

mos nuevos que requieren múltiples ensayos; antes de su introducción es necesario un cumplimiento reglamentario mínimo en comparación al uso de microorganismos modificados. El factor reglamentario a menudo puede ahorrar mucho tiempo y dinero al fabricante en relación a la preparación de los productos para su venta. En segundo lugar, los mutantes seleccionados se han conseguido aislar recientemente. En la mayor parte de los casos, estos microorganismos son más parecidos a los aislados naturales que las bacterias modificadas genéticamente, ya que para la ingeniería genética se utilizan con más frecuencia cepas caracterizadas, cepas que han estado fuera de su ambiente natural a veces durante décadas. Los mutantes seleccionados de cepas aisladas recientemente pueden tener más éxito cuando se reintroducen en su ambiente nativo. Es más probable que estas cepas hayan conservado su resistencia ambiental y, por lo tanto, que funcionen con éxito cuando se reintroducen en su ambiente.

Finalmente, las cepas seleccionadas pueden actuar como parte de una asociación en vez de actuar solas. Una asociación puede poseer la variedad genética suficiente como para contar con rutas degradadoras enteras, incluso cuando la información se encuentre en diferentes miembros de la población. Por lo tanto, aunque ningún organismo único contenga la ruta degradadora deseada, la ruta aún será operativa. Si bien es posible juntar mediante ingeniería genética todos los genes requeridos en un único organismo, esto probablemente emplearía más tiempo y sería más costoso que conseguir la armonización de organismos con capacidades complementarias.

### **Desventajas**

Cuando los protocolos de mutación y selección se comparan con la modificación mediante ingeniería genética, existen algunas desventajas. En primer lugar, las modificaciones que se realizan no son específicas. Los mutágenos que probablemente van a ser utilizados actúan de una forma bastante inespecífica. Las mutaciones espontáneas son aleatorias. Es necesario emplear un esquema de selección para encontrar el fenotipo deseado, y, no importa lo bien que esté diseñado, puede que no sea lo suficientemente específico como para dar lugar solamente al fenotipo deseado. Muchos de los procesos de selección (reproducción) requerirán el desarrollo y el uso de técnicas no tradicionales de selección y contraselección genética. El resultado es que las capacidades observadas serán consecuencia de una alteración o alteraciones desconocida(s) y, cuando falle el sistema, será imposible determinar la causa.

En segundo lugar, los resultados vienen limitados por estas capacidades, es decir, por la información genética poseída por la bacteria u hongo particular. Las adaptaciones o construcciones de las rutas se deben producir por el crecimiento directo de los genes que se acaban de combinar o inducir al microorganismo, o bien, dependerán de la capacidad del investigador a la hora de controlar las transformaciones bioquímicas específicas que se producen dentro de una población mutagenizada. Aunque los microorganismos del suelo tienen la capacidad de hacer evolucionar las enzimas para atacar los productos químicos encontrados, este

proceso es muy lento. Se puede demostrar en el laboratorio la adaptación a sustratos específicos (Engesser et al., 1980). Sin embargo, las proteínas evolucionan a velocidades muy distintas (Ayalah, 1992; Ornstein, 1991a). El tiempo requerido para establecer una diferencia del 1 por ciento entre proteínas, denominado *período evolutivo unitario* (PEU), se expresa en millones de años, por lo general entre 2 y 20. Esto, obviamente es un problema común para muchos compuestos antropogénicos recalcitrantes que no tienen ningún análogo que se produzca de forma natural.

### **Modificación de organismos mediante técnicas de ingeniería genética**

Durante la última década, una de las esperanzas de quienes practican la biorrecuperación ha sido la intervención directa de la biología molecular sobre la bioquímica de las rutas catabólicas para producir microorganismos más eficaces en el tratamiento de residuos. El proceso, que implica la manipulación de los nucleótidos de las secuencias genéticas ya existentes mediante técnicas comunes de clonación de genes, o la creación de una enzima específica empleando la simulación por ordenador y su posterior introducción en un huésped seleccionado, ha sido descrito y aplicado en los sectores farmacéuticos y/o agrícolas (Don et al., 1985; Eaton y Timmis, 1986; Kukor et al., 1988; Kukor y Olsen, 1990; Paulsen y Ornstein, 1991; Paulsen et al., 1991). Las aplicaciones siguen estando limitadas a los sectores farmacéutico y agrícola.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, ningún microorganismo conseguido mediante estas técnicas de biología molecular ha sido empleado en biorrecuperación. En un simposio de 1985 sobre la emisión, intencionada o accidental, de bacterias recombinantes al ambiente, se plantearon las cuestiones de fijación del nitrógeno (*Rhizobium*), vacunas víricas (vaccinia; rabia), nucleación del hielo por *Pseudomonas*, pesticidas bacterianos, y plantas resistentes a herbicidas. El concepto de biodegradación en ese momento ni siquiera merecía una consideración (Halvorson et al., 1985).

### **Ventajas**

Aunque hay que afrontar diversos problemas importantes, la capacidad de modificar los microorganismos mediante ingeniería genética crea nuevas oportunidades. Por ejemplo, la degradación del tricloroetileno (TCE) es un fenómeno cometabólico en todas las bacterias para las que se ha descrito (Ensley, 1991). Como tal, es un candidato excelente para las manipulaciones genéticas. Russel et al. (1992) ya observaron en su revisión de los sistemas degradadores anaerobios del TCE que los requisitos para los inductores aromáticos o alifáticos de las enzimas que metabolizan el TCE, como las oxigenasas del tolueno, fenol, metano, o isopreno, presentaban dificultades para sendas aplicaciones tanto en reactor como *in situ*. También observaron, sin embargo, que esta dificultad se podía aliviar mediante la

manipulación de la secuencia genética correcta que controla la producción de oxigenasa en la cepa respectiva (Shields y Reagin, 1992).

Antes de utilizar estos organismos de reciente creación en los trabajos de campo se deben resolver muchos problemas, incluyendo:

*Diseño de la cepa.* La mayoría de las zonas contaminadas son únicas, y poseen distintas combinaciones de parámetros físicos que afectarán a los procesos biológicos necesarios para el tratamiento de los materiales tóxicos. Quizás sea necesario diseñar las cepas de forma única para su introducción en zonas específicas, con el fin de lograr que su gama de capacidades genéticas complemente los peligros ambientales a los que se vayan a enfrentar. Estos microorganismos se podrían construir para que degradasen más rápidamente los residuos y una gama más amplia de materiales (Ornstein, 1991b).

*Ingeniería genética.* Incluso después de muchos años de experiencia con estas técnicas, conseguir la manipulación genética no es algo trivial y, con frecuencia, emplea mucho tiempo. El tiempo necesario para manipular y ensayar implica un coste adicional para el productor. Otro factor importante es que los requisitos de datos para la evaluación de los riesgos aún no se han definido completamente. Sin embargo, cuando aumente la experiencia con los microorganismos derivados de forma tradicional, los procedimientos para la evaluación de riesgos mejorarán. Esto permitirá que los investigadores puedan inventar formas para incorporar características de seguridad en la líneas celulares modificadas y desarrollar protocolos de ensayo para evaluar tanto la utilidad como los peligros de la biorrecuperación. Esto, finalmente, permitirá llevar a cabo un verdadero análisis sobre los costes-beneficios, donde el coste no va a ser solamente una cantidad en dólares, sino que incluirá también los costes ambientales de una inactividad prolongada y/o los posibles efectos adversos del contaminante o del tratamiento.

*Factores de seguridad.* Se sigue investigando en el desarrollo de las características de seguridad específicas para limitar la supervivencia, y en el alcance de los microorganismos modificados con fines de biorrecuperación. Cuskey (1992) revisó los conceptos y aplicaciones de la restricción biológica que implicaban la introducción de genes letales controlados condicionalmente («genes suicidas») en los microorganismos modificados. La introducción del (de los) gen(es) posiblemente limitaría la capacidad del microorganismo de dispersarse más allá de una zona específica, o eliminaría la capacidad de supervivencia de la bacteria después de la reducción de un constituyente ambiental en particular.

*Reintroducción en el ambiente.* Las cepas manipuladas se han utilizado con frecuencia en el laboratorio durante muchos años. Durante este tiempo no han tenido que enfrentarse a las dificultades del exterior; en consecuencia, se han producido alteraciones sutiles no seleccionadas que hacen a la bacteria menos apta para el ambiente que su antecesora. Debido a esto, cuando se reintroduzca, quizás se dé un número insuficiente para llevar a cabo la recuperación.

Todos estos problemas tienen solución. Las posibles ventajas —mayor gama y velocidad de degradación— dadas a las bacterias mediante la intervención con técnicas de biología molecular siguen conduciendo las investigaciones de laboratorio. Los avances en la estructura reglamentaria (véase Capítulo 6, por Giamporcaro) motivan el desarrollo industrial. Sobre todo, la continua e incrementada pro-

ducción de residuos proporciona un fuerte incentivo para aumentar la eficacia en la biodegradación de materiales residuales.

### **Desventajas**

Varios factores han frenado la utilización de la ingeniería genética. Uno es la fuerte y persistente creencia de que existen todas las rutas posibles de degradación microbiana o, por lo menos, de que existe tal cantidad de enzimas y rutas que se puede desarrollar cualquier ruta deseada mediante una sencilla reorganización utilizando técnicas no recombinantes (Gibson et al., 1990; Pemberton et al., 1979; Don et al., 1985). La idea de que se deben agotar todos los recursos existentes ha actuado como un fuerte obstáculo para entrar en vías menos seguras y más caras que permitan desarrollar microorganismos eficaces mediante ingeniería genética. La facilidad con la cual se han aislado o manipulado genéticamente microorganismos mediante técnicas que no eran de biología molecular, técnicas que dan lugar a productos eficaces y que no requieren una revisión reglamentaria, ha frenado el crecimiento de la industria recombinante.

Quienes proponen la explotación de las rutas degradadoras existentes han reconocido que algunos productos químicos poseen elementos estructurales o sustituyentes que confieren a la molécula un alto grado de resistencia al ataque enzimático, o bien, están presentes en mezclas incompatibles con la degradación eficaz del componente tóxico (Timmis et al., 1987; Gerger y Shields, 1992), y requieren rutas y/o enzimas diseñadas específicamente (Rojo et al., 1987, 1988). Sin embargo, el éxito de las estrategias adicionales que implican, por ejemplo, el emparejamiento o el uso de presiones de control sobre la población, la transferencia de genes existentes entre organismos, o la alteración de genes reglamentarios (Rojo et al., 1987, 1988), a un coste relativamente más bajo del que implicaría el uso de técnicas más modernas de biotecnología, ha tenido un efecto inhibitorio sobre la investigación de los microorganismos utilizados para la biorrecuperación en la ingeniería genética actual. Todas estas técnicas tradicionales presuponen que la información genética está disponible, es decir, que se puede seleccionar fácilmente en los trabajos de laboratorio o de campo.

Desde una perspectiva puramente económica, un factor importante es la inexactitud reglamentaria junto con la resistencia de la opinión pública. Pocas industrias que se podría esperar que interviniesen en una investigación importante en este campo sienten la necesidad de hacerlo debido a las pocas garantías que se ofrecen de obtener beneficios frente a las inversiones a realizar. El coste de asumir estos riesgos reglamentarios fácilmente podría alcanzar millones de dólares.

Otro factor importante es la escasez de información científica básica respecto a las rutas degradadoras relevantes y sus modos de regulación. Son pocas las fuentes de financiación destinadas a la investigación que permiten el desarrollo de estos datos. Cuando se produce una financiación, casi siempre existe la necesidad directa de una implantación inmediata, en vez de desarrollar primero una información básica. En consecuencia, todo el conocimiento sobre el desarrollo de los or-

ganismos recombinantes con fines de biorrecuperación no solamente es patético, ¡está prácticamente desierto!

## Reconocimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a James Harvey, Vicegestor de Programas, Technical Resources Inc., Gulf Breeze, Florida, por su ayuda en la organización del material utilizado en este capítulo.

## Referencias bibliográficas

- Álvarez-Cohen, L., and P. L. McCarty. 1991a. Effects of toxicity, aeration, and reductant supply on trichloroethylene transformation by a mixed methanotrophic culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:228-235.
- Álvarez-Cohen, L., and P. L. McCarty. 1991b. Product toxicity and cometabolic competitive inhibition modeling of chloroform and trichloroethylene transformation by methanotrophic resting cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1031-1037.
- Ayalah, F. J. 1992. Evolution. In: *The Genetic Revolution* (ed. B. D. Davis), John Hopkins Press, Baltimore, pp. 178-196.
- Bedard, T. R., P. Allenza, and T. G. Lessie. 1984. Hyperinduction of enzymes of the phosphorylative pathway of glucose dissimilation in *Pseudomonas cepacia*. *Curr. Microbiol.* 11:143-148.
- Compeau, G. C., W. D. Mahaffey, and L. Patras. 1991. Full-scale bioremediation in contaminated soil and water. In: *Environmental Biotechnology* (ed. G. Omenn). Plenum Press: New York, pp. 91-110.
- Cuskey, S. M. 1992. Biological containment of genetically engineered organisms. In: *Microbial Ecology, Principles, Methods, and Applications* (ed. M. A. Levin, R. J. Seidler, and M. Rogul). McGraw-Hill: New York, pp. 911-918.
- Don, R. H., A. J. Weightman, H. J. Knackmuss, and K. N. Timmis. 1985. Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in *Alcaligenes eutrophus* JMP134(pJP4). *J. Bacteriol.* 161:85-90.
- Eaton, R. W., and K. N. Timmis. 1986. Characterization of a plasmid-specified pathway for catabolism of isopropylbenzene in *Pseudomonas putida* RE204. *J. Bacteriol.* 168:123-131.
- Engesser, K.-H., E. Schmidt, and J.-J. Knackmuss. 1980. Adaptation of *Alcaligenes eutrophus* B9 and *Pseudomonas* sp. B13 to 2-fluorobenzoate as growth substrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:68-73.
- Ensley, B. D. 1991. Biochemical diversity of trichloroethylene metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* 45:283-299.
- Focht, D. 1987. Performance of biodegradative microorganisms in soil; Xenobiotic chemicals as unexploited metabolic niches. In: *Environmental Biotechnology* (ed. G. Omenn). Plenum Press: New York, pp. 15-31.
- Fox, J. L. 1992. Assessing the scientific foundations of bioremediation. *ASM News* 58:483-485.

- Fox, B. G., J. G. Borneman, L. P. Wackett, and J. D. Lipscomb. 1990. Haloalkene oxidation by the soluble methane monooxidase from *Methylosinus trichosporium* OB3: Mechanistic and environmental implications. *Appl. Environ. Microbiol.* 29:6419-6427.
- Furukawa, H., T. D. Gaffney, and T. G. Lessie. 1987. Insertion-sequence-dependent rearrangements of *Pseudomonas cepacia* plasmid pTGL1. *J. Bacteriol.* 169:224-230.
- Gerger, R. R., and M. S. Shields. 1992. Expansion of the range of chloroaromatic compounds degraded by the trichloroethylene degrading strain *Pseudomonas cepacia*. Abs. AMS Q-210, (ed. H. Halvorsen, D. Pramer, and M. Rogul. 1985. Engineered organisms in the environment: Scientific issues. AMS, Washington, D.C.
- Gibson, D. T., G. J. Zylstra, and S. Chauhan. 1990. Biotransformations catalyzed by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* Fl. In: *Pseudomonas: Biotransformations, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology* (ed. S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, and S. Kaplan). ASM: Washington, D.C.
- Halvorsen, H. O., D. Pramer, and M. Rogul. 1985. Engineered organisms in the environment: Scientific issues. AMS, Washington, D. C.
- Harker, Alan R. 1991. Potential use of genetically engineered microorganisms in the remediation of environmental pollution. In: *Proceedings of the International Symposium on Ground Water in Practice*. Nashville, TN, 7/29-8/2/1991. ASCE: New York, pp. 232-237.
- Hildebrandt, W. W., and S. B. Wilson. 1991. On-site bioremediation systems reduce crude oil contamination. *J. Petrol. Technol.* 43:18-22.
- Hoeppel, R. E., R. E. Hinchee, and M. F. Arthur. 1991. Bioventing soils contaminated with petroleum hydrocarbons. *J. Ind. Microbiol.* 8:141-146.
- Knackmuss, J. H., W. Beckmann, E. Dorn, and W. Reinecke. 1976. Zum mechanismus der biologischen persistenz von halogenierten und sulfonierten aromatischen Kohlenwasserstoffen (On the mechanism of the biological persistence of halogenated and sulfonated aromatic hydrocarbons). *Zentralbl. Bakteriol.* (orig B) 162:127-137.
- Kellogg, S. T., D. K. Chatterjee, and A. M. Chakrabarty. 1981. Plasmid-assisted molecular breeding: New technique for enhanced biodegradation of persistent toxic chemical. *Science* 214:1133-1135.
- Krumme, M. L., R. L. Smith, S. M. Thiem, and D. F. Dwyer. 1991. Enumeration of *Pseudomonas* species B13 following injection into a sand and gravel aquifer. Abs. ASM Q71.
- Kukor, J. J., and R. H. Olsen. 1990. Molecular cloning, characterization and regulation of a *Pseudomonas pickettii* PKO1 gene encoding phenol hydroxylase and expression of the gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 172:4624-4630.
- Kukor, J. J., R. H. Olsen, and D. P. Ballou. 1988. Cloning and expression of the cata and catBC gene clusters from *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* 170:58-65.
- Levin, M. A. 1992. Bioremediation Safety Issues. United Nations Industrial Development Office (UNIDO). In press.
- Levin, M. A., G. H. Kidd, R. H. Zaugg, and J. R. Swarz. 1983. *Applied Genetic Engineering*. Noyes Press: Park Ridge, New Jersey, pp. 15-16.
- Oldenhuis, R., R. L. J. M. Vink, D. B. Jansenn, and D. B. Witholt. 1989. Degradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2819-2826.
- Ornstein, R. L. 1991a. Why timely bioremediation of synthetics may require rational enzyme redesign: Preliminary report on redesigning Cytochrome P450cam for TCE dehalogenation. In: *On-Site Bioreclamation* (ed. R. E. Hinchee and R. F. Olfenbuttel). Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 509-514.
- Ornstein, R. L. 1991b. Using molecular dynamics simulations on cambin to evaluate the

