en quantitats proporcionals. És per això que una pràctica bastant universal en la bioestimulació és la d'afegir nutrients, que poden ser hidròfils o lipòfils. Es considera que una cèl·lula bacteriana té unes proporcions de C:N:P de 50:10:4. Les quantitats a afegir en aplicar una bioremediació dependran del rendiment que els microorganismes extreguin del contaminant. Durant molt de temps s'ha tingut com a model *Escherichia coli*, que quan creix amb glucosa deriva el 50 % en noves cèl·lules i l'altre 50 % en CO₂ i H₂O. En aquest cas les proporcions de C:N:P que haurien d'estar presents a l'emplaçament contaminat sotmès a una bioremediació serien de 100:10:4. En els últims anys, l'aïllament de diferents soques bacterianes degradadores de diferents tipus de contaminants per part de diferents grups de recerca ha permès comprovar que els rendiments d'aques-

tes soques bacterianes degradadores són normalment inferiors al descrit per a *E. coli*. Així, les soques bacterianes degradadores d'hidrocarburs presenten uns rendiments al voltant del 30 % (Casellas *et al.*, 1997), i per això les proporcions haurien d'estar al voltant de 150:10:4.

FASES EN UN PROJECTE DE BIOREMEDIACIÓ

Per portar a terme una bioremediació s'han de seguir una sèrie d'etapes. En primer lloc es necessita caracteritzar l'emplaçament mitjançant sondeigs i presa de testimonis. En aquesta etapa s'ha de poder disposar d'un mapa hidrogeològic de l'emplaçament i de l'abast i el tipus de contaminació, i també s'ha de saber si existeix fase lliure en les aigües subterrànies. La fase lliure és freqüent en la contaminació amb hidrocarburs i suposa l'existència d'una capa flotant d'hidrocarburs. Aquesta informació servirà per portar a terme la fase següent, que consisteix a dur a terme els anomenats *estudis de factibilitat o tractabilitat*.

Aquests estudis es realitzen al laboratori i pretenen poder respondre dues preguntes. En primer lloc, si és adequat aplicar una bioremediació en un determinat emplaçament contaminat, i en segon lloc, si la resposta anterior és afirmativa, en quines condicions es podran obtenir uns resultats òptims. Hem de partir de la base que cada emplaçament presenta unes característiques particulars i, per tant, dos sòls poden respondre de manera diferent enfront d'un determinat agent bioestimulant. En aquest sentit, el Grup de Recerca de Biodegradació i Bioremediació de la Universitat de Barcelona, dirigit per Anna Maria Solanas, integrat en el Centre de Referència de Biotecnologia de la Generalitat de Catalunya, ja fa més de trenta anys que treballa en el camp de la biodegradació d'hidrocarburs, i

des de l'any 1998 realitza un paper destacat dins dels sectors implicats, ja siguin empreses o administracions, per convèncer de la necessitat de portar a terme aquests tipus d'estudis.

De manera equivocada, alguna empresa pot voler repetir en un altre emplaçament un tipus d'estratègia de bioremediació que li ha funcionat en un sòl, i no necessàriament el nou sòl respondrà de la mateixa manera. La realització dels assaigs de factibilitat permeten conèixer la capacitat de resposta d'un emplaçament concret. Aquest tipus d'estudi pot abaratir el cost final del projecte i, el que és més important, augmentar les possibilitats d'èxit. En aquest sentit, el grup esmentat ha desenvolupat un protocol d'assaigs de tractabilitat (Sabaté *et al.*, 2003) que ha aplicat a diferents tipologies de sòls contaminats (Martínez *et al.*, 2003; Viñas *et al.*, 2001, 2005; Sabaté *et al.*, 2003).

Una vegada demostrada la factibilitat de portar a terme una bioremediació i quines són les condicions més eficaces, és convenient portar a terme una prova pilot, en què es poden ajustar els diferents paràmetres. Finalment es porta a terme la implementació de la tecnologia escollida acompanyada d'un protocol de control del procés.