- suitability of different continuum dielectric and hydrogen atom models for protein simulations. *J. Biomol. Struct.* 7:1019-1042.
- Paulsen, M. D., and R. L. Ornstein. 1991. A 175-psec molecular dynamics simulation of camphor bound cytochrome p450 sub (cam). *Proteins II*:184-204.
- Paulsen, M. D., M. B. Bass, and R. L. Ornstein. 1991. Analysis of active site motion from a 175-psec molecular dynamics simulation of camphor bound Cytochrome p450 sub(cam). *J. Biomol. Struct. Dyn.* 9:187-203.
- Pemberton, J. M., B. Corney, and R. H. Don. 1979. Evolution and spread of pesticide degrading ability among soil microorganisms. In: *Plasmids of Medical, Environmental, and Commercial Importance*.
- Pettigrew-Pope, Tom. 1990. Increasing role for bugs in waste cleanup. *Waste Age* 21:86-88.
- Rojo, F., D. H. Pieper, K. H. Engesser, H. J. Knackmuss, and K. N. Timmis. 1987. Assemblage of ortho cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. *Science* 238:1395-1398.
- Rojo, F., J. L. Ramos, D. Pieper, K.-H. Engesser, H.-J. Knackmuss, and K. N. Timmis. 1988. Laboratory evolution of novel catabolic pathways. In: *Biosensors and Environmental Biotechnology* (ed. C. P. Hollenberg, H. Sahrn). Fischer Verlag: Stuttgart, pp. 65-74.
- Russel, H., J. Matthews, and G. Sewell. 1992. TCE removal from contaminated soil and ground water. U.S. Environmental Protection Agency, EPA/540/S-92/002: Washington, D.C.
- Sangodkar, U. M. X., P. J. Chapman and A. N. Chakrabarty. 1988. Cloning, physical mapping and expression of chromosomal genes specifying degradation of the herbicide 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) by *Pseudomonas cepacia* AC1100. *Gene* 71(2):267-277.
- Sayler, G. S. 1991. Contribution of molecular biology to bioremediation. *J. Haz. Mater.* 28:13-27.
- Shields, M. S., and M. J. Reagin. 1992. Selection of a *Pseudomonas cepacia* strain constitutive for the degradation of trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3997-3983.
- Shields, M. S., S. W. Hooper, and G. S. Sayler. 1985. Plasmid mediated mineralization of 4-chlorobiphenyl. *J. Bacteriol.* 163:882-889.
- Spain, J. C., 1990. Metabolic pathways for biodegradation of chlorobenzene. In: *Pseudomonas: Biotransformations, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology*. (ed. S. Silver, A. M. Chakrabarty, B. Iglewski, S. Kaplan). ASM: Washington, D.C., pp. 197-206.
- Taeger, K. H., J. Knackmuss, and E. Schmidt. 1988. Biodegradability of mixtures of chloro- and methyl-substituted aromatics: Simultaneous degradation of 3-chlorobenzoate and 3-methylbenzoate. *Appl. Microbiol.* 28:603-608.
- Timmis, K. N., F. Rojo, and J. L. Ramos. 1987. Prospects for laboratory engineering of bacteria to degrade pollutants. In: *Environmental Biotechnology* (ed. G. Omenn). Plenum Press: New York, pp. 61-79.
- Unterman, R. 1991. What is the Km of disappearance? In: *Environmental Biotechnology for Waste Treatment* (ed. G. S. Sayler, R. Fox and J. W. Blackburn). Plenum Press: New York, pp. 159-162.
- Williams, R. T., and C. A. Myler. 1990. Bioremediation using composting. *BioCycle* 31:78-80.
- Zylstra, G. J., L. P. Wackett, and D. T. Gibson. 1989. Trichloroethylene degradation by *Escherichia coli* containing the cloned *Pseudomonas putida* Fl toluene dioxygenase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:3162-3166.

# Capítulo 9

## BIOTRATAMIENTO APLICADO A SUELOS CONTAMINADOS CON FTALATOS: RECONOCIMIENTO Y SUPERACIÓN DE RETOS TÉCNICOS

---

**A. Keith Kaufman**

*División de Servicios de Biorrecuperación  
RESNA Industries, Incorporated  
Los Ángeles, California*

**Cheryl C. Kreuger**

*División de Servicios de Biorrecuperación  
RESNA Industries, Incorporated  
Los Ángeles, California*

La tecnología de biorrecuperación aplicada se está utilizando cada vez más como una forma deseable de limpieza ambiental debido a las muchas ventajas prácticas y económicas que ofrece su utilización de una forma apropiada. En la literatura relativa al tema se pueden encontrar numerosas historias de casos que documentan la biorrecuperación eficaz de aguas subterráneas y suelos afectados por diversos contaminantes ambientales (véanse Refs. 1, 2, 3, 5, 6, 9, 10, 11, 14, 15, 16). Las agencias reglamentarias también han contribuido por su parte al crecimiento continuado de la industria<sup>12</sup>, especialmente debido al muy famoso tratamiento con recuperación que se realizó en parte del derrame de petróleo del *Exxon Valdez*<sup>4</sup> y en otros incidentes marítimos.

La mayor parte de las aplicaciones de biorrecuperación se han asociado a la limpieza de la contaminación ambiental provocada por los hidrocarburos del petróleo, como el petróleo crudo, diésel, y otros productos refinados. Con frecuen-

cia, los métodos de biotratamiento utilizados en estas aplicaciones se presentan casi como rutinarios, con la aportación de escasa información, si existe alguna, en relación a los impactos potenciales (o reales) del tratamiento provocados por los diferentes parámetros fisicoquímicos y/o microbiológicos. Pocos proveedores de productos o servicios asociados con el biotratamiento publicarán descripciones que hagan referencia a los fracasos en la recuperación, independientemente de la causa, debido a las obvias consecuencias adversas que tendría sobre sus negocios esta información negativa.

Para intentar proporcionar una perspectiva más realista sobre la biorrecuperación aplicada, este capítulo tratará sobre nuestros esfuerzos en relación a la limpieza de aproximadamente 1.250 m<sup>3</sup> de suelo afectado por butilbencil ftalato (resina plastificadora)<sup>13</sup>, contaminación provocada por el descarrilamiento de un tren en la zona norte de Arizona. Aunque la operación tuvo éxito, los factores físicos y biológicos fueron un reto tanto para la operación como para el mantenimiento de la biorrecuperación, la interpretación de la influencia que ejercieron estos factores fue esencial para completar el proyecto de forma rentable y eficaz. Aunque, obviamente, no se trataba de un trabajo de biorrecuperación rutinario y típico, las consideraciones surgidas en este capítulo, sin duda, tendrán su aplicación en muchas operaciones de biotratamiento, incluso en aquellas que implican tan sólo a los hidrocarburos «sencillos» del petróleo.

## Introducción

Al final del invierno de 1987, se produjo el descarrilamiento de un tren en una zona poco poblada del norte de Arizona, dando lugar a la emisión ambiental de butilbencilftalato, una resina plastificadora<sup>13</sup>. También se descargaban, mezcladas en los suelos de alrededor, diversas cantidades de cristales de urea, aceite de soja, pieles de ganado, y harina de maíz. Cuando finalizaron las actividades de respuesta-emergencia, se inició una investigación para determinar la extensión de la contaminación y evaluar las alternativas de recuperación. Esta investigación reveló que aproximadamente 1.250 m<sup>3</sup> de suelo estaban afectados por ftalatos y los restantes materiales, mezclados de modo heterogéneo, junto con residuos de ferrocarril en forma de piezas de tren. La contaminación, en general, se confinaba a los 2 m superiores del suelo, y las aguas subterráneas no estaban afectadas. Aunque buscando en la literatura relativa al tema no se encontró un precedente para la biorrecuperación de suelos contaminados con ftalatos, el conocimiento de la composición química del material apoyaba la posible aplicabilidad de una biodegradación aerobia (en la superficie) de este compuesto, y, en consecuencia, se inició una investigación global de tratabilidad.

## Investigación de biotratabilidad

La investigación de biotratabilidad se lleva a cabo con frecuencia para caracterizar las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas que se deben realizar en el lugar con el fin de optimizar la actividad y eficacia de la biorrecuperación<sup>8,11</sup>. Cuando se

inicia una investigación de este tipo, es importante plantear si se implantará una aproximación de bioestimulación o de bioaumentación. Esta determinación normalmente se realiza en base a la siguiente información:

- *A favor de la bioestimulación.* Gran proporción de biodegradadores específicos del contaminante dentro de la población microbiana lugar-específica, y el contaminante es la única (o principal) fuente de carbono disponible.
- *A favor del bioaumentación.* Pequeña proporción de biodegradadores específicos del contaminante dentro de la población lugar-específica, y el contaminante no es la única (o principal) fuente de carbono disponible.

Teniendo en cuenta la importante presencia de fuentes de carbono alternativas, así como lo reciente de la contaminación (no había pasado el tiempo suficiente como para que se desarrollase una gran población de degradadores de los ftalatos), los esfuerzos subsiguientes de biotratabilidad se dirigieron hacia el tratamiento mediante el bioaumentación. Cuando se establecieron las condiciones óptimas para la biodegradación y se caracterizaron las pocas especies microbianas autóctonas mejor adaptadas para el proceso, se llevó a cabo una investigación a escala de laboratorio sobre muestras de suelo lugar-específicas. Los datos obtenidos en esta parte de la evaluación se utilizaron para validar la factibilidad de la biorrecuperación así como para establecer un marco temporal que permitiese pronosticar cuándo se completaría el tratamiento. Después se utilizó esta información en el diseño de un plan de trabajo que sería revisado por el cliente y las agencias reglamentarias. El objetivo de limpieza aprobado para el proyecto se fijó en una concentración media de 100 ppm de butilbencil ftalato.

Cuando se inició la investigación de biotratabilidad, nos dimos cuenta de las condiciones atípicas que existían en el lugar del proyecto (aunque en ese momento no éramos conscientes de lo muy atípicas que estas condiciones iban a ser), principalmente, la presencia en el suelo de sustratos orgánicos competitivos (aceite de soja y harina de maíz), y las diferencias de temperatura asociadas con la climatología del norte de Arizona (bajo cero en invierno y 38 °C en verano). Además, las altas concentraciones de urea no parecían favorecer el proceso debido a las posibles ineficacias asociadas con este compuesto como fuente de nitrógeno<sup>7</sup> y su potencial (y real) liberación de gas amoníaco (esto hizo necesario el uso de respiradores durante los primeros seis meses de operación). Con estos factores en mente, realizamos la investigación de biotratabilidad esperando que se generase lo siguiente:

1. Aislados biodegradadores que se adaptarían metabólicamente para desarrollar una actividad sobre el butilbencilftalato, y que no estuviesen competitivamente inhibidos por la presencia de otros orgánicos.
2. Aislados degradadores de ftalatos que tendrían actividad en una amplia gama de temperaturas y de pH.
3. Aislados degradadores de ftalatos que utilizarían urea y amoníaco como fuentes de nitrógeno.

Después de una investigación de seis semanas, se seleccionaron tres aislados autóctonos para los ensayos piloto y su posible uso en el trabajo de campo. Además, también se identificaron los fosfatos y otros nutrientes necesarios para mantener el pH óptimo del suelo y reponer los constituyentes inorgánicos asimilados por los organismos en función de su metabolismo biodegradador.

Cuando se completaron estos análisis, los ensayos a escala piloto empleando ambos sistemas de control revelaron que el sistema de ensayo (bioaumento) reducía los niveles de ftalatos desde 38.000 ppm hasta 20.000 ppm en solamente 15 días, lo que equivale a una bajada del 47 por ciento en los sustratos. Esta actividad coincidió con un aumento en el número observado de las células biodegradadoras viables. En los controles, no se observó ningún cambio importante en los niveles de ftalatos o en las concentraciones microbianas.

Aunque creíamos, debido a la diversidad de las características fisicoquímicas únicas asociadas a este proyecto, que era poco probable conseguir estas cinéticas en el trabajo de campo; creíamos también que los resultados de las investigaciones mencionadas anteriormente apoyaban la viabilidad y eficacia de un tratamiento de biorrecuperación a gran escala.

## **Implantación en campo y resultados obtenidos**

Se construyó una célula forrada de biotratamiento en la superficie, de tal forma que pudiese acomodar los 1.250 m<sup>3</sup> de suelos contaminados en una capa con un grosor de unos 45 cm. Los suelos contaminados se colocaron sobre una capa de 15 cm de suelo limpio que actuaba como tapón contra la rotura del forro durante las operaciones subsiguientes de mezcla del suelo. Se colocó a lo largo del perímetro de la célula de tratamiento un sistema de distribución hidráulica para proporcionar una aplicación uniforme de los bionutrientes acuosos y de los microorganismos degradadores de ftalatos. Periódicamente, se utilizó un recubrimiento de plástico transparente sobre los suelos tratables para aumentar su calor y retención de humedad.

A finales de julio de 1989 se inició el biotratamiento. Éste consistía en la aplicación de bionutrientes y microorganismos degradadores de ftalatos cada dos semanas, mezclándolo semanalmente. En los dos primeros meses de tratamiento se produjo una reducción del 40 por ciento en la concentración de ftalatos. La reducción de los ftalatos con el tiempo se correlacionó bien con los incrementos observados en el número de microorganismos, tanto en el cómputo general como en el selectivo (de degradadores de ftalatos) de las muestras de suelo. Sin embargo, durante los meses siguientes más fríos (cuando las temperaturas bajaron por debajo de cero), no se pudo demostrar la existencia de una biodegradación continuada de los ftalatos, aunque se observó durante el mismo período un aumento continuado en la población microbiana y en las conversiones de nitrógeno. Cuando volvió el tiempo más cálido, una vez más se constató la biodegradación activa de los ftalatos con una tasa de reducción muy similar a la observada durante la primavera y el verano anteriores (Fig. 9.1). Aunque este período dio lugar a otra caída sustancial

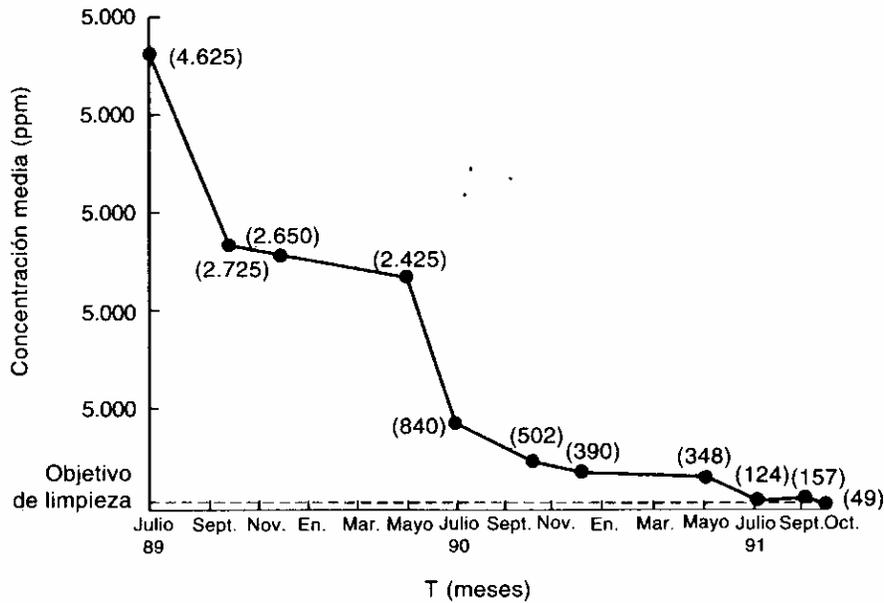


Figura 9.1. La reducción del butilbencilftalato en suelos.

en las concentraciones de ftalatos, los niveles aún no habían llegado a los establecidos bajo el objetivo de limpieza. Por lo tanto, se necesitó otra temporada de tratamiento para completar la recuperación. Para octubre de 1991, los niveles de ftalatos se habían reducido a una media de 49 ppm, lo que representa una reducción de aproximadamente el 99 por ciento en la concentración global.

## Principales retos operativos y de rendimiento

### Cristales de urea

Aunque históricamente se ha empleado como enmienda de suelo en cantidades específicas, la urea no es necesariamente la elección deseada como complemento de nitrógeno<sup>11</sup>, especialmente cuando está presente en concentraciones importantes. La inquietud más obvia son los posibles peligros asociados a la descomposición de la urea y la consiguiente liberación de amoníaco. De hecho, el impacto inmediato más notable en la zona del descarrilamiento durante muchos meses después del accidente fue el penetrante olor a amoníaco. Los niveles de gas amoníaco estuvieron muy por encima de los límites de exposición aceptables, siendo necesario el uso de respiradores durante más de seis meses de operación en la zona.

Si bien el hecho no se conoce ni es muy apreciado, la urea (y sus constituyentes de amoníaco) es eficaz como fuente de nitrógeno solamente cuando la mayoría de los microorganismos señalados para su uso son productores de ureasa (la ureasa es una enzima, producida solamente por algunos organismos específicos) y/o pueden utilizar el nitrógeno del amoníaco (sólo lo pueden hacer poblaciones seleccionadas). Estas características, reconocidas durante muchos años como importantes desde el punto de vista del diagnóstico para la identificación de microorganismos, raramente se tienen en cuenta en la práctica de la biorrecuperación. Desgraciadamente, no reconocer la importancia de estos criterios puede afectar a la eficacia y éxito final del biotratamiento.

Como se señala en la Tabla 9.1, de los tipos de aislados degradadores de ftalatos seleccionados para la biorrecuperación, solamente uno fue capaz de utilizar eficazmente el nitrógeno del amoníaco. El nitrato y el nitrito, normalmente fuentes de nitrógeno eficaces para el metabolismo oxidativo (aerobio) (como se trata de componentes oxidados, estos compuestos pueden proporcionar oxígeno y nitrógeno), fueron claramente más idóneos para los organismos degradadores de los ftalatos. Por desgracia, la urea y el amoníaco prevalecían en el lugar impactado.

Creímos, y la evidencia parece validarlo (Tabla 9.2), que gran parte del amoníaco se podría oxidar hasta nitrato y/o nitrito mediante una mezcla de suelo vigorosa y frecuente. Además, los análisis previos de biotratamiento también habían indicado la presencia de bacterias nitrificadoras que se producen de forma natural y que, según preveíamos, actuarían sobre el amoníaco, convirtiéndolo en una forma más oxidada para el uso de los biodegradadores. Si bien sería difícil determinar qué porción de las conversiones era atribuible a un proceso dado, el resultado final fue que, con el tiempo, los niveles de amoníaco descendieron, al mismo tiempo que aumentaban las formas oxidadas de nitrógeno. Estas acciones sirvieron para incrementar el rendimiento metabólico de los microorganismos degradadores de ftalatos, ya que sin una utilización eficaz del nitrógeno (para su incorporación a las enzimas degradadoras de ftalatos y otras proteínas) no se podría haber producido una biodegradación eficaz de los ftalatos.

**TABLA 9.1.** Características de los organismos degradadores de ftalatos seleccionados para la biorrecuperación del suelo

Identificación	Nitrógeno de			Rango de crecimiento	
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	pH	Temperatura
<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	+	+	7,75-8,75	6-35 °C
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	+	-	6,75-7,75	18-25 °C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	-	6,75-8,75	6-35 °C

**TABLA 9.2.** Resultados del control del proceso biológico durante la implantación en los trabajos de campo

Fecha	Temperatura suelo/aire (°C @ 1 P.M.)	pH	NO <sub>3</sub> <sup>-a</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-b</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+c</sup>	CFU/g suelo × 10 <sup>6</sup> (Selectivo) <sup>d</sup>	P <sup>e</sup>
7/89	31/27	9,2	ND <sup>f</sup>	ND	7.500	0,71	4.625
10/89	26/21	9,0	ND	ND	1.800	48	2.725
1/90	3/-2	8,8	ND	ND	923	336	2.650
5/90	22/21	8,9	25	25	800	280	2.425
7/90	25/24	8,6	25	25	940	360	840
10/90	22/22	8,7	50	40	1.075	221	502
12/90	2/-2	8,7	ND	40	750	311	390
5/91	14/13	8,7	ND	25	875	250	348
7/91	29/29	8,6	ND	25	390	163	124
8/91	28/27	8,7	ND	375	317	151	225
9/91	21/19	8,4	ND	375	225	190	157
10/91	27/22	8,7	ND	370	190	407	49

<sup>a</sup> NO<sub>3</sub>; nitrato en ppm (límite de detección = 1,0 ppm).

<sup>b</sup> NO<sub>2</sub>; nitrito en ppm (límite de detección = 1,0 ppm).

<sup>c</sup> NH<sub>4</sub>; amoníaco en ppm (límite de detección = 1,0 ppm).

<sup>d</sup> CFU/g suelo; número de degradadores microbianos de ftalato por gramo de suelo.

<sup>e</sup> P; concentración media de ftalato en ppm (n = 4 muestras del compuesto).

<sup>f</sup> ND; no detectado.

## Fuentes de carbono alternativas y temperatura

Sin duda, los factores más influyentes que impactaron directamente sobre el rendimiento y la duración de este proyecto fueron los dos parámetros, aparentemente conectados: fuentes alternativas de carbono (sustrato) y temperatura.

Aunque tiene una clara influencia sobre la cinética del metabolismo biodegradador, la temperatura por sí sola no puede romper o posibilitar un proyecto de biorrecuperación, ya que las características microbianas van parejas a las temperaturas previstas durante el tratamiento en un lugar determinado. Sabiendo que las temperaturas van a ser bajas, por ejemplo, se necesitarían microorganismos psicrotolerantes (tolerantes al frío) y/o psicrófilos (amantes del frío). Como ejemplos de tales organismos se pueden citar aquellos que estropean los alimentos en un frigorífico. De forma inversa, unas expectativas de temperaturas altas sugerirían el uso de microorganismos termotolerantes (tolerantes al calor) y/o termófilos (amantes del calor). La diferencia entre «tolerante» y «amante» es que los primeros pueden sobrevivir y reproducirse (pero no necesariamente prosperar) en un rango de temperatura dado, mientras que los segundos se reproducen *preferentemente* en ese

rango de temperatura. El uso de esta información en el desarrollo de un bioproceso puede permitir el desarrollo de la biorrecuperación en una variedad más amplia de climas, aunque las cinéticas a bajas temperaturas casi siempre serán más lentas debido a la termodinámica molecular.

En el norte de Arizona, la temperatura del aire fluctúa entre bajo cero en el invierno y 38 °C en verano. Por lo tanto, era necesario utilizar, de la mejor forma posible, organismos que tuviesen una amplia gama de tolerancia a la temperatura. Durante la elección del proceso de biotratabilidad, se seleccionaron microorganismos degradadores de ftalatos, en parte, por su capacidad de reproducción en un ambiente que iba a estar sujeto a amplias fluctuaciones de temperatura (Tabla 9.1). Además de utilizar un recubrimiento de plástico transparente que producía un efecto tipo invernadero sobre los suelos y evitaba su congelación, la aplicación de estos organismos dio lugar a una población creciente incluso durante los meses de invierno (Tabla 9.2). Sin embargo, al contrario que en los meses más calurosos, no se observó una reducción en la concentración de ftalatos (Fig. 9.1). Si el número de biodegradadores de ftalatos, tanto generales como selectivos, seguía subiendo durante los meses de invierno, entonces, ¿por qué no descendía la concentración de ftalatos? La respuesta probablemente se relaciona con la presencia de sustratos carbónicos alternativos, harina de maíz y aceite de soja, emitidos conjuntamente durante el descarrilamiento.

Como los microorganismos no se pueden reproducir sin utilizar carbono, sabíamos que se estaba usando *algún tipo de carbono* porque se podía observar una reproducción microbiana. Además, como sabíamos que no se estaban utilizando los ftalatos, era muy probable que se estuviesen metabolizando las fuentes alternativas de carbono —harina de maíz y aceite de soja—. Pero si se producía la degradación del sustrato alternativo durante los meses de invierno, ¿por qué parece que *no se producía* durante los meses más calurosos?

La respuesta probablemente se relaciona con los efectos combinados de la genética y fisiología bacteriana. Las enzimas inducibles necesarias para la degradación de los ftalatos normalmente no son innatas (constitutivas) en la mayoría de los microorganismos, ya que la mayoría nunca han estado en «contacto» con ftalatos y, por lo tanto, no habrían evolucionado la maquinaria genética y metabólica para degradar este compuesto. De esta forma, los procesos adaptativos y metabólicos necesarios para la síntesis de las enzimas degradadoras de ftalatos serían muy exigentes energéticamente. La mayoría de los organismos probablemente ya poseen las enzimas metabólicas necesarias para los procesos degradadores que implican al aceite de soja (grasas) y harina de maíz (almidón). Por lo tanto, su síntesis de nuevo, con sus consiguientes demandas energéticas, no sería necesaria. Aunque sería ineficaz para los degradadores de ftalatos volver al metabolismo del sustrato carbonoso «fácil» (harina de maíz/aceite de soja) durante el verano, los datos de este proyecto sugieren que tal reversión se produce en el tiempo más frío. Es evidente que bajo estas condiciones, se requiere menos energía para volver a la ruta enzimática degradadora del sustrato que para mantener la biosíntesis activa de las enzimas degradadoras de los ftalatos. Aunque quizás se puedan dar otras interpretaciones a los datos y resultados observados en los trabajos de campo, una

explicación así encaja con las circunstancias y está en sintonía con la bioquímica, genética y fisiología microbiana conocida.

## Conclusión

Las investigaciones de biotratabilidad llevadas a cabo al principio del proyecto demostraron que, bajo las condiciones apropiadas, los ftalatos se pueden biodegradar eficaz y rápidamente. El término «apropiado» claramente no se pudo aplicar en este proyecto de biotratamiento en particular, y para el éxito de este trabajo fueron cruciales los esfuerzos realizados en relación a anticipar los retos fisicoquímicos y microbiológicos asociados, así como, el intentar comprender la importancia de las observaciones llevadas a cabo en el laboratorio y en los trabajos de campo. Aunque fue imposible controlar algunos aspectos de este proyecto inusual [como tratar con el doble de la lluvia anual normal y con una temporada de nieve que, en un año, duró 8 meses (es regla común que *ningún* equipo de campo se puede transportar sobre las carreteras públicas cuando se puede ver nieve sobre el suelo)], la atención a estas variables sin duda ayudó a mejorar una serie de circunstancias difíciles con el fin de lograr los objetivos de recuperación. Si bien el coste global de este proyecto excedió los presupuestos iniciales, la recuperación aún se llevó a cabo y se completó por menos de lo que supondría el coste proyectado para los métodos alternativos considerados (vertedero, fijación, oxidación).

Con demasiada frecuencia, la biorrecuperación en la superficie (especialmente cuando se trata de hidrocarburos del petróleo) se trivializa como algo casi indiferente y rutinario, que requiere poco más que la adición de agua y nutrientes, mezclándolos periódicamente. Aunque una aproximación de este tipo a veces puede funcionar, el proyecto discutido anteriormente ejemplifica algunas de las complejidades que se pueden encontrar cuando se practica la biorrecuperación. Existen muchos otros ejemplos de proyectos donde las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas «atípicas» o «inusuales» merecen algo más que una consideración frívola. Como este u otros muchos proyectos ilustran, la biorrecuperación puede tener éxito incluso en condiciones extraordinarias, siempre y cuando estas condiciones, y su posible impacto sobre el biotratamiento, se evalúen de forma cuidadosa y meditada.

## Referencias bibliográficas

1. Applied BioTreatment Association. 1989. Compendium of Case Histories. Applied Biotreatment Association, Washington, D.C.
2. Barnhart, M. 1987. Case history: Biological soil treatment in Buffalo, N.Y. *Haz. Mat. Waste Mgmt.* September-October, pp. 42-44.
3. Basta, N. 1987. Better biological processes boost wastewater treatment. *Chem. Eng.* April 27, pp. 14-15.

4. Berkey, Edgar. 1991. Evaluation process for the selection of bioremediation technologies for Exxon Valdez oil spill. In *Environmental Biotechnology for Waste Treatment*. Plenum Press, New York/London.
5. *Chemical Marketing Reporter*. 1987. Microbes used to fight waste in groundwater. September 28, p. 27.
6. Compeau, Geoffrey C., et al. 1991. Full-scale bioremediation of contaminated soil and water. In *Environmental Biotechnology for Waste Treatment*. Plenum Press, New York/London, pp. 91-109.
7. Frankenberger, W. T., Jr. 1988. Use of urea as a nitrogen fertilizer in bioreclamation of petroleum hydrocarbons in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 40:66-68.
8. Frankenberger, W. T., Jr. 1992. The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. In *Hydrocarbon Contaminated Soils and Groundwater*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, pp. 237-293.
9. Heyse, E., et al. 1986. *In situ* aerobic biodegradation of aquifer contaminants at Kelly Air Force Base. *Environ. Progr.* 5:207-211.
10. Hildebrandt, W. W., and S. B. Wilson. 1992. The use of modern on-site bioremediation systems to reduce crude oil contamination on oilfield properties. In *Hydrocarbon Contaminated Soils and Groundwater*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, pp. 487-499.
11. Kaufman, A. K., and C. C. Krueger. 1988. Bioremediation of fuel-contaminated soil: A case history. In *Proceedings, Hazmacon, 1988*. Anaheim, CA, pp. 743-752.
12. Kaufman, A. Keith. 1991. The technical, economic, and regulatory future for bioremediation: An industry perspective. In *Environmental Biotechnology for Waste Treatment*. Plenum Press, New York/London, pp. 47-51.
13. Monsanto Company. Material Safety Data. Santicizer 2051 Plasticizer. Monsanto Company, St. Louis, MO.
14. Piotrowski, M. R. 1992. Full-scale, *in situ* bioremediation at a superfund site: A progress report. In *Hydrocarbon Contaminated Soils and Groundwater*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, pp. 371-400.
15. Skiba, Robert S., et al. 1992. Biological treatment: Soil impacted with crude oil. In *Hydrocarbon Contaminated Soils and Groundwater*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, pp. 409-415.
16. Suflita, J. M., et al. 1988. Anaerobic biotransformation of pollutant chemicals in aquifers. *J. Ind. Microbiol.* 3:179-194.

# Capítulo 10

## **BIORRECUPERACIÓN ANAEROBIA A ESCALA REAL DE SUELOS CONTAMINADOS CON DINOSEB \***

---

**D. J. Roberts, R. H. Kaake, S. B. Funk,  
D. L. Crawford y R. L. Crawford**

*Centro de Investigación para la Recuperación de Residuos Peligrosos  
Departamento de Bacteriología y Bioquímica  
Universidad de Idaho  
Moscow, Idaho*

Las tres aproximaciones generales a la recuperación de suelos se realizan mediante métodos físicos, químicos y biológicos. Los tratamientos físicos incluyen la incineración y vitrificación. Estos procesos convierten los residuos en inertes y aun así pueden necesitar una evacuación como residuos peligrosos (p. ej., cenizas de incineración). Algunos procesos, como la estabilización, reducen la movilidad de un contaminante en el suelo mediante la adición de agentes estabilizantes (cemento o resinas de plásticos) que enlazan o envuelven los residuos en una matriz impermeable, evitando la migración del contaminante. Otros métodos de tratamiento, como el arrastre por vapor o la extracción, separan y recuperan del medio los contaminantes según sus propiedades físicas (volatilidad o solubilidad). Los métodos de tratamiento biológico utilizan la diversidad metabólica de los microor-

---

\* Publicación N.º 91.521 de Idaho Agricultural Experimental Station (Estación Experimental Agrícola de Idaho).

ganismos para transformar los compuestos tóxicos en moléculas inocuas que pueden proporcionar energía o actuar como precursores metabólicos de los microorganismos.

La complejidad del suelo representa un reto único para la industria de la biorrecuperación. Aunque la biodegradación es un proceso natural y forma parte del ciclo de nutrientes en el suelo, muchos de los compuestos añadidos al suelo como consecuencia de la actividad humana son tóxicos y recalcitrantes. Sin embargo, el número creciente de publicaciones que indican la biodegradación con éxito en el laboratorio de muchos de los compuestos antropogénicos recalcitrantes, ha estimulado la fe en la biorrecuperación como tecnología útil para el tratamiento de suelos contaminados.

Muchos estudios de laboratorio dependen de la desaparición de un compuesto como medida de biodegradación. Esto puede ser equivoco, ya que en algunos casos la desaparición de una molécula específica puede suponer su transformación en un compuesto más tóxico. Un ejemplo es la conversión, mediante un organismo de suelo manipulado genéticamente, del herbicida relativamente no tóxico ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en el compuesto mutagénico 2,4-diclorofenol<sup>43</sup>. La producción de 2,4-diclorofenol a partir de 2,4-D puede haber sido la responsable de los efectos tóxicos observados sobre la población natural del suelo después de la adición del organismo manipulado genéticamente en suelos contaminados con 2,4-D<sup>14</sup>. Este ejemplo muestra la necesidad de diferenciar entre los resultados obtenidos en estudios de laboratorio y las aplicaciones reales de la biorrecuperación. Sims et al.<sup>44</sup> presentaron un trabajo sobre las aproximaciones a la biorrecuperación de suelos contaminados, señalando la necesidad de una caracterización completa del lugar, de estudios de tratabilidad y, posiblemente, de la integración de métodos de recuperación físicos, químicos, y biológicos en un tratamiento conjunto para conseguir la limpieza total de una zona contaminada.

### **Prácticas actuales en la biorrecuperación de suelos**

La investigación en la biorrecuperación de suelos contaminados debe englobar no solamente la naturaleza del compuesto y de sus compuestos intermedios de transformación, sino también el ambiente que lo rodea. Los parámetros físicos, como la temperatura, el pH, y el potencial redox, así como la presencia de otros contaminantes y las afinidades de enlace que los compuestos contaminantes pueden tener respecto al suelo, afectan a la separación de productos químicos específicos en los suelos contaminados. Otro factor muy importante a la hora de implantar las tecnologías de tratamiento de suelos es el estado de los nutrientes del suelo. Muchos suelos aparecen limitados en nutrientes, y se deben suministrar nutrientes de oxígeno, nitrógeno y fosfatos para asegurar que los microorganismos se encuentren en un estado metabólico activo. El *bioaumentación*, proceso de adición de nutrientes en ambientes contaminados para estimular la destrucción biológica de los contaminantes, se ha utilizado con éxito durante algún tiempo para la recuperación de suelos contaminados con derrames de petróleo<sup>1,3</sup>.

Otra característica importante del suelo que se debe considerar cuando se está planificando un programa de recuperación es la competencia biológica del suelo. Muchos suelos contendrán la población microbiana apropiada para la degradación de los contaminantes presentes en dicho suelo, especialmente si el suelo presenta bajas concentraciones de contaminantes que han estado presentes durante largos periodos de tiempo. Con frecuencia, la flora autóctona se puede estimular de forma que degrade un contaminante mediante la adición de un solo nutriente. Sin embargo, algunos suelos pueden ser incompetentes debido a que el contaminante es tóxico para los microorganismos que deben llevar a cabo el metabolismo del compuesto, o debido a otros factores ambientales.