EXPERIÈNCIES DE BIOREMEDIACIÓ A CATALUNYA

Prova pilot de bioremediació d'un sòl contaminat per olis minerals a Lliçà de Vall amb la tecnologia de la bioventilació

Atesa la contaminació del sòl de les antigues instal·lacions de Clipper Oil de Lliçà de Vall, la Junta de Residus de la Generalitat de Catalunya va actuar subsidiàriament per evitar la possible afectació de pous d'abastament d'aigua. La contaminació era

d'olis minerals. En primer lloc, es va portar a terme una tecnologia de confinament actiu per part de l'empresa ECOCAT SL (abans TQMA). A continuació es va demanar un estudi de factibilitat a la Universitat de Barcelona per aplicar una bioremediació. L'existència de poblacions microbianes degradadores d'hidrocarburs, metabòlicament actives, capaces de biodegradar els hidrocarburs presents en el sòl, van permetre establir que l'emplaçament era susceptible de ser sotmès a la tecnologia de la bioremediació. La segona fase dels assaigs de tractabilitat havia de permetre trobar les condicions més adequades per arribar a optimitzar el procés. Ja que la Junta de Residus volia portar a terme una bioremediació *in situ*, es van dissenyar uns lisímetres per avaluar el subministrament d'aire i el subministrament de nutrients inorgànics en forma de nitrat i fosfat, per tal d'acostar-se més a les condicions del camp (vegeu la figura 2).

Un bon airejament i un grau d'humitat òptim van ser els paràmetres clau per assolir un bon descens de la concentració d'hidrocarburs. L'addició de nutrients en forma de nitrat i fosfat accelerava el procés i permetia un descens lleugerament superior. No obstant això, atès el confinament, es va optar per portar a terme una bioventilació. Aquesta tecnologia va ser aplicada per TQMA (vegeu la figures 3a, b i c).