Para mejorar la competencia biológica de un suelo en particular, se añaden frecuentemente inóculos microbianos. Los inóculos microbianos tienen más éxito si se trata de organismos obtenidos en el ambiente en el que van a ser aplicados. Se ha ensayado el bioaumentación para la degradación de contaminantes utilizando cepas de laboratorio a partir de cultivos puros y/u organismos modificados genéticamente bajo condiciones ambientales, pero no ha tenido el éxito esperado, probablemente debido a la competencia realizada por la microflora natural<sup>40</sup>. La adición de estiércol y fangos de aguas residuales a los suelos contaminados se ha utilizado con éxito para mejorar sus capacidades degradadoras<sup>15,35</sup>.

Muchos contaminantes del suelo se pueden eliminar mediante métodos aerobios. Estos métodos, que se describen a continuación, son los que se utilizan más ampliamente y los más comprendidos para el tratamiento de suelos. Cada método se puede mejorar mediante los procedimientos de bioaumentación descritos anteriormente. La Tabla 10.1 resume las ventajas e inconvenientes de las tecnologías actuales de biorrecuperación de suelos.

### **Tratamiento en lechos**

El tratamiento en lechos es un método de tratamiento aerobio aplicable a muchos tipos de suelos contaminados. El suelo contaminado se trata en lechos de tratamiento sobre la superficie. Los lechos de tratamiento normalmente son fosas revestidas con poliuretano de alta densidad que después se cubre con arena limpia para permitir el drenaje. El drenaje, que se puede tratar por separado o recircular, se recolecta mediante unas tuberías perforadas. Después, el suelo contaminado se esparce sobre la capa de arena. En Estados Unidos, las normativas requieren que estas fosas contengan una capa de arena y un sistema recolector del lixiviado bajo el forro de poliuretano para recuperar cualquier material que pueda escapar si se rompe el forro.

El proceso de tratamiento en lechos se puede optimizar diluyendo el suelo contaminado con suelo limpio para reducir su toxicidad inicial, así como para controlar algunos parámetros físicos, como la aireación, el pH, la humedad del suelo y la temperatura. La aireación se lleva a cabo frecuentemente volteando el suelo, o, en sistemas más mecanizados, mediante aireación forzada. Cuando se emplea este último sistema, las parcelas deben cubrirse y el aire saliente se debe limpiar mediante filtros. Para controlar la temperatura, se puede emplear aire caliente, o el

TABLA 10.1. Comparación entre las tecnologías de biorrecuperación

Tecnología	Ventajas	Desventajas	Aplicación/contaminante	Referencias
Tratamiento en lechos	Procedimiento sencillo No costoso Método aceptado actualmente	Tasas de degradación lentas Frecuentemente no se separa la contaminación residual Altos riesgos de exposición Puede requerir largos periodos de incubación	Contaminación superficial Proceso aerobio Niveles de contaminación bajos a medios Pentaclorofenol Petróleo y gasolina HPAs	9,15,19,40,44,54
Compostaje	Más rápidas tasas de reacción Poco costoso Autocalentamiento	Necesita agentes espesantes Requiere aireación A menudo es necesaria la adición de nitrógeno Altos riesgos de exposición Contaminación residual Los periodos de incubación van de meses a años	Contaminación superficial Proceso aerobio Puede tratar niveles de contaminación altos Explosivos nitroaromáticos Fangos de aguas residuales aerobios Petróleo y gasolina	9,23,27,34,38,49, 50,54,59
<i>In situ</i> (BIS)	Relativamente poco costoso Bajos riesgos de exposición No es necesaria la excavación	Bajas tasas de degradación Menos control sobre los parámetros ambientales Necesita una buena caracterización hidrogeológica del lugar Los periodos de incubación van de meses a años	Contaminación profunda Condiciones reductoras aerobias o de nitratos Niveles de contaminación bajos a medios. Petróleo y gasolina Aromáticos clorados Hidrocarburos clorados	1-6,12,13,22,30, 32,33,39-42,45,54
Biorreactor de lechada	Buen control sobre parámetros Buen contacto Aumenta la adsorción del compuesto del suelo Rápidas tasas de degradación Los periodos de incubación van de días a semanas	Altos costes de inversión Limitado por el tamaño del reactor Altos riesgos de exposición	Contaminación superficial Compuestos recalcitrantes Suelos que enlazan el compuesto fuertemente	7,10,11,16,29,31, 36,53,55,59

«efecto invernadero» en un sistema cerrado. El tratamiento en lechos se ha utilizado ampliamente en zonas de refinerías de petróleo y en zonas contaminadas con residuos de aromáticos polinucleares, o pentaclorofenol (PCP) (p. ej., zonas conectadas con la industria de la madera).

## Compostaje

El *compostaje* es una tecnología de biorrecuperación aerobia similar al tratamiento en lechos. En esta técnica, el suelo contaminado se mezcla con astillas de madera, paja, u otro agente espesante para proporcionar una porosidad que permita un mejor flujo del aire. El compostaje se puede llevar a cabo en un biorreactor con el suministro de aire forzado para proporcionar la aireación, o en pilas abiertas (hileras), que se voltean periódicamente para facilitar el contacto con el oxígeno. También se emplea la adición de materiales espesantes para aumentar la actividad microbiana mediante el suministro de una fuente de carbono de fácil uso. El metabolismo aerobio de grandes cantidades de carbono genera calor, por lo tanto, los tratamientos de compostaje, a menudo, se producen a altas temperaturas. Se pueden conseguir tasas altas de degradación, aunque el contacto con el oxígeno tiende a ser pobre.

En el compostaje, como en cualquier método de tratamiento biológico, se deben ajustar y controlar algunos parámetros ambientales, como el contenido de humedad y el pH. El contenido de nitrógeno de una pila de compost requiere una atención especial debido a los altos contenidos en carbono de los agentes espesantes. A menudo, se añade estiércol a las operaciones de compostaje como fuente de nitrógeno y fuente de organismos. Las operaciones de compostaje normalmente funcionan como operaciones discontinuas, reutilizando una parte de una antigua pila de compost como inóculo para las nuevas. Se han realizado operaciones de compostaje experimentales con suelos contaminados con compuestos nitroaromáticos explosivos, como el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT)<sup>17,23,27,59</sup>.

## Reactores agitados o de lechada

Durante años, las aguas residuales contaminadas se han tratado en biorreactores, un ejemplo serían las plantas municipales de tratamiento de aguas residuales. La aplicación de biorreactores, como por ejemplo reactores de fermentación en estado estacional y fermentadores gas-líquido en sistemas multifásicos, es una industria creciente y recibe cada vez una mayor atención por parte de los ingenieros. Brauer<sup>10,11</sup> ha descrito varios de estos biorreactores. La investigación muestra ahora que los suelos también se pueden tratar en biorreactores especializados llamados *reactores agitados o de lechada*. En este proceso, el suelo contaminado se mezcla en un reactor con, al menos, un 30 por ciento de medio acuoso. El reactor normalmente está equipado con un sistema de mezcla para asegurar el máximo contacto entre la población microbiana, las moléculas a tratar, y los nutrientes, y

evitar una contrarreacción inhibitoria. El operador del reactor puede controlar el pH, la temperatura, el contacto con el oxígeno y el contenido en humedad. Los reactores agitados o de lechada pueden funcionar aerobia- o anaerobiamente.

El uso de reactores agitados o de lechada para tratar suelos contaminados ofrece la posibilidad de reducir el tiempo de tratamiento de 6-8 meses a 1 o 2 semanas o meses. Los sistemas agitados o de lechada ofrecen ventajas sobre los otros sistemas de biotratamiento, ya que permiten tener un mejor control del proceso y una mayor disponibilidad de contaminantes para los microorganismos. Esta tecnología puede llegar a ser la más ventajosa para la recuperación de suelos contaminados con compuestos muy difíciles de degradar (recalcitrantes) y para aquellos suelos que son difíciles de tratar mediante otras técnicas.

### **Tratamiento *in situ***

Todas las tecnologías de biorrecuperación mencionadas anteriormente requieren la excavación del suelo en la zona contaminada. La excavación del suelo contaminado es una operación muy cara que requiere personal cualificado y, en algunos casos, un equipo especializado. La biorrecuperación *in situ* es una tecnología que no requiere la excavación de grandes cantidades de suelo. Este método implica la inyección de nutrientes y el suministro de oxígeno mediante un medio acuoso directamente en el ambiente contaminado<sup>1,13,33,39</sup>. El medio acuoso fluye a través del suelo contaminado, después se recupera mediante pozos de extracción pendiente abajo del pozo de inyección, y se oxigena antes de recircular por la zona contaminada. Existen otros métodos más agresivos para el tratamiento *in situ*, estos métodos permiten la combinación de arrastre por vapor, tratamiento de aguas subterráneas, y recuperación biológica. Es común utilizar peróxido de hidrógeno para proporcionar oxígeno cuando el suelo presenta una baja permeabilidad al oxígeno<sup>5,22</sup>. También se ha realizado un tratamiento anaerobio *in situ*<sup>42</sup>. En este caso, se añadió acetato como fuente de carbono complementaria con el fin de estimular a los organismos que reducen los nitratos y sulfatos para degradar los compuestos alifáticos halogenados.

El proceso *in situ* normalmente se aplica cuando es difícil excavar el suelo, por ejemplo, cuando la contaminación está en una zona muy profunda, o cuando se trata de grandes cantidades de suelo contaminado, lo que hace inviable la excavación. Los procesos *in situ* requieren un conocimiento amplio de la hidrogeología de la zona. Los procesos *in situ* se pueden descartar cuando la geología irregular impide el transporte de oxígeno y nutrientes a través de la zona contaminada. Es necesario llevar a cabo un control cuidadoso de las aguas subterráneas para proteger los acuíferos. Las tasas de reacción normalmente son muy lentas para los procesos *in situ* debido a las limitaciones de nutrientes, oxígeno y, en ocasiones, por la temperatura. Con frecuencia, es difícil determinar la eficacia de los métodos de tratamiento *in situ* debido a los problemas que se presentan a la hora de obtener muestras de suelo verdaderamente representativas. La presencia de bolsas de suelo no tratadas es difícil de controlar y evitar.

## Degradación de compuestos nitroaromáticos

Los compuestos nitroaromáticos son importantes en la industria química y se emplean para fabricar miles de productos de consumo<sup>20</sup>. Estos productos vienen representados por, al menos, cuatro grupos de productos químicos. El mayor y mejor conocido de estos grupos son los poliuretanos, que se fabrican a partir de 2,4- y 2,6-dinitrotolueno. El segundo grupo de compuestos nitroaromáticos son los compuestos nitroaromáticos energéticos peligrosos, como el TNT. Los compuestos nitroaromáticos se utilizan también en grandes cantidades como pesticidas y herbicidas en la industria agrícola, y como fármacos.

Las tecnologías actuales utilizadas para tratar suelos contaminados con compuestos nitroaromáticos, por ejemplo el herbicida 2-*sec*-butil-4,6-dinitrofenol (dinoseb), implican métodos físicos, como la incineración o el método de transporte y almacenamiento. Estos métodos son costosos y ambientalmente no aceptables. Una incineración ineficaz puede producir emisiones peligrosas y dióxido de carbono. Este último es un gas invernadero, y se cree que su acumulación en la atmósfera es dañina para el medio ambiente. El método de transporte y almacenamiento sólo acumula los residuos peligrosos en un lugar. Según la legislación actual, la responsabilidad a largo plazo de un residuo peligroso corresponde al generador, incluso después de su evacuación.

Se está investigando el desarrollo de métodos biológicos para recuperar suelos contaminados con compuestos nitroaromáticos, pero ninguno ha sido explotado a nivel comercial. Para poder evaluar un plan de biorrecuperación de suelos contaminados, se deben identificar los efectos de los contaminantes sobre los microorganismos, y los efectos de los microorganismos sobre los contaminantes. Aunque muchas zonas de la costa noroeste de Estados Unidos hayan sido contaminadas con pesticidas y herbicidas nitroaromáticos a causa de derrames y procesos de tratamiento de las cosechas, se han realizado relativamente pocas investigaciones sobre la biodegradación de estos compuestos.

Algunos estudios de laboratorio realizados con un enriquecimiento del suelo han demostrado que el dinoseb es biodegradable. Doyle et al.<sup>15</sup> informaron de la formación de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -dinoseb añadido al suelo, tanto si el suelo era enmendado con fangos de aguas residuales, o estiércol de ganado, como si no se enmendaba. Stevens et al.<sup>51</sup> probaron la capacidad de la microbiota natural de diversos suelos de Idaho para degradar el dinoseb. Los resultados indicaron que algunos suelos tenían la capacidad de transformar el dinoseb, pero la presencia de nitrógeno y de altos niveles de dinoseb eran inhibitorios para la degradación del dinoseb en la mayoría de los suelos. No se realizaron estudios con radiotrazadores, por lo tanto, no se pudo inferir la mineralización del dinoseb. Las rutas metabólicas del dinoseb no se determinaron en ninguno de estos estudios.

Los tres tipos diferentes de sustituyentes en la molécula de dinoseb (nitro, hidroxil, y *sec*-butil) presentan lugares para el ataque múltiple de la molécula. El metabolismo de este compuesto en el suelo podría implicar a una red de compuestos intermedios, en vez de una sola ruta, dificultando la determinación de una secuencia biodegradadora completa. Los estudios realizados sobre el metabolismo

del dinoseb y de un herbicida análogo, el 2,4-dinitro-*o*-cresol (DNOC), han revelado que el ataque inicial de las bacterias probablemente se sitúa en los grupos nitro.

Los primeros estudios sobre la degradación del dinoseb y DNOC mostraron que la *Pseudomonas* sp. podría iniciar la conversión del DNOC en 6-amino-2-metil-4-nitrofenol y 3-metil-5-nitrocatecol<sup>53</sup>. Otros investigadores han enriquecido y aislado, a partir de diversos suelos, varias cepas de *Pseudomonas* capaces de metabolizar el DNOC. Estos organismos decoloraron el DNOC y produjeron nitrito. No se registraron otros compuestos intermedios metabólicos. Aunque el 4-nitrofenol y el 2,4-dinitrofenol fueron atacados por estas bacterias, no lo fueron el dinoseb y otros compuestos nitroaromáticos<sup>24</sup>. Wallnoefer et al.<sup>55</sup> comprobaron que la *Azotobacter* sp. convertía el grupo nitro de la posición *orto* del DNOC o dinoseb en un grupo acetamido.

En un estudio reciente, Stevens et al. utilizaron un quimiostato (reactor que trabaja en estado estacionario por control de la alimentación) para enriquecer y aislar los organismos capaces de degradar el dinoseb en suelos contaminados con esta sustancia. Estos organismos podían transformar el dinoseb en productos reducidos bajo condiciones microaerofílicas y desnitrificantes, pero no fueron capaces de mineralizar completamente la molécula. Los productos reducidos se polimerizaron, formando un precipitado multimérico. El procedimiento de enriquecimiento del quimiostato también dio lugar a una asociación anaerobia que podía degradar completamente el dinoseb convirtiéndolo en acetato y CO<sub>2</sub><sup>52</sup>. Aún está por dilucidarse la ruta real de degradación del dinoseb bajo condiciones anaerobias.

Una gran parte de la literatura sobre la degradación de los compuestos nitroaromáticos se ha centrado en los compuestos nitroaromáticos explosivos y ha sido revisada recientemente<sup>26</sup>. La mayoría de los resultados muestran que, en condiciones aerobias y anaerobias, el primer paso en la degradación de los compuestos nitroaromáticos es la reducción de los grupos nitro a hidroxilamino, y después a sustituyentes amino, tanto en los sistemas mamífero como procariótico. En condiciones aerobias, algunas partes del hidroxilamino se pueden polimerizar formando enlaces azo, que son más recalcitrantes y posiblemente más tóxicos que el compuesto original.

En condiciones anaerobias, se forman amino compuestos estables<sup>37</sup>. Hallas<sup>18</sup> examinó la degradación anaerobia de diversos compuestos nitroaromáticos y encontró que la reducción del grupo nitro era el mejor mecanismo de alteración del compuesto. Algunos estudios de toxicidad sobre el TNT, 2,6-dinitrotolueno, y 2,4-dinitrotolueno han indicado que los productos de transformación amino o hidroxilamino son los responsables principales de su toxicidad<sup>21,28,58</sup>.

Las investigaciones en la degradación aerobia de los compuestos mononitrofenólicos han indicado que el sistema de anillos se puede oxidar mediante mono- y dioxigenasas, produciendo nitrito y catecol, quienes posteriormente pueden sufrir una rotura oxidativa del anillo<sup>46,47</sup>. Algunas publicaciones recientes han indicado que los dinitrotoluenos, y posiblemente el TNT, se pueden mineralizar aerobiamente mediante una pseudomona<sup>48</sup> o un hongo «carne de gallina» de la madera, el *Phanerochaete chrysosporium*<sup>17</sup>. Este tipo de trabajos aún está en sus inicios, pero

puede llevar a nuevos métodos de tratamiento prometedores para los residuos contaminados con compuestos nitroaromáticos.

### **Estudios de laboratorio para la biorrecuperación de suelos contaminados con dinoseb**

El esquema de biorrecuperación desarrollado en nuestro laboratorio surgió de las observaciones realizadas por Stevens et al.<sup>52</sup>, según estos autores, los cultivos anaerobios eran capaces de metabolizar dinoseb convirtiéndolo en acetato y CO<sub>2</sub>. La mayor parte de la literatura relativa al tema indicaba que la ruta inicial para la degradación de los compuestos nitroaromáticos era reductiva. Las condiciones anaerobias que favorecerían los procesos reductivos podrían ser altamente favorables para la degradación completa de los compuestos nitroaromáticos. Las condiciones anaerobias permitirían también que las reducciones a amino-compuestos se produjesen a una velocidad rápida y, de esta forma, no diesen lugar a la polimerización de los intermedios hidroxilaminados.

El primer paso en la implantación de un plan de recuperación era convertir el suelo en anaerobio. Es bien conocido que los suelos saturados, al final, llegan a ser anaerobios, cuando el oxígeno disponible es utilizado por los microorganismos heterotróficos<sup>8</sup>. La velocidad de este proceso depende de la cantidad de carbono disponible para los organismos heterótrofos y de su estado metabólico. Una vez que los organismos heterótrofos hayan convertido en anaerobio un suelo, utilizando el oxígeno disuelto como receptor último de electrones para el metabolismo de la fuente de carbono suministrada, se pueden mantener fácilmente unas bajas potencias redox manteniendo las condiciones de saturación. La difusión del O<sub>2</sub> es unas 10<sup>-5</sup> veces más lenta a través del agua que a través del aire. La difusión gaseosa cesa especialmente cuando la fracción de poros llenos de aire en el suelo está por debajo de 0,12<sup>57</sup>; por lo tanto, en los ambientes saturados entra muy poco oxígeno en el suelo, ni siquiera en la fase acuosa.

Para establecer las condiciones anaerobias en el suelo utilizamos varias fuentes de carbono poco costosas. Ensayamos con fuentes de carbono solubles, como la glucosa, y fuentes no solubles, como el almidón, los cosustratos o las fuentes de energía complementarias para las asociaciones de microorganismos degradadores de dinoseb<sup>50</sup>. La aplicación de almidón no soluble apoyó la rápida reducción del oxígeno en suelos no contaminados inundados con un medio acuoso tamponado o fosfatos. Esta fuente de carbono apoyó también el mantenimiento a largo plazo de potencias redox muy por debajo de -200 mV, que es la potencia redox por debajo de la cual pueden crecer incluso los anaerobios más estrictos (metanógenos). Los productos residuales de la industria procesadora de patatas en Idaho sirvieron como fuente barata de almidón no soluble. Este material ha sido descrito en otro estudio<sup>25</sup> y a partir de ahora se denominará *almidón* para mayor simplicidad.

El procedimiento desarrollado consistió en inundar el suelo con un tampón de fosfato y añadir una fuente de carbono a la lechada de suelo/tampón. La aplicación de este procedimiento para la biorrecuperación de los suelos contaminados con

dinoseb se ensayó en varios experimentos de laboratorio utilizando suelos de dos zonas diferentes<sup>25</sup>. Estos suelos diferían en su historial de exposición y en la concentración de dinoseb y de otros contaminantes presentes. Ambos suelos procedían de aeropuertos rurales utilizados en operaciones de pulverizado de cosechas. En el aeropuerto de Ellensburg, Washington, se contaminó un suelo de marga arenosa con dinoseb y otros herbicidas y fertilizantes debido a las operaciones de limpieza realizadas durante décadas sobre el equipo de pulverizado de cosechas. Este suelo era un prototipo excelente de contaminación continuada o crónica a bajo nivel durante un período de tiempo prolongado, y sirve como ejemplo de gran parte de la contaminación que se puede encontrar en el noroeste de Estados Unidos.

También se obtuvo un suelo de arcilla del lodo de un aeropuerto cercano a Hagerman, Idaho. Aquí, la contaminación fue provocada por una serie de escapes en los barriles en los que se almacenaba dinoseb. En este caso, se trataba de un ejemplo de suelo que ha recibido un alto nivel de contaminación durante un período corto de tiempo.

En la Tabla 10.2 se comparan los constituyentes orgánicos de los dos tipos de suelo. Los constituyentes inorgánicos encontrados en los dos suelos indicaron que éstos contenían muchos nutrientes inorgánicos para soportar la actividad metabólica microbiana; en ambos, se debía tener en cuenta la presencia de nitrato, que se ha comprobado que inhibe la degradación del dinoseb<sup>52</sup>, para el diseño del procedimiento de biorrecuperación. La presencia de sulfato en el suelo contaminado también podría afectar a la degradación del dinoseb. Las bacterias reductoras del sulfato podrían utilizar el sulfato como receptor de electrones y competir por el almidón o sus productos de fermentación. Obviamente, ambos suelos habían sido contaminados con fertilizantes y compuestos orgánicos. Esto no es sorprendente, debido al uso de estos aeropuertos para fines agrícolas. La contaminación con fertilizantes de los suelos que a su vez contienen pesticidas o herbicidas, probablemente, se produce en la mayoría de las zonas contaminadas con dinoseb.

Los experimentos de laboratorio han revelado que la recuperación del dinoseb en suelos contaminados es posible en cultivos de matraz estático que contienen un 2 por

**TABLA 10.2.** Parámetros inorgánicos de los suelos de ensayo

Parámetro inorgánico	Suelo contaminado de forma continuada	Suelo contaminado de forma aguda
Nitrato (ppm)	134	294
Amonio (ppm)	144	217
Sulfato (ppm)	No detectado	84
pH	7,58	7,52
P (ppm)	58	45,1
K (ppm)	480	288

*Fuente:* Reproducida con permiso de Kaake et al. (1992), Ref. 25.

ciento de almidón en mezclas, que se agitan sólo ocasionalmente, con un 50 por ciento de suelo/tampón. Estos experimentos se realizaron utilizando hasta 300 g de suelo contaminado. Los experimentos para determinar la biodegradabilidad de los contaminantes en el suelo contaminado de forma continuada revelaron que se trataba de un suelo microbiológicamente competente. La inundación del suelo con un volumen igual a 50 mM de tampón de fosfato a un pH 7 y la adición de un 2 por ciento (en peso-p/p) de almidón, proporcionaron al suelo los nutrientes necesarios para crear un ambiente anaerobio en el que era posible la degradación del dinoseb y de la mayoría de los demás contaminantes presentes. Los análisis mostraron que la eliminación de los nitratos comenzaba casi inmediatamente y se completaba en 4-7 días. La degradación del dinoseb se inició después de un período de espera de 2 a 3 días y, generalmente, se completaba en 10-20 días<sup>25</sup>. El potencial redox descendió por debajo de -200 mV en 4-5 días. La inoculación de las mezclas de ensayo para la recuperación del suelo con cultivos de laboratorio enriquecidos no dio lugar a resultados muy diferentes a los obtenidos con los cultivos no inoculados.

En la Tabla 10.3 se resumen los resultados de los análisis de suelos combinados y tratados. De los cinco contaminantes iniciales, únicamente el 2,4-D parecía difícilmente biodegradable (recalcitrante) por anaerobiosis. La concentración final de dinoseb detectada en el suelo (74 µg/kg) estaba muy por debajo de nuestro objetivo de 2,5 mg/kg.

Los experimentos de laboratorio realizados con el suelo contaminado de forma aguda revelaron que la competencia biológica de este suelo mejoraba con la adición de un cultivo de laboratorio enriquecido al 5 por ciento (v/p), o con la

**TABLA 10.3.** Eliminación de herbicidas en suelos contaminados

Compuesto*	Concentración			Porcentaje de separación
	Suelo inicial (media†)	Efluente acuoso	Suelo final (media†)	
Dinoseb	160.000	1,02	74	99,95
MCPPI <sup>^</sup>	1.210	17§	440§	63,64
Ioxynil	888	0,17§	10§	98,87
2,4-D	153	0,35§	94	38,70
Dicamba	106	2,60	24	77,04

\* Los análisis de los herbicidas y pesticidas fueron realizados por Manchester Laboratories, Manchester, Washington. Se utilizaron los métodos de EPA 8.150 y 8.080. Los compuestos listados arriba fueron los únicos encontrados.

† Las unidades son µg/kg; los resultados son la media de los análisis de tres muestras.

<sup>^</sup> MCPPI = Ácido 2-(2-metil-4-clorofenoxi) propionico.

§ Los compuestos no se detectaron; los valores representan la mitad del límite de detección para el compuesto.

Fuente: Reproducido con permiso de Kaake et al. (1992), Ref. 25.

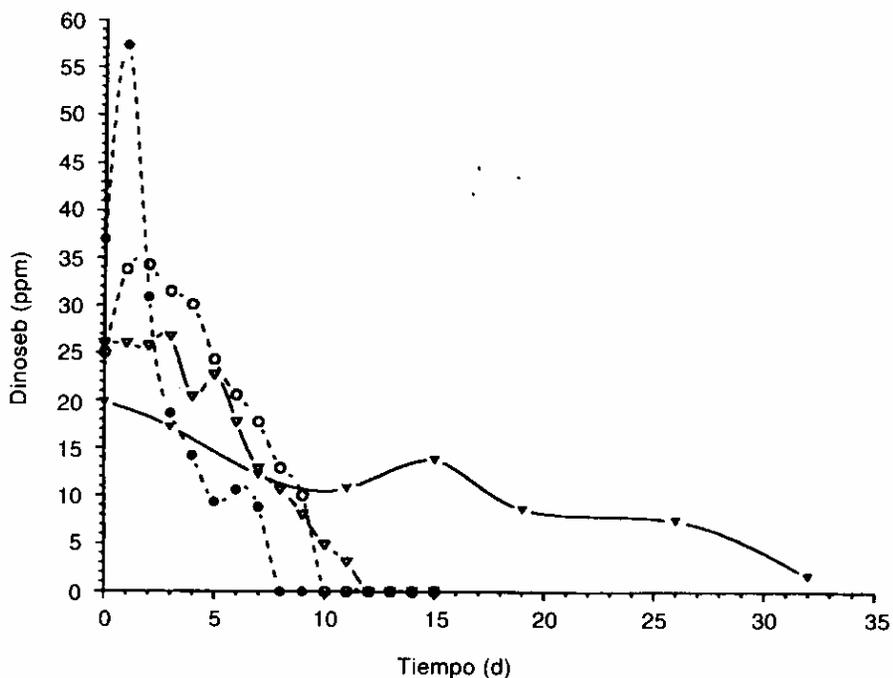
adición del 10 por ciento o del 50 por ciento (p/p) de suelo seco previamente tratado<sup>25</sup>. El suelo seco tratado era suelo que procedía de una zona contaminada de forma continuada en Ellensburg, Washington, este suelo se había tratado de la forma descrita anteriormente y, después, se había secado y almacenado a 4 °C para su posterior utilización como inóculo. El inóculo más eficaz parecía ser la adición de un 10 por ciento de suelo tratado<sup>25</sup>.

### **Estudios piloto para la biorrecuperación de suelos contaminados con dinoseb**

Los experimentos de laboratorio no siempre implican que la tecnología se pueda usar con éxito a escalas mayores. Por lo tanto, pensábamos que era importante demostrar la recuperación del dinoseb en suelos contaminados empleando experimentos mayores. Se llevó a cabo *in situ*, en un reactor agitado o en reactores estáticos (cubos de plástico), una demostración inicial de la tecnología utilizando 45-50 kg de suelo contaminado de forma continuada.

Los suelos se excavaron con palas y se tamizaron mediante un tamiz de 6,35 mm en la zona. El personal llevaba filtros anti-polvo y ropa protectora. Después, se pesaron los suelos antes de introducirlos a los reactores, que contenían la cantidad adecuada de tampón fosfatos. Posteriormente se añadió almidón, y se procedió a la mezcla completa en los reactores. Los cubos y el reactor se incubaron en un pequeño remolque renovado para este fin. Los reactores estáticos (por triplicado) recibieron 45 kg de suelo contaminado de forma continuada; 45 l a un pH 7, 50 mM de tampón fosfato; y 0,9 kg de almidón. Los cultivos de control contenían suelo contaminado, almidón y tampón; o suelo contaminado y tampón, sin almidón. La demostración se realizó dos veces a esta escala. La temperatura, el pH y el potencial redox se controló cada 5 minutos (primera demostración) o cada dos horas (segunda demostración) mediante el uso de sondas remotas y de una unidad A/D analógico-digital de grabación de datos controlada mediante un ordenador personal. Se tomaron muestras acuosas y de suelo periódicamente, muestras que se analizaron para establecer las concentraciones de dinoseb, ácidos orgánicos volátiles, nitratos, amoníaco, almidón hidrolizado y de azúcares reductores solubles totales.

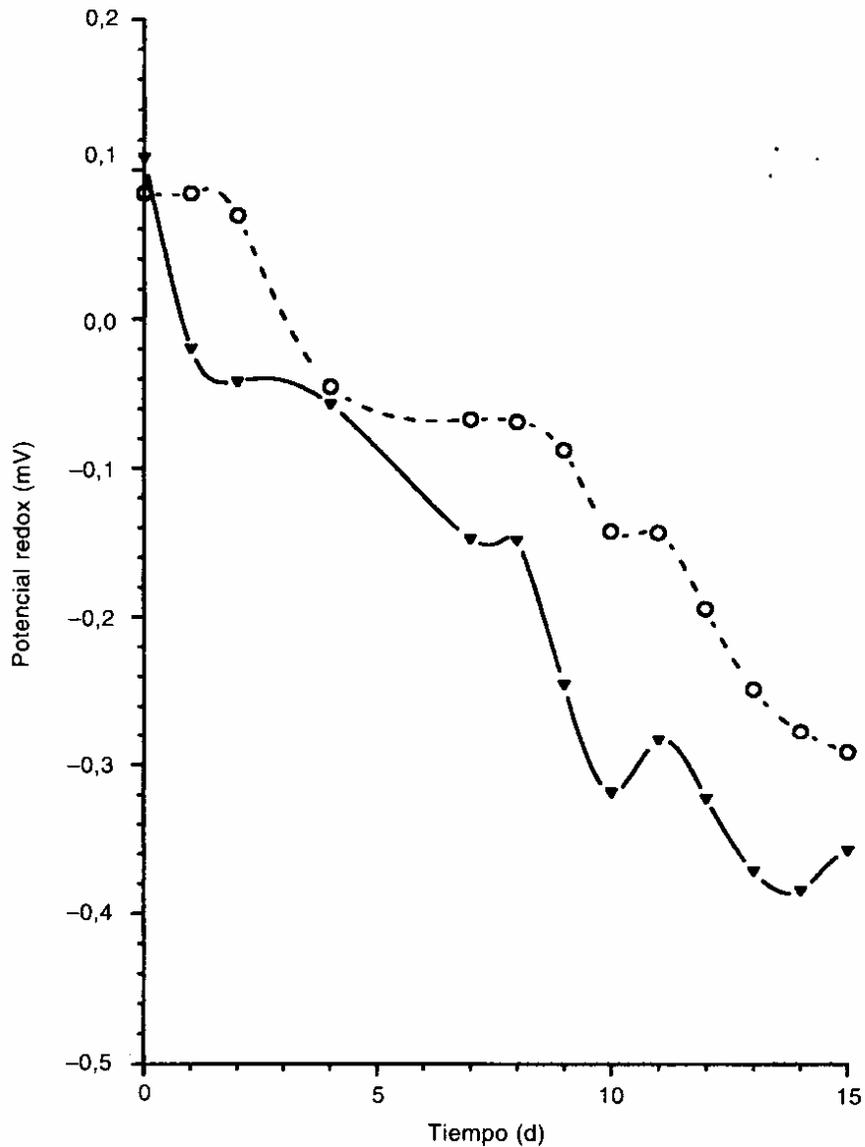
En las Figuras 10.1-10.3 se presentan los resultados de la segunda demostración. La concentración de dinoseb en la fase acuosa se midió directamente mediante una cromatografía líquida de alta presión (HPLC); la concentración de dinoseb en el suelo se midió mediante el análisis HPLC de los extractos de suelo con acetonitrilo. Ambos métodos se describen en otros estudios<sup>25</sup>. Los resultados presentados en la Figura 10.1 demuestran que las tasas de degradación del dinoseb son rápidas con este protocolo de tratamiento, y que el uso del reactor mezclado permite la eliminación del dinoseb en el suelo más rápidamente que mediante el uso de los reactores estáticos. El potencial redox en los reactores estáticos descendió más rápidamente que en el reactor agitado (Fig. 10.2). No se observó ningún producto de polimerización ni en los reactores estáticos ni en los agitados. Esto



**FIGURA 10.1.** Separación del dinoseb en el suelo y en las fases acuosas mediante tratamientos con 50 kg de suelo contaminado de forma continuada. Los reactores recibieron 45-50 kg de suelo contaminado, 1 kg de almidón y 45-50 l de 50 mM de tampón fosfatos a pH 7. o = reactor agitado, acuoso. • = reactor agitado, suelo. ▽ = reactor estático, acuoso. ▼ = reactor estático, suelo.

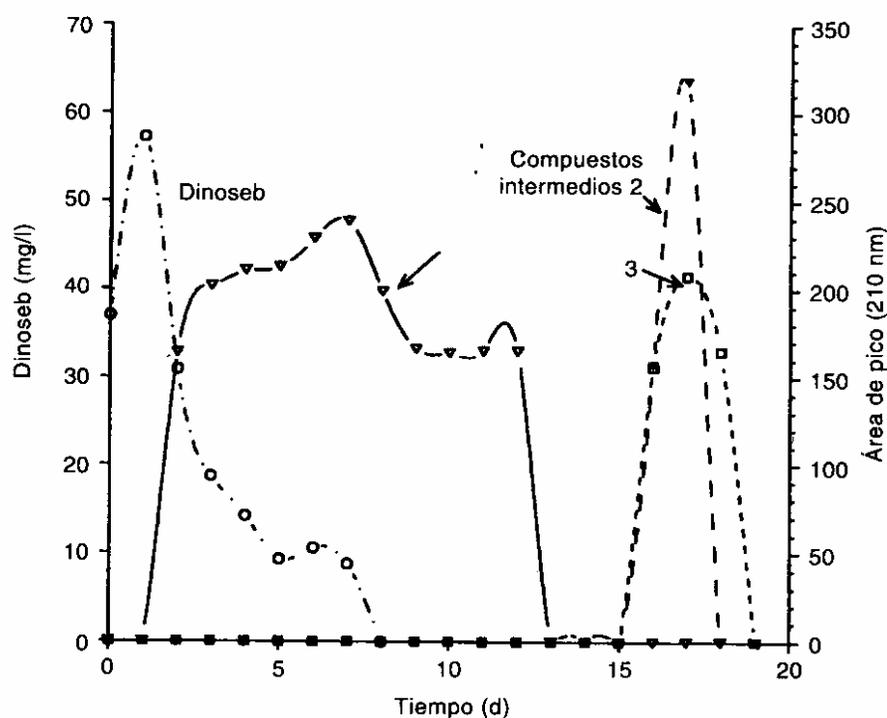
hace pensar que el descenso inicial en el potencial redox fue suficiente como para evitar que se produjesen reacciones de polimerización.