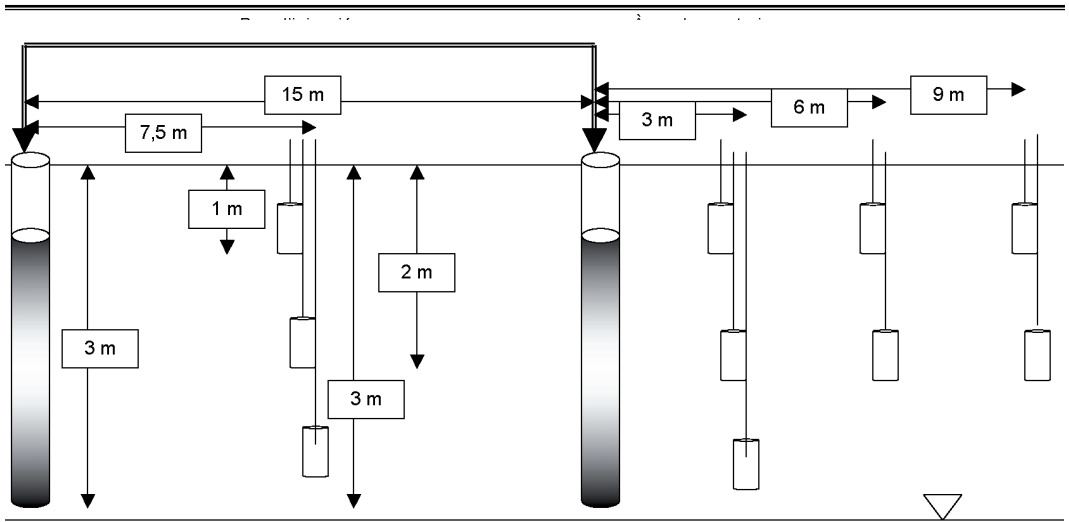
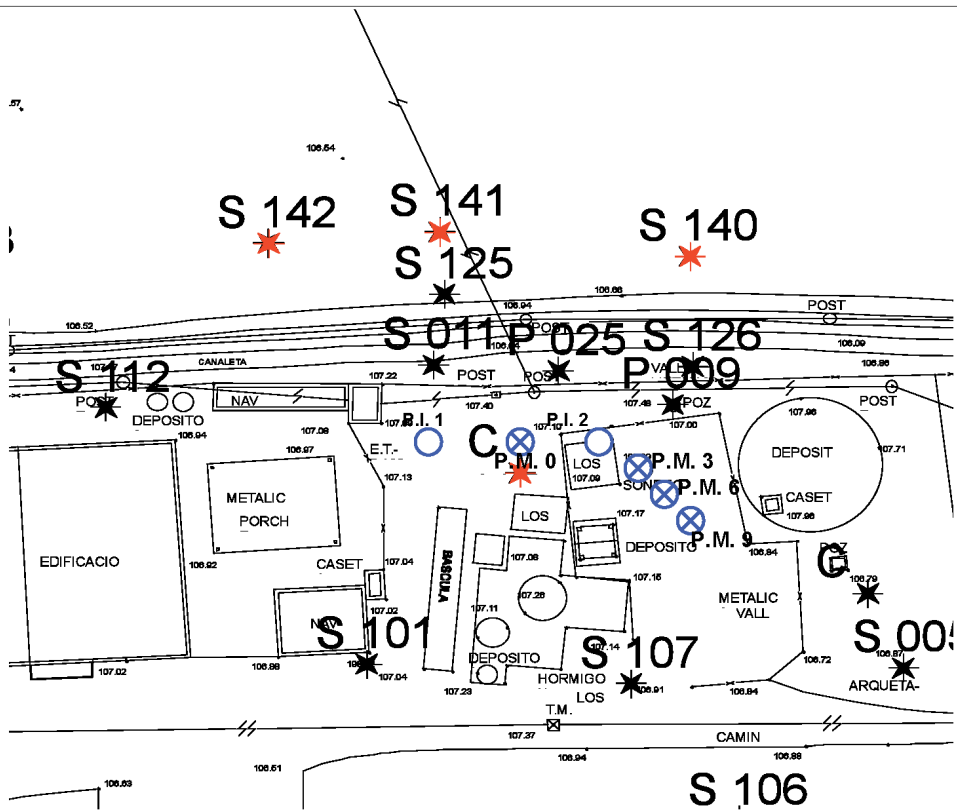
Durant tot el procés es va realitzar un rigorós seguiment de les poblacions microbianes, de la concentració d'oxigen i CO_2 i de la concentració dels hidrocarburs (Martinet *et al.*, 2003). En aquesta prova pilot es van assolir unes eliminacions del 84-97 % dels hidrocarburs totals del petroli (TPH).

Prova pilot de bioremediació d'un sòl contaminat per creosota a Callús amb la tecnologia de la biopila dinàmica

En unes instal·lacions de tractament per a la conservació de la fusta es va portar a terme una bioremediació mitjançant la tecnologia de la biopila dinàmica (vegeu la figura 4). La creosota està formada per hidrocarburs aromàtics policíclics (HAP), dels quals és ben coneguda la toxicitat. Després de portar a terme els estudis al laboratori per part del grup de la Universitat de Barcelona es va optar per aplicar una biopila dinàmica mantenint l'airejament i la humitat òptima mitjançant el volteig de la terra i el rec amb aigua (Viñas, 2005). Aquesta prova pilot va ser finançada per



FIGURA 2. Assaig de factibilitat amb lisímetres per avaluar el subministrament d'aire, humitat òptima i addició de nutrients en un sòl contaminat d'olis minerals (Clipper Oil, Lliçà de Vall).



FIGURES 3a i 3b. A dalt, plànol de l'emplaçament amb els pous d'injecció d'aire i els pous de control; a baix, perfil de la situació dels pous d'injecció d'aire i dels pous de control.

la Junta de Residus de la Generalitat. En aquesta prova pilot, que va durar sis mesos, es van assolir unes degradacions entre el 96 i el 100 % per als HAP de tres anells. Per als HAP de quatre i cinc anells es van assolir disminucions entre el 46 i el 76 %. Hem de dir que alguns dels HAP no van assolir els valors NGR que es troben en la Llei de sòls. Aquest sòl està sent objecte d'estudi per part del grup de recerca de la Universitat de Barcelona.