La Figura 10.3 presenta la acumulación y separación del dinoseb y los tres intermedios de biotransformación más abundantes en el suelo del reactor agitado. No se identificaron los intermedios, por lo tanto, no se pudo determinar sus concentraciones. Estos resultados demuestran la necesidad de analizar los compuestos intermedios. Si la concentración de dinoseb se hubiese utilizado como parámetro único para establecer el final del tratamiento, éste podría haber parado prematuramente, después de sólo 9-10 días. Aunque se conoce poco sobre los intermedios, sospechamos que el compuesto intermedio identificado como 1 en la Figura 10.3 aún puede contener algunas propiedades tóxicas. La separación final de este compuesto intermedio del suelo parecía provocar una reducción en la toxicidad del suelo. Cuando se separó este compuesto intermedio, los organismos reductores del sulfato presentes en el suelo empezaron a metabolizar los productos de fermentación procedentes de la degradación del almidón, produciendo un precipitado ne-



**FIGURA 10.2.** Potencial redox en tratamientos con 50 kg del suelo contaminado de forma continuada. Los reactores son los de la Figura 10.1. ○ = reactor agitado. ▽ = reactor estático.

gro de sulfuro de hierro visible en el suelo, y empezaron a crecer hongos sobre la superficie de los reactores. Actualmente, estamos desarrollando métodos para probar la toxicidad del suelo durante el proceso de tratamiento con el fin de determinar en qué momento se elimina la toxicidad. Este trabajo ayudará a comprobar la seguridad ambiental de la tecnología y a proporcionar una valiosa información



**FIGURA 10.3.** Separación de dinoseb y acumulación y separación de compuestos intermedios en las extracciones de suelo del reactor agitado. Los compuestos intermedios no identificados se cuantificaron utilizando el tiempo de retención de los picos. El DNOC se utilizó como estándar interno para asegurar la eficacia de la extracción y el rendimiento del detector.

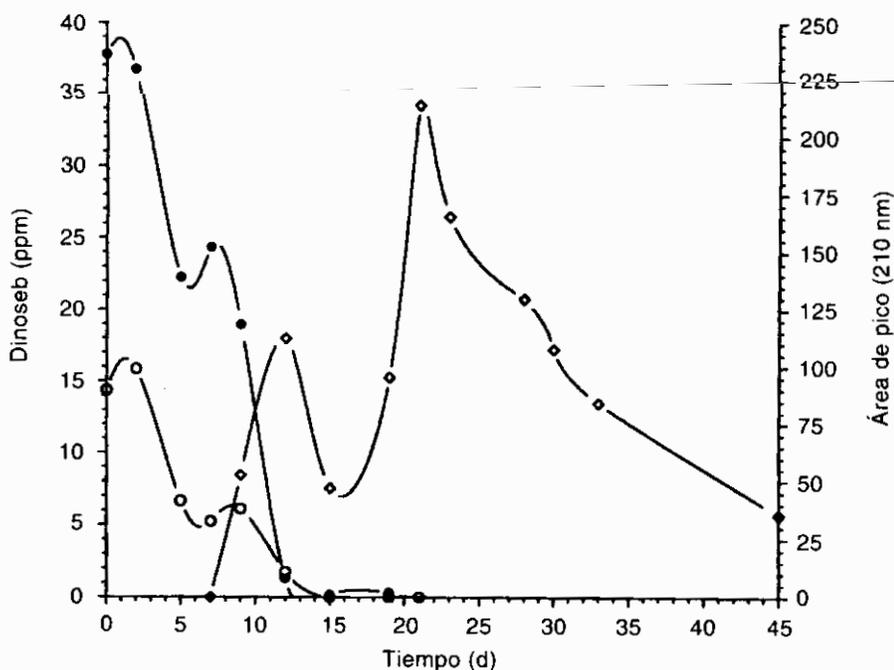
sobre la toxicidad de los compuestos intermedios de transformación. Además, se identificarán estos compuestos.

Se realizó una demostración a mayor escala de esta tecnología utilizando el suelo contaminado de forma aguda procedente del aeropuerto cercano a Hagerman, Idaho. La demostración se llevó a cabo en el propio lugar en una fosa forrada. Todo el personal contó con trajes Tyvek, respiradores de cara total, guantes y calzado protector durante todo el trabajo realizado en la fosa. La demostración abarcaba tres etapas. Las Etapas 1 y 2 se realizaron en reactores de fibra de vidrio de 2.600 l.

La Etapa 1 contaba con tres de estos reactores, que fueron cargados con aproximadamente 350 l de agua de riego, 2.268 g de  $K_2HPO_4$ , y 686 g de  $KH_2PO_4$ . Los ingredientes se mezclaron hasta la disolución de las sales. Entonces se añadió a cada reactor con una retroexcavadora aproximadamente 315 kg de suelo contaminado; después se añadió 6,3 kg de almidón, así como 35 kg de suelo tratado y seco procedente del tratamiento del suelo contaminado de forma continuada. El pH de

los contenidos de cada reactor se ajustó a 7 con una disolución saturada de hidróxido de sodio o ácido fosfórico concentrado, y en cada reactor se instalaron los electrodos de pH, temperatura y potencial redox. Los datos se recogieron y registraron en una unidad A/D analógico-digital de grabación de datos conectada a una batería de 12 V. Los reactores se cubrieron con «visqueen 6-mil», material que se aseguró por debajo del borde de cada reactor mediante una goma elástica.

El contenido de los reactores se muestreaba a tiempo 0 y después cada dos o tres días. Se procedió a la mezcla en los reactores después de 15 días de incubación. No se produjo ninguna pérdida obvia por evaporación en las fases acuosas durante las incubaciones. La Etapa 1 se llevó a cabo durante el mes de agosto. La temperatura en los reactores oscilaba diariamente entre 25 °C y 32 °C; la temperatura media fue de 28 °C. El pH de la fase acuosa quedó dentro de un rango de 0,2 unidades en torno a un pH 7. El potencial redox en la fase acuosa de los reactores bajó rápidamente, y se situó por debajo de 0 mV en el segundo día. El dinoseb se eliminó de las fases acuosa y de suelo en 15 días (Fig. 10.4). Los tratamientos se incubaron un total de 45 días para permitir que bajase la concentración del compuesto intermedio I (intermedio I en la Fig. 10.3) (Fig. 10.4).



**FIGURA 10.4.** Separación de dinoseb y acumulación y separación de los compuestos intermedios en los tratamientos de 315 kg de suelo contaminado de forma aguda. Los reactores recibieron 350 l de 50 mM de tampón fosfatos a un pH 7, 6,3 kg de almidón, y 35 kg de suelo tratado como inóculo. O = dinoseb acuoso, • = dinoseb de suelo. ◊ = intermedio sin identificar.

La Etapa 2 contaba con cinco reactores montados de la misma forma que en la Etapa 1, a excepción de que los contenidos de suelo de la Etapa 1 se repartieron igualmente entre los cinco reactores como inóculo. Los contenidos de los reactores se dejaron incubar durante 13 días. Esta etapa se diseñó con el fin de generar un inóculo para la tercera etapa, por lo tanto, se sacaron muestras solamente al principio y después de los 13 días. El dinoseb se había eliminado del suelo y de la fase acuosa al final de la incubación, pero aún estaba presente el intermedio 1.

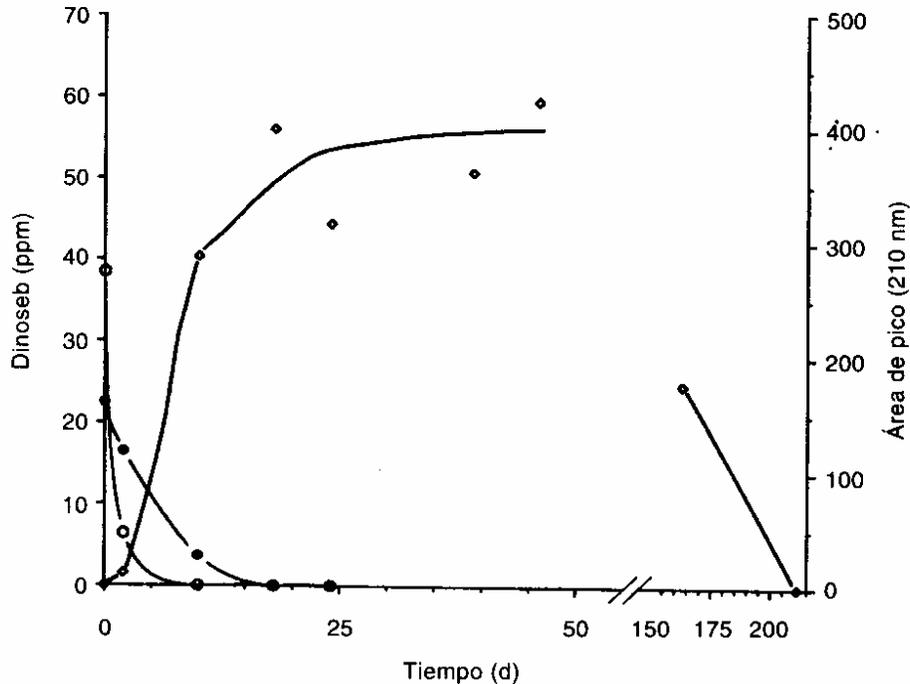
Los contenidos de los cinco reactores de la Etapa 2 se utilizaron como inóculo para los reactores estáticos de la Etapa 3. Cada uno de los reactores tenía una capacidad de 6.000 l, y se cargaron con aproximadamente 2.000 l de agua de riego, 12,4 kg de  $K_2HPO_4$ , 3,7 kg de  $KH_2PO_4$ , 32 kg de sustrato de almidón, y aproximadamente 2.000 kg de suelo contaminado. La temperatura, el potencial redox y el pH se controlaron tal y como se describió para la Etapa 1. Se sacaron muestras del suelo y de la fase acuosa a tiempo 0 y, después, una vez por semana. La incubación se llevó a cabo entre los meses de octubre y mayo.

Inicialmente, la temperatura media de la fase acuosa estaba en torno a los 25 °C, pero cuando el clima reflejó el cambio de estación, las temperaturas en los reactores sufrieron grandes fluctuaciones. El pH se mantuvo en un rango de 0,2 unidades en torno a un pH 7, y el redox descendió por debajo de 0 mV en un período de dos a tres días. La actividad biológica se desaceleró durante los meses de invierno, pero se reactivó cuando el tiempo mejoró. Para mediados de mayo, el suelo de la fase acuosa ya no contenía ningún dinoseb detectable ni intermedios de biotransformación. La fase acuosa se separó y aplicó a una zona de terreno no contaminado en forma de aguas residuales. El suelo se introdujo en la fosa en la zona contaminada.

En la Figura 10.5 se resumen los resultados de los análisis HPLC de las muestras tomadas en los reactores de la Etapa 3. Esta figura demuestra una vez más la importancia de controlar los compuestos intermedios en la degradación de un compuesto, en vez de solamente el propio compuesto. El tiempo global de incubación para la separación del dinoseb de la mezcla suelo/tampón a esta escala no fue significativamente diferente de los tiempos de incubación observados en los experimentos a escala menor, lo que sugiere que los tratamientos a escala aún mayor se pueden realizar dentro de unos marcos temporales similares. Esto es prometedor, puesto que se trataba de reactores estáticos. Los reactores agitados presumiblemente necesitarían incluso menos tiempo para llevar a cabo el proceso de biorrecuperación, tal y como se indicó en nuestros experimentos con suelos contaminados de forma continuada cerca de Ellensburg, Washington.

## Comercialización

La tecnología descrita anteriormente está en proceso de revisión de patentes y se comercializará en el futuro. Los métodos comerciales aplicados serán específicos para cada zona, aunque nosotros proponemos tres procedimientos para la aplicación de esta tecnología.



**FIGURA 10.5.** Separación de dinoseb y acumulación y separación de los compuestos intermedios en los tratamientos de 2.000 kg de suelo contaminado de forma aguda. Los reactores recibieron 2.000 kg de suelo contaminado, 2.000 l de tampón de fosfatos pH 7, 40 kg de almidón, y 1 l de slurry de suelo tratado en los reactores de 315 kg. O = dinoseb acuoso, • = dinoseb de suelo.  $\diamond$  = intermedio sin identificar.

El proceso se prestará bien al uso de grandes reactores anaerobios que se puedan colocar sobre el lecho de un camión y ser transportados de lugar en lugar para llevar a cabo la recuperación del suelo en zonas, como por ejemplo, aeropuertos rurales. Estas zonas normalmente contienen pequeñas cantidades de suelo (50-500 m<sup>3</sup>) con bajos niveles de distintos contaminantes. El diseño del reactor puede ser relativamente sencillo, ya que sólo se debe controlar el pH y la temperatura. La separación y control de la concentración de oxígeno y del potencial redox son inherentes al sistema, siempre que se suministren las cantidades suficientes de carbono complementario. Mezclando el suelo se asegura una desorción más rápida de los compuestos del suelo y unos períodos cortos de tratamiento. Los contaminantes biodegradables que no se separen con el proceso anaerobio se pueden separar operando el reactor de forma aerobia después de la etapa anaerobia.

Una segunda aplicación de la tecnología sería una variación innovadora del tratamiento en lechos que nosotros hemos denominado *tratamiento en lechos anaerobio*. Este método usaría una fosa forrada similar a la utilizada en el tratamiento en lechos, pero no sería necesario un drenaje de la fosa. El forro no solamente serviría para aislar el sistema de tratamiento de las zonas no contaminadas, sino que además mantendría la fase acuosa en la zona de tratamiento, permitiendo la saturación del suelo. Para asegurar una humidificación completa del suelo sería necesario mezclar el suelo contaminado con la fuente de carbono, el inóculo de suelo, y el tampón, pasando todo a través de una tolva antes de su introducción en la fosa. Sería beneficioso realizar una suave mezcla periódica de los contenidos de la fosa anaerobia, esto aseguraría unas rápidas tasas de disolución y degradación, evitando la formación de bolsas de suelo no tratado. Esta clase de aplicación sería más apta para grandes zonas que contienen la cantidad de suelo suficiente como para hacer más rentable el gasto de excavación y de forrado de la fosa, en vez del gasto que supondría, en tiempo y dinero, el introducir varios lotes de suelo en un reactor agitado o de lechada.

El proceso también podría funcionar como un procedimiento *in situ* utilizando métodos convencionales de entrega de la fuente de carbono complementaria y otros nutrientes, pero omitiendo el proceso de oxigenación. Si el sistema de transporte de nutrientes funcionase como un círculo cerrado, se evitaría la oxigenación involuntaria. Antes de realizar este tipo de recuperación, se deben investigar los efectos que provocaría el dejar grandes extensiones de suelo anaerobio y rico en carbono.

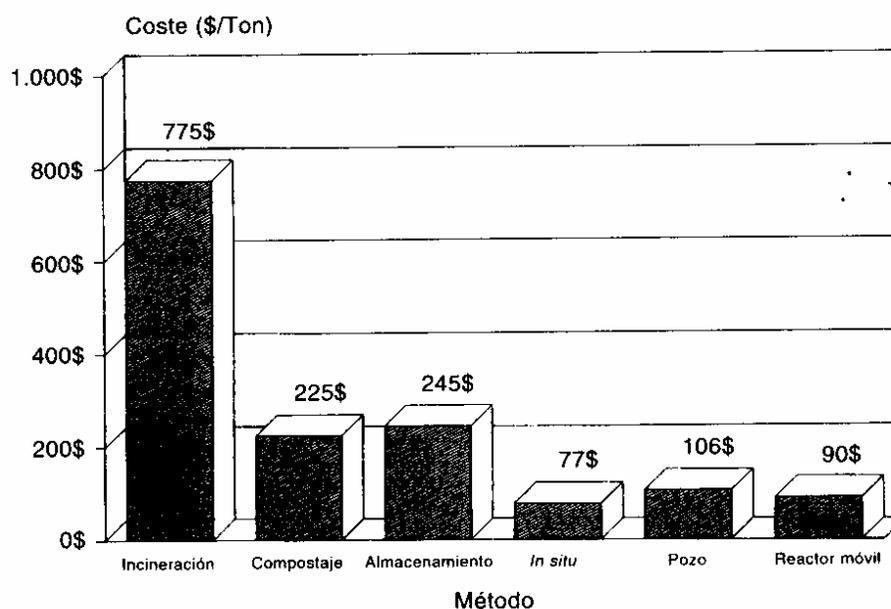
## Comparaciones de costes

Este tipo de consideraciones juegan un papel importante en la selección de un proceso de recuperación del suelo. Hemos estimado los costes de diversas tecnologías en base a la información procedente de especialistas en recuperación y a la literatura sobre el tema. La Figura 10.6 presenta una comparación entre los costes totales estimados para diferentes métodos de tratamiento. A continuación se explican los componentes de cada tratamiento.

## Incineración

La incineración se usa frecuentemente cuando es necesaria una limpieza inmediata de los residuos peligrosos. Los costes asociados a la incineración son muy altos, especialmente si las distancias de transporte son grandes.

Una instalación en Tejas cobra 600 \$/tonelada para la incineración de suelos que contengan dinoseb. Además, hay que añadir los costes de excavación y del transporte del suelo a, y desde, la incineradora. El coste medio de excavación y transporte del suelo es de 100-150 \$/tonelada. El coste ajustado total de la incineración sería, por lo tanto, de 700-850 \$/tonelada.



**FIGURA 10.6.** Comparación entre los costes de diversas técnicas de recuperación.

## Almacenamiento

Los suelos contaminados con dinoseb también se han transportado hasta vertederos que los almacenan de forma permanente. Estas instalaciones tan sólo almacenan suelos contaminados; es decir, los residuos no se eliminan. A partir del 8 de mayo de 1992, las nuevas directrices federales no permitirán el vertido de suelos contaminados con dinoseb en concentraciones por encima de 2,5 ppm.

EnviroSAFE, instalación para el almacenamiento de residuos peligrosos del sur de Idaho, aprobada bajo el Acta de Recuperación y Conservación de Recursos (RCRA), cobra 120 \$/tonelada a cambio de almacenar suelo contaminado. Esto, de nuevo, excluye el coste de excavación y transporte del suelo, que supondría un coste total de 220-270 \$/tonelada para los propietarios de zonas contaminadas en nuestra región.

## Tratamiento en lechos anaerobios

Hemos obtenido de la División de Servicios Ambientales de la empresa Morrison Knudsen Company de Boise, Idaho, el diseño de una fosa para tratar grandes cantidades de suelo contaminado. La mayor parte del gasto para la fosa anaerobia viene de la construcción del forro de la fosa. Un forro que cumpla o supere las especificaciones gubernamentales tendría un espesor de aproximadamente 1,8 m.

y estaría formado por varios materiales. Primero, se colocaría una capa de arcilla de 60 cm, y después una capa de polietileno de alta densidad (PE-HD). Esta capa representa la parte de contención secundaria del forro. La sección primaria estaría formada por 30 cm de material granular, una lámina geotextil, otros 60 cm de arcilla, una capa de PE-HD, y, finalmente, 30 cm de material granular para proteger el polietileno. Además, se utilizaría una lámina de plástico o de espuma flotante para evitar la evaporación.

Una fosa de estas características puede acomodar entre 600 y 10.000 toneladas de suelo. Cuando se completa el proceso de degradación, el suelo se pondría de nuevo en su localización original, y se separaría y evacuaría la parte sintética del forro. Se podría utilizar una sola fosa para recuperar con éxito varios lotes de suelo.

A una escala que acomodase 5.000 toneladas de suelo, el coste medio sería de 40 \$/tonelada para una fosa de 335 m<sup>2</sup>. El coste aproximado de evacuación del suelo y de control de la fosa estaría en torno a los 55 \$-78 \$/tonelada. Esto lleva a un coste total de recuperación de 95 \$ a 118 \$/tonelada (los costes se han calculado a partir de los datos suministrados por Morrison Knudsen).

### **Compostaje**

Aunque el compostaje es un proceso aerobio, presentamos sus costes para compararlos con los de otras tecnologías. El rango de costes para el compostaje puede variar mucho según los materiales que se vayan a tratar y el tamaño de la operación.

En 1978, el Ejército de Estados Unidos propuso una operación de compostaje que trataría tres toneladas/día de suelo contaminado con TNT a un coste medio de 287 \$/tonelada<sup>38</sup>. El coste inicial de construcción se estimó en 376.750 dólares, esto permitiría la construcción de una instalación permanente a gran escala que se utilizaría para tratar el suelo contaminado que se produjese de forma continua.

Las instalaciones modernas de compostaje actualmente son más eficaces y menos caras debido a la incorporación de biorreactores. Por ejemplo, los fangos de aguas residuales se pueden compostar en un biorreactor por 150 \$/tonelada para cubrir el coste del equipo de muestreo y control, los mayores niveles de seguridad, y el transporte del suelo contaminado. Por lo tanto, el compostaje de suelos contaminados costaría entre 200-250 \$/tonelada.

### **Instalación de tratamiento móvil**

Como se ha descrito anteriormente, hemos propuesto la construcción de un reactor agitado o de lechada móvil para tratar los suelos contaminados allí donde estén. Aunque no se haya construido ningún prototipo, el coste de un camión y remolque, con un biorreactor montado sobre el remolque, se ha calculado en unos 228.000 dólares. Este biorreactor semeja el diseño de una hormigonera de 12 m<sup>3</sup>, y se puede sellar y equipar con componentes para el muestreo y volteo de la mezcla suelo-tampón. El coste medio de operación para esta unidad sería de 90 \$/tonelada, incluyendo la carga y operación del biorreactor.

### Tratamiento *in situ*

Para evitar el coste de excavación del suelo y cumplir algunas de las normas más complejas que tratan sobre la evacuación de suelos contaminados con residuos peligrosos, se ha investigado la recuperación *in situ*. Habría que perforar varios pozos de control en toda la zona contaminada, y utilizar un pozo de extracción para hacer circular una solución acuosa en el suelo, mantener el suelo saturado y evitar la contaminación de las aguas subterráneas. Periódicamente, se perforarían más pozos de control dentro y alrededor de la zona para obtener muestras aleatorias de suelo.

El rango de costes para este método de tratamiento varía mucho según el número y la profundidad de los pozos, la hidrogeología de la zona, y la extensión de la contaminación. Hemos hallado unos costes estimados para el tratamiento, siguiendo este método, de dos zonas contaminadas con hidrocarburos. El primer informe presentaba un coste de 130 \$/m<sup>3</sup>(<sup>12</sup>) para tratar una zona con 4.600 m<sup>3</sup> de suelo contaminado con gasolina. El segundo informe trataba una zona de 4.600 m<sup>3</sup> de suelo contaminados con disolventes de hidrocarburos. El coste estimado para este tratamiento era de 59 \$/m<sup>3</sup>(<sup>41</sup>). Estos costes suponen aproximadamente 118 \$ y 54 \$/tonelada, respectivamente.

### Resumen

Hemos tratado la biorrecuperación de un suelo contaminado con el herbicida recalcitrante nitroaromático dinoseb. La tecnología aplicada es sencilla y no es cara, si se compara con los métodos físicos actuales empleados para la recuperación de suelos. La comercialización de este proceso podría usar el diseño de un reactor agitado o de lechada, o de una fosa anaerobia de tratamiento en lechos, según las características de la zona.

La tecnología consiste en estimular los organismos naturales presentes en el suelo inundando éste con un tampón de pH y añadiendo una fuente rica en carbono para proporcionar energía a los organismos heterotróficos. La actividad metabólica de los organismos heterotróficos elimina el oxígeno y el nitrato (ambos pueden inhibir la degradación del dinoseb) de suelo, reduciendo el potencial redox y permitiendo la degradación del dinoseb.

Hemos encontrado al menos un suelo contaminado con niveles bajos de dinoseb durante largos períodos de tiempo (forma continua) que contenía los organismos apropiados para facilitar el tratamiento, necesitando sólo una bioestimulación con nutrientes y carbono. El largo período de exposición y los bajos niveles de contaminación proporcionaron, aparentemente, las condiciones necesarias para permitir la proliferación de una población autóctona de organismos heterotróficos resistentes al dinoseb, y de organismos fermentadores anaerobios capaces de metabolizar el dinoseb. Los restantes contaminantes del suelo no fueron inhibitorios para el proceso de degradación del dinoseb y, en gran medida, se eliminaron del suelo durante el tratamiento anaerobio.

En otro suelo, contaminado de forma aguda con grandes niveles de dinoseb, no existían organismos apropiados, o fueron inhibidos por los altos niveles de dinoseb. Añadiendo suelo anteriormente tratado procedente de la zona contaminada se proporcionaron los organismos necesarios para que se produjese la biorrecuperación.

La recuperación de otros contaminantes que no eran dinoseb en suelos multi-contaminados sugiere que el tratamiento anaerobio es muy versátil. Las investigaciones en la recuperación de suelos contaminados con otros compuestos aerobiacamente recalcitrantes puede revelar otras aplicaciones para esta tecnología.

## Reconocimientos

Nos gustaría agradecer los excelentes consejos y el apoyo técnico de Keith Stormo y Karen Crossley. El doctor Doug Sell de la empresa J. R. Simplot Company, Boise, Idaho, ha sido fundamental para organizar la demostración en Hagerman y suministrar almidón. El señor Marvin Thorne de la empresa Morrison Knudsen Company, de Boise, Idaho, ha aportado información acerca del diseño de la fosa para el tratamiento en lechos.

Esta investigación recibió el apoyo de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos bajo el Programa de Tecnologías Emergentes (U.S. EPA Award CR81 681 8010), y de la empresa J. R. Simplot Company, Boise, Idaho. Damos las gracias a Wendy Davis-Hoover de EPA (USA), Cincinnati, Ohio, por sus sugerencias y apoyo, y a Mike Cochran del Departamento de Ecología del Estado de Washington, por organizar los servicios de calidad en química analítica para la demostración de Ellensburg, Washington.

## Referencias bibliográficas

1. Aggarwal, P. K., J. L. Means, and R. E. Hinchee. 1991. Formulation of nutrient solutions for in situ biodegradation, pp. 51-66. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
2. Alfoldi, L. 1991. Hydrogeologic considerations for in situ bioremediation, pp. 33-50. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
3. Atlas, R. M. 1991. Bioremediation of fossil fuel contaminated soils, pp. 14-32. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
4. Balba, M. T., A. C. Ying, and T. G. McNeice. 1991. Bioremediation of contaminated land: Bench scale to field applications, pp. 464-476. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.

5. Barensee, E. R., P. Bochem, O. Helmling, and P. Weppen. 1991. Effectiveness and kinetics of hydrogen peroxide and nitrate-enhanced biodegradation of hydrocarbons, pp. 103-124. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
6. Beli, R. A., and A. H. Hoffman. 1991. Gasoline spill in fractured bedrock addressed with *in situ* bioremediation, pp. 437-443. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
7. Black, W. V., R. C. Ahlert, D. S. Kosson, and J. E. Brugger. 1991. Slurry-based biotreatment of contaminants sorbed onto soil constituents, pp. 408-422. In R. E. Hinchee, and R. F. Olfenbittel (eds.), *On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
8. Bouwer, E. J., and G. D. Cobb. 1987. Modeling of biological processes in the subsurface. *Water Sci. Technol.* 19:769-779.
9. Bradford, M. L., and R. Krishnamoorthy. 1991. Consider bioremediation for waste site cleanup. *Chem. Eng. Prog.* 87:80-85.
10. Brauer, H. 1987. Development and efficiency of a new generation of bioreactors. Part 1. *Bioproc. Eng.* 2:149-159.
11. Brauer, H. 1988. Development and efficiency of a new generation of bioreactors. Part 2, Description of new bioreactors. *Bioproc. Eng.* 3:11-21.
12. Brown, K. A., J. C. Dey, and W. E. McFarland. 1991. Integrated site remediation combining groundwater treatment, soil vapor extraction, and bioremediation, pp. 444-449. In R. E. Hinchee, and R. F. Olfenbittel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
13. Davis-Hoover, W. J., L. C. Murdoch, S. J. Vesper, H. R. Pahren, O. L. Sprockel, C. L. Chang, A. Hussain, and W. A. Ritschel. 1991. Hydraulic fracturing to improve nutrient and oxygen delivery for *in situ* bioreclamation, pp. 68-82. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
14. Doyle, J. D., K. A. Short, G. Stotzky, R. J. King, R. J. Seidler, and R. H. Olsen. 1991. Ecologically significant effects of *Pseudomonas putida* PPO301 (pROI03), genetically engineered to degrade 2,4-dichlorophenoxyacetate, on microbial populations and processes in soil. *Can J. Microbiol.* 37:682-691.
15. Doyle, R. C., D. D. Kaufman, and G. W. Burt. 1978. Effect of dairy manure and sewage sludge on <sup>14</sup>C-pesticide degradation in soil. *J. Agric. Food Chem.* 26:987-989.
16. Durand, A., and D. Chereau. 1988. A new pilot reactor for solid-state fermentation: Application to the protein enrichment of sugar beet pulp. *Biotechnol. Bioeng.* 31:476-486.
17. Fernando, T., J. A. Bumpus, and S. D. Aust. 1990. Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1666-1671.
18. Hallas, L. E., and M. Alexander. 1983. Microbial transformation of nitroaromatic compounds in sewage effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1234-1241.
19. Harmsen, J. 1991. Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated soils, pp. 255-272. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.

20. Hartter, D. R. 1985. The use and importance of nitroaromatic compounds in the chemical industry, pp. 1-14. In D. E. Rickert (ed.), Chemical Institute of Toxicology Series: Toxicity of Nitroaromatic Compounds, Hemisphere Publishing, Washington, D.C.
21. Hathaway, J. A. 1985. Subclinical effects of trinitrotoluene: A review of epidemiology studies, pp. 255-274. In D. E. Rickert (ed.), Chemical Institute of Toxicology Series: Toxicity of Nitroaromatic Compounds, Hemisphere Publishing, Washington, D.C.
22. Huling, S. G., B. E. Bledsoe, and M. V. White. 1991. The feasibility of using hydrogen peroxide as a source of oxygen in bioremediation, pp. 83-102. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbuttel (eds.), *In Situ* Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
23. Isbister, J. D., G. L. Anspach, J. F. Kitchens, and R. C. Doyle. 1984. Composting for decontamination of soils containing explosives. *Microbiologica* 7:47-73.
24. Jensen, H. L., and Lautrup-Larsen. 1967. Microorganisms that decompose nitroaromatic compounds with special reference to dinitro-ortho-cresol. *Acta Agric. Scand.* 17:115-126.
25. Kaake, R. H., D. J. Roberts, T. O. Stevens, R. L. Crawford, and D. L. Crawford. 1992. Bioremediation of soils contaminated with 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol (dinoseb). *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1683-1689.
26. Kaplan, D. L. 1990. Biotransformation pathways of hazardous energetic organonitro compounds, pp. 155-182. In D. Kamely, A. Chakrabarty, and G. S. Omenn (eds.), *Advances in Applied Biotechnology*, 4: Biotechnology and Biodegradation, Portfolio Publishing, The Woodlands, Tex.
27. Kaplan, D. L., and A. M. Kaplan. 1982. Thermophilic biotransformations of 2,4,6-trinitrotoluene under simulated composting conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:757-760.
28. Klausmeier, R. E., J. L. Osmon, and D. R. Walls. 1973. The effect of trinitrotoluene on microorganisms. *Dev. Ind. Microbiol.* 15:309-317.
29. Kleijntjens, R. H., K. C. A. M. Luyben, M. A. Bosse, and L. P. Velthuisen. 1987. Process development for biological soil decontamination in a slurry reactor, pp. 252-255. In O. M. Neijssel, R. R. van der Meer, and K. C. A. M. Luyben (eds.), *Proc. 4th European Congress on Biotechnology*, 1987, vol. 1, Elsevier Science, Amsterdam.
30. Kukor, J. J., and R. H. Olsen. 1989. Diversity of toluene degradation following long term exposure to BTEX *in situ*, pp. 405-421. In D. Kamely, A. Chakrabarty, and G. S. Omenn (eds.), *Advances in Biotechnology Series*, 4: Biotechnology and Biodegradation, Portfolio Publishing, The Woodlands, Tex.
31. Laukevics, J. J., A. F. Apsite, U. E. Viesturs, and R. P. Tengerdy. 1984. Solid substrate fermentation of wheat straw to fungal protein. *Biotechnol. Bioeng.* 26:1465-1474.
32. Lee, M. D., and R. L. S. Raymond. 1991. Case history of the application of hydrogen peroxide as an oxygen source for *in situ* bioreclamation, pp. 429-436. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbuttel (eds.), *In Situ* Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
33. McCarty, P. L. 1988. Bioengineering issues related to *in situ* remediation of contaminated soils and groundwater, pp. 143-162. In G. S. Omenn (ed.), *Basic Life Sciences*, 45 *Environmental Biotechnology: Reducing Risks from Environmental Chemicals through Biotechnology*, Plenum Press, New York.
34. McFarland, M. J., J. Q. Xiu, W. A. Aprill, and R. C. Sims. 1989. Biological composting of petroleum waste organics using the white rot fungus *Phanerochaete chrysos-*

- porjum. Proceedings of the Institute of Gas Technology's Second International Symposium on Gas, Oil, Coal and Environmental Biotechnology, pp. 2.3.1-22.
35. Mikesell, M. D., and S. A. Boyd. 1988. Enhancement of pentachlorophenol degradation in soil through induced anaerobiosis and bioaugmentation with anaerobic sewage sludge. *Environ. Sci. Technol.* 22:1411-1414.
  36. van den Munckhof, G. P. M., and M. F. X. Veul. 1991. Production-scale trials on the decontamination of oil-polluted soil in a rotating bioreactor at field capacity, pp. 441-451. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
  37. Naumova, R. P., S. Y. Selivanovskaya, and F. A. Mingatina. 1988. Possibility of deep bacterial destruction of 2,4,6-trinitrotoluene. *Mikrobiologiya (USSR)* 57:218-222.
  38. Osmon, J. L., C. C. Andrews, and A. Tatyrek. 1978. The biodegradation of TNT in enhanced soil and compost systems. Report No. ARLCD-TR-77032. U.S. Army Armament Research and Development Command. Large Caliber Weapon Systems Laboratory, Dover, N.J.
  39. Porta, A. 1991. A review of European bioreclamation practice, pp. 1-13. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
  40. Salkinoja-Salonen, M., P. Middeldorp, M. Briglia, R. Valo, M. Haggblom, and A. McBain. 1989. Cleanup of old industrial sites, pp. 347-368. In D. Kamely, A. Chakrabarty, and G. S. Omenn (eds.), *Advances in Biotechnology Series, 4: Biotechnology and Biodegradation*, Portfolio Publishing, The Woodlands, Tex.
  41. Schmitt, E. K., M. T. Lieberman, J. A. Caplan, D. Blaes, P. Keating, and W. Richards. 1991. Bioremediation of soil and groundwater contaminated with stoddard solvent and mop oil using the PetroClean bioremediation system, pp. 581-599. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
  42. Semprini, L., G. D. Hopkins, P. V. Roberts, and P. L. McCarty. 1991. *In situ* biotransformation of carbon tetrachloride, freon-113, freon-11, and 1,1,1-TCA under anoxic conditions, pp. 41-58. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
  43. Short, K. A., J. D. Doyle, R. J. Mng, R. J. Seidler, G. Stotzky, and R. H. Olsen. 1991. Effects of 2,4-dichlorophenol, a metabolite of a genetically engineered bacterium, and 2,4-dichlorophenoxyacetate on some microbe-mediated processes in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:412-418.
  44. Sims, J. L., R. C. Sims, and J. E. Mathews. 1990. Approach to bioremediation of contaminated soil. *Haz. Waste Haz. Mat.* 7:117-149.
  45. Skinner, J. H., G. G. Ondich, and T. L. Baugh. 1991. U.S. EPA Bioremediation Research Programs, pp. 1-15. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbittel (eds.), *On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
  46. Spain, J. C., and D. T. Gibson. 1991. Pathway for biodegradation of *p*-nitrophenol in a *Moraxella* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:812-819.
  47. Spain, J. C., O. Wyss, and D. T. Gibson. 1979. Enzymatic oxidation of *p*-nitrophenol. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 88:634-641.