Prova pilot de bioremediació *in situ* d'aigües subterrànies contaminades per nitrats

La contaminació per nitrats de les aigües subterrànies és un problema important per a Catalunya. En aquest sentit, l'empresa catalana D d'enginy Biorem SL, pionera en la recerca de tractaments anaerobis *in situ* d'aigües subterrànies, va rebre l'encàrrec de l'Agència Catalana de l'Aigua (ACA) per portar a terme una bioremediació d'unes aigües contaminades per nitrats. La proposta plantejada per l'empresa està basada en la desnitrificació bacteriana. Aquesta tecnologia aprofita la capacitat que té un grup important de microorganismes per utilitzar els nitrats per respirar. Aquest procés suposa convertir el nitrat en nitrogen gas. En aquest procés es necessita un substrat carbonatat fàcilment respirable per als microorganismes desnitrificants, que s'injecta mitjançant pous d'injecció (vegeu la figura 5).

LIMITACIONS I ASPECTES NECESSITATS D'INVESTIGACIÓ

Una de les limitacions més importants de la bioremediació és el temps necessari per assolir els objectius de descontaminació, que podria estar entre tres i deu mesos. La

típica cinètica de desaparició dels contaminants es pot observar a la figura 6.

A una disminució inicial ràpida segueix un descens molt més lent. El procés suposa un enriquiment del sòl en compostos cada vegada més recalcitrants i menys biodisponibles. En aquest sentit, si s'han d'assolir uns valors concrets per a cada contaminant diana, reflectits en la Llei de sòls com a valors de referència o NGR, això pot comportar una durada excessivament llarga. És el cas d'alguns contaminants d'alt pes molecular i d'elevada hidrofobicitat i recalcitrància.

Els equips de recerca hem de trobar la manera de disminuir el temps dels processos de bioremediació i tractar d'assolir valors més baixos d'alguns contaminants. Es tracta d'incidir en el punt d'inflexió de la cinètica en què es produeix un enriquiment dels contaminants més recalcitrants i menys biodisponibles. En aquests moments els esforços els estem realitzant en la *millora del coneixement de les poblacions microbianes implicades, la millora de la biodisponibilitat dels*



FIGURA 3c. Control d'oxigen i CO₂.

contaminants i la biodegradació de contaminants recalcitrants.

Les poblacions microbianes del sòl encara són poc conegudes, i s'estima que tan sols un 0,1-1 % dels microorganismes presents són cultivables (Amann *et al.*, 1995). En aquest sentit, l'aparició de tècniques moleculars ha permès augmentar el coneixement dels microorganismes presents en un sòl a partir de l'extracció del DNA total, l'amplificació dels gens que codifiquen els

rRNA 16S o 18S, la separació i la seqüenciació posterior.

El coneixement de les poblacions microbianes presents en un sòl sotmès a una tecnologia de bioremediació ens pot permetre conèixer millor la resposta d'aquestes als diferents agents bioestimulants (vegeu la figura 7). En aquest sentit, els estudis amb sòls afectats per diferents tipologies de contaminants ens ha permès observar que la pràctica quasi universal d'addició de nutrients a l'inici d'un procés de bioremediació afavoreix les poblacions degradadores d'hidrocarburs alifàtics, però no les degradadores d'HAP. L'explicació estaria en el fet que els microorganismes que degraden els HAP són de creixement lent i els degradadors d'alifàtics, més fàcils de degradar, són de creixement ràpid. Per tant, l'addició de nutrients afavoriria les poblacions degradadores d'alifàtics en detriment de les degradadores d'HAP. Així doncs, en sòls contaminats per olis minerals o gasoil és adequat afegir nutrients, mentre que no ho és, almenys a l'inici del procés, en sòls contaminats per HAP, com per exemple els sòls contaminats per creosota (Viñas *et al.*, 2005).

Durant molts anys es pensava que la no-biodegradabilitat d'un contaminant era deguda al fet que els microorganismes presents no tenien la capacitat catabòlica per degradar-lo o els mancava algun dels factors necessaris per al seu metabolisme. En l'última dècada s'ha vist que molts contaminants no estan biodisponibles per als microorganismes (Mahro, 2000): per fenòmens de sorció, ja sigui adsorció a partícules d'argila o absorció dins la matèria orgànica, per segrest mitjançant l'establiment d'enllaços covalents dels contaminants amb els àcids húmics, o per interiorització dins de nanopors amb la pèrdua conseqüent d'accessibilitat per als bacteris. La possible addició de tensioactius o, encara millor, de biotensioactius, podria desadsorbir els contami-



FIGURA 4. Construcció i manteniment de la biopila dinàmica.

nants i permetre'n la biodegradació. Ara bé, mentre que s'han obtingut resultats espectaculars de millora de la biodegradació dels contaminants hidrofòbics amb l'addició de biotensioactius en medi líquid (Abalos *et al.*, 2004), el comportament d'aquests en medi sòlid és molt més complex i els resultats de què disposem són contradictoris (Ron i Rosenberg, 2002).

En l'accident succeït a la costa gallega del petrolier *Prestige* en el mes de novembre de 2002 es va produir una marea negra que va afectar la costa gallega i la càntabra. El producte vessat era un fuel molt pesant enriquit amb components d'elevat pes molecular, tan pel que fa la part alifàtica com pel que fa a l'aromàtica. Dels diferents agents bioestimulants i diferents consorcis comercials que es van assajar, el que va presentar millors resultats va ser un fertilitzant oleofílic que presentava un tensioactiu en la seva formulació (vegeu la figura 8). Precisament

l'efecte d'aquest tensioactiu va ser el de millorar la biodisponibilitat dels components més pesants (Jiménez *et al.*, 2006).

Un altre aspecte important és referir al destí dels contaminants. Els contaminants del sòl poden ser mineralitzats pels microorganismes (convertits en anhídrid carbònic i aigua) o bé parcialment oxidats. En el cas dels hidrocarburs aromàtics policíclics (HAP) és molt coneguda la producció de metabòlits d'oxidació intermèdia, que solen ser més tòxics que els hidrocarburs originals.

En aquest sentit es va descriure l'aïllament d'una soca bacteriana F101 d'*Arthrobacter* sp. que degradava el fluorè, un HAP de tres anells, mitjançant tres rutes catabòliques diferents: dues que portaven a la mineralització del fluorè i una tercera que suposava l'oxidació del fluorè a fluorenona, una cetona aromàtica molt més tòxica que el fluorè. Aquesta cetona s'acumulava per-

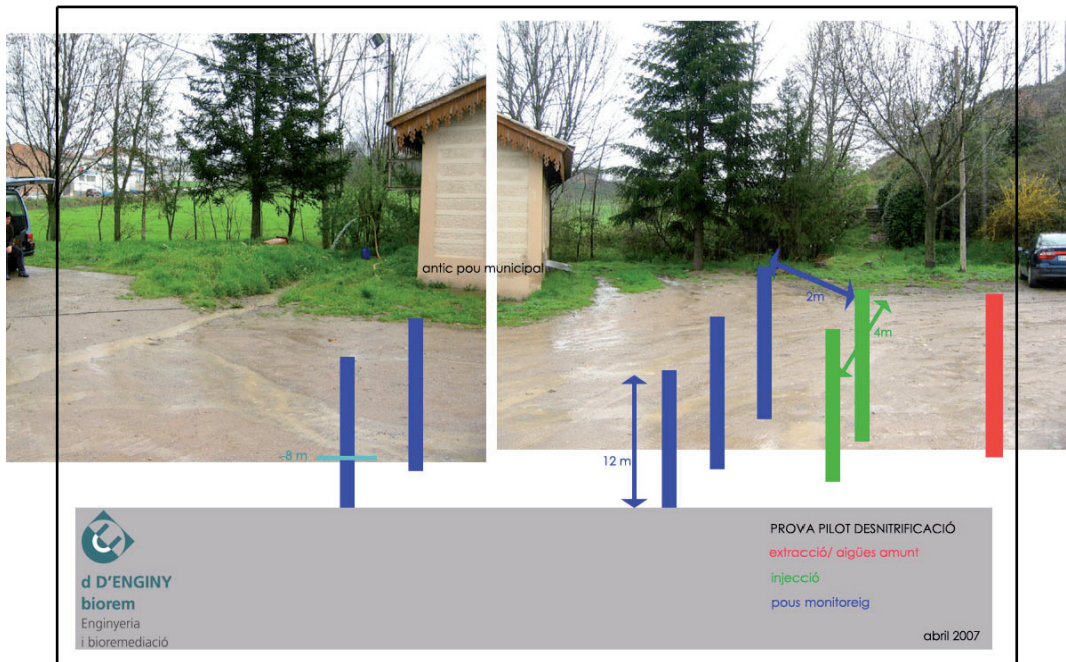


FIGURA 5. Prova pilot de descontaminació de nitrats segons el procediment de bioremediació *in situ* per desnitrificació bacteriana (Osona).

què la soca F101 no tenia els enzims necessaris per mineralitzar-la. Aquest fenomen va portar els investigadors a intentar aïllar una soca bacteriana que fos capaç de degradar la fluorenona. Es va aïllar la soca MC2 de *Pseudomonas mendocina*, que degradava la fluorenona però no el fluorè, és a dir, presentava el sistema enzimàtic que no tenia la soca F101 (Casellas *et al.*, 1998). En aquest moment es tenia, al laboratori, un model de cooperació catabòlica entre diferents microorganismes que permetia que amb el cocultiu de les dues soques s'eliminessin el fluorè i la fluorenona. Podia tractar-se d'un model de col·laboració metabòlica freqüent en els processos de bioremediació de sòls contaminats per HAP.

Aquesta hipòtesi es va confirmar en la bioremediació del sòl contaminat per creosota esmentat anteriorment. Mentre que a l'inici de la bioremediació el sòl presentava un alt contingut d'HAP i de productes d'oxidació intermèdia com la fluorenona, aquests van anar disminuint fins pràcticament desaparèixer al llarg del procés de bioremediació (Sabaté *et al.*, 2006). Per tant, els resultats podrien fer concloure que la col·laboració metabòlica entre diferents poblacions microbianes pot ser un dels principals mecanismes d'eliminació dels contaminants en el medi.

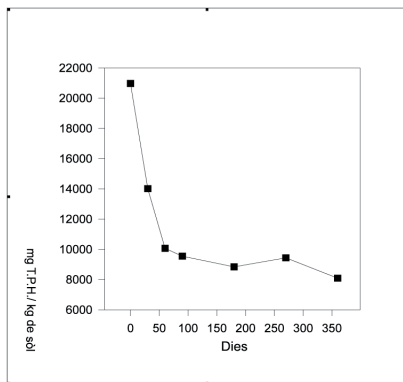


FIGURA 6. Cinètica de degradació dels contaminants en un procés de bioremediació.

Finalment, un altre punt crític que es presenta al final d'un procés de bioremediació és el relacionat amb els criteris de descontaminació. Considerar que un sòl no està descontaminat perquè la concentració residual d'algun hidrocarbur excedeix el valor estàndard establert en el RD (NGR) no és científicament correcte. S'hauria d'incloure un criteri de toxicitat i no considerar el valor de referència com a únic criteri. Per exemple, el NGR del benzo(a)antracè, que és un HAP de quatre anells, és de 2 ppm per a un sòl urbà i de 20 ppm per a un sòl industrial. Quan un contaminant es troba al sòl pot estar biodisponible per als microorganismes, és a dir, que aquests el poden captar com a substrat per al seu metabolisme, o pot no estar-ho (Mahro, 2000). Fenòmens de sorció a les argiles, d'absorció a la matèria orgànica o de segrest per entrar a formar part del humus del sòl suposen convertir els contaminants en no biodisponibles. Si un contaminant no està biodisponible la toxicitat se'n veurà modificada. Per tant, a més dels NGR s'hauria d'incloure una avaluació toxicològica, que permetria considerar un sòl com a descontaminat, malgrat

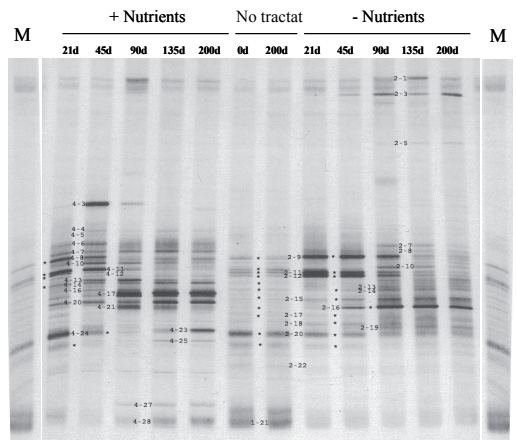


FIGURA 7. Electroforesi en gels de gradient de densitat (DGGE). Cadascuna de les bandes correspon a un microorganisme diferent. Es pot veure la seva dinàmica al llarg del temps i en resposta a diferents tractaments, com ara afegir nutrients.

que no s'haguessin assolit els valors absoluts de NGR. Hem d'esmentar que aquestes concentracions s'obtenen a partir de metodologies químiques basades en extraccions fortes amb dissolvents orgànics, lluny dels llixiviats que es poden produir després de la pluja. En aquest sentit s'està generant informació al respecte mitjançant l'avaluació toxicològica dels sòls al llarg de processos de bioremediació amb assaigs de toxicitat, com ara la germinació de llavors i la toxicitat aguda en cucs (*Eisenia foetida*).

Per concloure, del que s'ha exposat en l'apartat de normatives i de les proves pilot que s'han portat a terme a Catalunya fins ara es desprèn el fet que cal potenciar el desenvolupament i, per tant, la recerca de millores tècniques en la recuperació de sòls, especialment aquelles que permetin la

recuperació *in situ* o bé *on site/ex situ*, i que siguin viables des del punt de vista del cost. Així doncs, els tractaments biològics seran importants per a la recuperació d'aquells sòls contaminats en què aquest tipus de tècniques siguin aplicables. Actualment aquestes tecnologies s'estima que representen només un 2-3 % del total; indiscutiblement, aquest percentatge haurà de créixer en un futur.

BIBLIOGRAFIA

- ABALOS, A.; VIÑAS, M.; SABATÉ, J.; MANRESA, M. A.; SOLANAS, A. M. (2004). «Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10». *Biodegradation*, 15: 249-260.



FIGURA 8. Assaig de bioremediació a la costa afectada pel vessament del *Prestige*. A l'esquerra, vista de les dues parcel·les, una tractada per bioremediació amb un nutrient oleofílic i l'altra de control; a la dreta a dalt, roques tractades; a la dreta a baix, roques no tractades.

- ALEXANDER, M. (1999). *Biodegradation and Bioremediation*. Londres: Academic Press.
- ALVAREZ, P. J. J. (2006). *Bioremediation and natural attenuation: process fundamentals and mathematical models*. Hoboken: Wiley.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. (1995). «Phylogenetic identification and situ detection of individual microbial cells without cultivation». *Microb. Rev.*, 59: 143-169.
- ATLAS, R.; PHILIP, J. (2005). *Bioremediation: applied microbial solutions for real-world environmental cleanup*. Washington: ASM Press.
- BORDONS, A.; CONSTANTÍ, M. (1999). *Introducció a la biotecnologia ambiental: solucions als problemes ambientals mitjançant sistemes biològics*. Tarragona: Universitat Rovira i Virgili.
- BUSQUET, E. (1997) *Elaboració dels Criteris de Qualitat del Sòl a Catalunya*. Barcelona: Generalitat de Catalunya.
- CASELLAS, M.; GRIFOLL, M.; BAYONA, J. M.; SOLANAS, A. M. (1997). «New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. Strain F101». *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 819-826.
- CASELLAS, M.; GRIFOLL, M.; SABATÉ, J.; SOLANAS, A. M. (1998). «Isolation and characterization of a 9-fluorenone degrading bacterial strain and its role in a synergistic degradation of fluorene by a consortium». *Can. J. of Microbiol.*, 44: 734-742.
- GENERALITAT DE CATALUNYA. DEPARTAMENT DE MEDI AMBIENT. JUNTA DE RESIDUS (2007). *Guia d'avaluació de la qualitat del sòl: criteris provisionals de qualitat del sòl a Catalunya*. Barcelona. Generalitat de Catalunya.
- JIMÉNEZ, N.; VIÑAS, M.; SABATÉ, J.; DIEZ, S.; BAYONA, J. M.; SOLANAS, A. M.; ALBAIGES, J. (2006). «The Prestige oil spill. II. Enhanced biodegradation of a heavy fuel oil by the use of an oleophilic fertilizer under field conditions». *Environmental Science and Technology*, 40: 2578-2585.
- KOENIGSBERG, S.; MAHAFFEY, M. (2001). «The use of oxygen release compound for bioremediation of MTBE». *Contaminated Soil Sediment and Water*, núm. primavera: 42.
- MAHRO, B. (2000). «Bioavailability of contaminants. Environmental processes II». A: KLEIN, J. [ed.]. *Biotechnology*, vol. VII. Weinheim: Wiley-VCH: 61-88.
- MARTINEZ, R.; SABATÉ, J.; VIÑAS, M.; ROMANYA, J.; SIMONEAU, R.; FONS, J.; VIDAL, G.; VIÑOLAS C.; SOLANAS, A. M. (2003). «Determinación de las condiciones óptimas de biorremediación con bioventing en un suelo contaminado con aceites minerales». *Residuos Revista Técnica*, 74: 72-82.
- MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. (2001). «Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review». *Engineering Geology*, 60: 371-380.
- ONU (1992). *Report of the United Nations Conference on Environment and Development. Annex I: Rio Declaration on Environment and Development* [en línia]. <<http://www.un.org/documents/ga/conf151/aconf15126-1annex1.htm>>
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. (2002). «Biosurfactants and oil bioremediation». *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13: 249-252.
- SABATÉ, J.; VIÑAS, M.; SOLANAS, A. M. (2003). «Combati el fuel del Prestige». *Mundo Científico*, 243: 32-39.
- (2004). «Laboratory-scale bioremediation experiments on two hydrocarbon contaminated soils». *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54: 19-25.
- (2006). «Bioavailability assessment and environmental fate of PAHs in biostimulated creosote-contaminated soil». *Chemosphere*, 63: 1648-1659.
- SINGH, A.; WARD, O. P. (2004). *Biodegradation and bioremediation*. Berlín: Springer.
- SINGH, S. N.; TRIPATHI, R. D. (2007). *Environmental bioremediation technologies*. Berlín: Springer.
- TALLEY, J. W. (2006). *Bioremediation of recalcitrant compounds*. Boca Raton: CRC Taylor & Francis.
- ULRICI, W. (2000). «Contaminated soil areas, different countries and contaminants, monitoring of contaminants. Environmental processes II». A: KLEIN, J. [ed.]. *Biotechnology*, vol. VII. Weinheim: Wiley-VCH: 5-42.
- VIÑAS, M. (2005). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*. Barcelona: Universitat de Barcelona. [Tesi doctoral]
- VIÑAS, M.; GRIFOLL, M.; SABATÉ, J.; SOLANAS, A. M. (2002). «Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities». *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 28: 252-260.
- VIÑAS, M.; SABATÉ, J.; ESPUNY, M. J.; SOLANAS, A. M. (2005). «Bacterial community dynamics and PAHs degradation during bioremediation of a heavily creosote-contaminated soil». *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7008-7018.
- VIÑAS, M.; SABATÉ, J.; GRIFOLL, M.; SOLANAS, A. M. (2001). «Ensayos de tratabilidad en la recuperación de suelos contaminados por la tecnología de la biorremediación». *Residuos Revista Técnica*, 59: 78-82.
- VIÑAS, M.; SABATÉ, J.; SOLANAS, A. M. (2005). «Culture-dependent and independent approaches establish the complexity of a PAH-degrading microbial consortium». *Canadian Journal of Microbiology*, 51: 897-909.
- WILSON, R.; MACKAY, D.; SCOW, K. (2002). «In-situ MTBE biodegradation supported by diffusive oxygen release». *Environmental Science and Technology*, 36: 190-199.