48. Spanggard, R. J., J. C. Spain, S. F. Nishino, and K. E. Mortelmans. 1991. Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3200-3205.
49. Stegmann, R., S. Lotter, and J. Heerenklage. 1991. Biological treatment of oil-contaminated soils in bioreactors, pp. 188-208. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbuttel (eds.), *In Situ Bioreclamation: Applications and Investigations for Hydrocarbon and Contaminated Site Remediation*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.
50. Stevens, T. O. 1989. Ph. D. dissertation, University of Idaho, Moscow, Idaho.
51. Stevens, T. O., R. L. Crawford, and D. L. Crawford. 1990. Biodegradation of dinoseb (2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol) in several Idaho soils varying in dinoseb exposure history. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:133-139.
52. Stevens, T. O., R. L. Crawford, and D. L. Crawford. 1991. Selection and isolation of bacteria capable of degrading dinoseb (2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol). *Biodegradation* 2:1-13.
53. Tewfik, M. S., and W. C. Evans. 1966. The metabolism of 3,5-dinitro-*o*-cresol (DNOC) by soil micro-organisms. *Biochem. J.* 99:31.
54. Visscher, K., J. Brinkman, and E. R. Soczo. 1989. Biotechnology in hazardous waste management in the Netherlands, pp. 389-403. In D. Kamely, A. Chakrabarty, and G. S. Omenn (eds.), *Advances in Applied Biotechnology Series, 4: Biotechnology and Biodegradation*, Portfolio Publishing, The Woodlands, Tex.
55. Wallnoefer, P. R., W. Ziegler, G. Engelhardt, and H. Rothmeier. 1978. Transformation of dinitrophenol herbicides by *Azotobacter* sp. *Chemosphere* 7:967-972.
56. Webb, O. F., T. J. Phelps, P. R. Bienkowski, P. M. Digrazia, G. D. Reed, B. Applegate, D. C. White, and G. S. Sayler. 1991. Development of a differential volume reactor system for soil biodegradation studies. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28/29:5-19.
57. Wesseling, J., and W. R. van Wijk. 1957. Land drainage in relation to soils and crops: I. Soil physical conditions in relation to drain depth, pp. 461-504. In L. N. Luthin (ed.), *Drainage of Agricultural Lands*, American Society of Agronomy, Madison, Wisc.
58. Won, W. D., L. H. DiSalvo, and J. Ng. 1976. Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:576-580.
59. Woodward, R. E. Evaluation of composting implementation: A literature review. Report No. TCN 89363, U.S. Army Toxic and Hazardous Materials Agency, Aberdeen Proving Ground, Maryland.
60. Yare, B. S. 1991. A comparison of soil-phase and slurry-phase bioremediation of PNA-containing soils, pp. 173-187. In R. E. Hinchee and R. F. Olfenbuttel (eds.), *On-Site Bioreclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass.

# Capítulo 11

## TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES Y PELIGROSAS

---

**Gregory D. Sayles**

*Agencia de Protección Ambiental U.S.A.  
Laboratorio de Reducción de Riesgos  
Cincinnati, Ohio*

**Makram T. Suidan**

*Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental  
Universidad de Cincinnati  
Cincinnati, Ohio*

Las tecnologías que emplean microorganismos naturales para la destrucción de compuestos orgánicos han sido, históricamente, las tecnologías de tratamiento más utilizadas por su bajo coste frente a los métodos físicos y químicos. Estas tecnologías son menos costosas porque las reacciones de degradación, medidas por la actividad biocatalítica natural, se producen a velocidades rápidas a temperatura ambiente. Por lo tanto, los costes energéticos del tratamiento son relativamente bajos.

A lo largo del último siglo, el desarrollo de tecnologías basadas en microorganismos para el tratamiento de aguas residuales urbanas ha proporcionado excelentes procesos para la destrucción de los constituyentes fácilmente biodegradables en condiciones aerobias. Por lo tanto, en el tratamiento de muchas aguas residuales industriales y peligrosas se han aplicado con éxito procesos similares a los utilizados para el tratamiento convencional de aguas residuales urbanas.

De hecho, la industria depende en gran medida del tratamiento de sus residuos peligrosos en instalaciones públicas. Sólo en 1990 se enviaron a Estaciones Depu-

radoras de Aguas Residuales Urbanas (EDARU) más de 60 millones de kg de residuos químicos (Thayer, 1992).

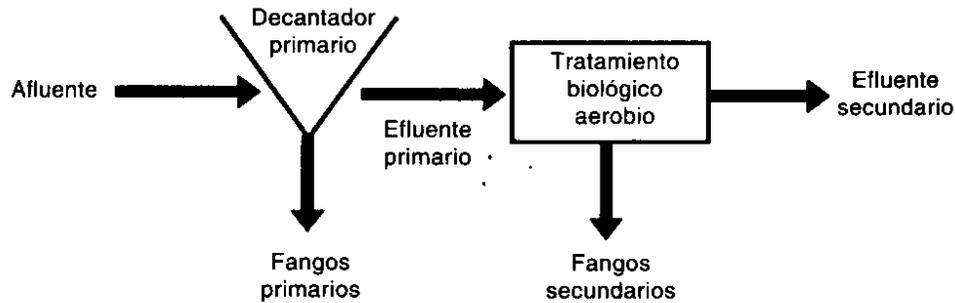
Sin embargo, el diseño estándar clásico de los sistemas de tratamiento de aguas residuales no consigue degradar muchos de los productos químicos que se han inventado en el siglo xx y que ahora aparecen en las aguas residuales industriales y domésticas. Se deben desarrollar nuevas o mejores tecnologías capaces de utilizar procesos biodegradadores basados en microorganismos.

Este capítulo proporciona una visión globalizada del estado actual de tratamiento a gran escala de las aguas residuales industriales y peligrosas. En primer lugar, se resume la capacidad de las EDARUs para tratar aguas residuales urbanas típicas. Muchos de los procesos que tratan aguas residuales industriales y peligrosas esencialmente son versiones a pequeña escala de las EDARUs. Después, se discuten las limitaciones de los procesos de tratamiento convencionales respecto a la destrucción de compuestos no convencionales, como, por ejemplo, los orgánicos y metales tóxicos que se pueden encontrar en algunas aguas residuales industriales y peligrosas. Finalmente, se examinarán los procesos pioneros capaces de superar estas limitaciones de forma que se minimice la emisión de compuestos tóxicos al ambiente y se maximice su destrucción.

## **Tratamiento biológico convencional de residuos líquidos**

Tradicionalmente, el principal objetivo en el tratamiento biológico de aguas residuales domésticas ha sido la reducción de la demanda biológica de oxígeno (DBO), de forma que el líquido tratado se pueda emitir al ambiente con un impacto mínimo sobre la ecología local. Por lo general, este objetivo se consigue mediante (1) la separación biológica de los orgánicos solubles, de modo que las células microbianas degraden los compuestos orgánicos para generar energía y materia prima genética con el fin de crear más células, y (2) la separación de la materia orgánica residual en suspensión (sólidos en suspensión, biológicos y no biológicos) utilizando la decantación (sedimentación).

En las EDARUs estas tareas se suelen llevar a cabo mediante procesos en serie de tratamiento primario y secundario (que se muestran esquemáticamente en la Figura 11.1). Actualmente, se utiliza una combinación del tratamiento primario y secundario en al menos el 75 por ciento de las EDARUs de Estados Unidos (véase Tabla 11.1). El tratamiento primario consiste en el tamizado y la sedimentación del líquido afluente de aguas residuales para separar los materiales grandes no solubles. El tratamiento secundario incluye el uso de un biorreactor, normalmente, con una decantación posterior. El objetivo del biorreactor es mineralizar la materia orgánica soluble en dióxido de carbono y agua. Sin embargo, ningún reactor puede destruir el 100 por cien de la DBO afluente, y una fracción de ésta se convertirá en masa celular adicional debido al crecimiento celular. En la decantación posterior, los sólidos suspendidos en el efluente del biorreactor (principalmente material celular) se separan del efluente. Normalmente, parte del líquido ya reducido en sólidos, que sale del tanque de sedimentación, se desinfecta y descarga al



**FIGURA 11.1.** Esquema de un tratamiento típico primario y secundario combinado.

ambiente. El fango secundario, enriquecido en sólidos, que se separa en el decantador secundario se puede recircular al biorreactor para aumentar la concentración de biomasa presente en el reactor. Una parte del fango secundario sufre un tratamiento biológico adicional para reducir su DBO. Finalmente, el fango estabilizado se evacua en un vertedero o se incinera. El tratamiento de los residuos industriales quizás no requiera un tratamiento primario si el agua residual industrial (ARI) no contiene material insoluble.

Los objetivos de calidad para el efluente de las EDARU de Estados Unidos se dictan por ley y se resumen someramente en la Tabla 11.2.

Este capítulo se centrará en el estudio del reactor biológico del proceso (biorreactor). La mayor parte de los biorreactores de tratamiento de aguas residuales dependen de procesos biológicos aerobios, aunque se utilizan biorreactores no aerobios, es decir, anaerobios o anóxicos con fines concretos. Las características generales de los biorreactores aerobios y anaerobios empleados en las instalaciones convencionales de tratamiento se discuten por separado a continuación. Estos reactores utilizan una población mezclada de microorganismos que se desarrollan a partir de los microorganismos presentes en el afluente y de las condiciones operativas del reactor.

**TABLA 11.1.** Número de instalaciones de tratamiento de aguas residuales domésticas en Estados Unidos según el nivel de tratamiento en 1988 (total = 15.708) (adaptado de EPA U.S.A., 1989)

Nivel de tratamiento	Porcentaje del total de instalaciones
Sólo primario	11
Primario y secundario	54
Primario, secundario y más	21
Otros	14

**TABLA 11.2.** Niveles mínimos en Estados Unidos para el efluente del tratamiento secundario (Reg. Fed., 1988, 1989)

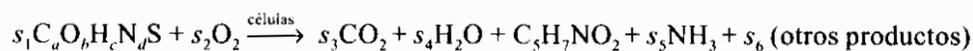
Característica del efluente	Separación media (%)	Concentración media en 30 días	Concentración media en 7 días
DBO <sub>5</sub> (mg/l)	≥ 85	≤ 30	≤ 45
Sólidos suspendidos (mg/l)	≥ 85	≤ 30	≤ 45
pH		Entre 6,0 y 9,0 en todo momento	

### Biorreactores aerobios

Las fuentes orgánicas solubles de demanda química de oxígeno se pueden eliminar mediante cualquier proceso biológico viable, aerobio, anaerobio, u otro. Sin embargo, los procesos aerobios son los que se emplean normalmente como método principal para la reducción de la DBO en las aguas residuales domésticas, ya que las reacciones microbiológicas son rápidas, normalmente 10 veces más rápidas que en los procesos anaerobios. Por lo tanto, los reactores aerobios pueden ser relativamente pequeños y permanecer abiertos a la atmósfera, dando lugar a la forma más económica de reducción de la DBO.

La principal desventaja de los procesos aerobios frente a los no aerobios en el tratamiento de aguas residuales, es la gran cantidad de materia celular que se produce. En el biorreactor aerobio se produce una tasa relativamente alta de biomasa debido a que el crecimiento biológico (masa celular producida por unidad de materia orgánica biodegradable) para los organismos aerobios es relativamente alto, más o menos 4 veces mayor que el producido por los organismos anaerobios. La materia celular residual y otros materiales insolubles (fangos) presentes en el efluente del reactor pueden contener una DBO residual que deberá reducirse en un proceso adicional, y que finalmente se evacuará como residuo sólido.

La estequiometría no ajustada de un proceso microbiológico aerobio es



donde  $C_a O_b H_c N_d S$  es la composición elemental del afluente;  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$  y  $e$  se determinan según la composición específica del agua residual; y  $C_5 H_7 NO_2$  es la composición media de una célula (Metcalf y Eddy, Inc., 1991). Si se pueden despreciar los «otros productos» formados, entonces la estequiometría ( $s_1$ ,  $s_2$ , etc.) de la reacción se determinará según la composición del afluente ( $a$ ,  $b$ ,  $c$  y  $d$ ) solucionando los balances elementales para C, H, O y N. Suponiendo que la reacción se complete, entonces se podrá calcular la tasa de suministro de oxígeno necesario y la tasa de producción de fangos celulares a partir de la ecuación ajustada, conocida la tasa del afluente del reactor.

Existen varios diseños comunes de reactores aerobios, y se resumen en la Tabla 11.3. El más común de estos diseños para el tratamiento secundario es el de los

**TABLA 11.3.** Descripción de los reactores típicos de tratamiento biológico aerobio a gran escala

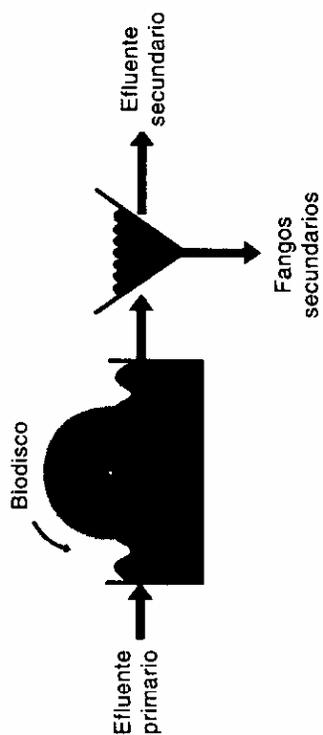
Nombre del reactor	Descripción	Esquema
<p>Procesos con biomasa en suspensión:</p> <p>Fangos activados</p>	<p>Reactor flujo pistón o de mezcla completa seguido por un tanque de sedimentación; parte de los sólidos sedimentados (fango activo) se devuelven al reactor; reactor y tanque de sedimentación están abiertos a la atmósfera; aireación forzada. Utilizado por la mayoría de los municipios para el tratamiento secundario. (Véase Bailey y Ollis, 1986; Metcalf y Eddy, Inc., 1991; Stall y Sheppard, 1978; WPCF, 1987.)</p>	
<p>Estanques, lagunas</p>	<p>Esencialmente, un estanque excavado en el suelo, abierto a la atmósfera. Puede funcionar de forma totalmente aerobia o mediante una combinación aerobia y anaerobia (facultativo) según el tipo de mecanismo de aireación empleado y el grado de mezcla. Aireación pasiva o mediante aireadores superficiales. El diseño facultativo se emplea en comunidades e industrias pequeñas para un tratamiento secundario poco costoso; permite una reducción aerobia del DBO y la estabilización anaerobia de los fangos en un mismo depósito. El diseño industrial incluye un revestimiento del suelo si existen residuos peligrosos. Los estanques aerobios se utilizan para tratar los residuos de bajas concentraciones como, por ejemplo, el tratamiento final de los efluentes secundarios. (Véase Mancini y Barnhart, 1968; Metcalf y Eddy, Inc., 1991; Middlebrooks et al., 1982; Thirumurthi, 1969.)</p>	

**TABLA 11.3.** Descripción de los reactores típicos de tratamiento biológico aerobio a gran escala (continuación)

Nombre del reactor	Descripción	Esquema
Procesos con biomasa adherida: Lechos bacterianos	<p>Torres rellenas con un medio soporte que apoya el crecimiento celular; el flujo de residuos se distribuye sobre la parte superior del medio y después se filtra entre el medio donde hace contacto con la biomasa; aireación pasiva desde arriba y abajo de la torre donde está abierta a la atmósfera; el medio puede ser grava («filtro lento») o estructuras huecas de plástico con un área superficial alta («filtro rápido»). Se puede emplear para el tratamiento secundario. El filtro lento también puede propiciar una desnitrificación. El filtro rápido normalmente supone la recirculación parcial del efluente. (Véase Bailey y Ollis, 1986; Aryan y Johnson, 1987; Harrison y Dagger, 1987; Metcalf y Eddy, Inc., 1991.)</p>	

### Biodiscos

Discos sólidos donde se adhiere la biomasa, que giran sobre un eje horizontal que contacta de forma alterna con el flujo de los residuos abajo y el aire arriba. Se utilizan múltiples discos por reactor, a menudo los reactores funcionan en serie y paralelamente porque el tamaño de cada reactor viene limitado por el peso de los discos con la biomasa adherida. Se puede emplear para el tratamiento secundario. (Véase Metcalf y Eddy, Inc., 1991; EPA U.S.A., 1984a; EPA U.S.A., 1984b.)



fangos activos (Fig.11.3). En la Tabla 11.4 se resumen los parámetros operativos típicos y las capacidades de los biorreactores aerobios.

### Biorreactores no aerobios

Aunque los reactores aerobios normalmente son la forma más económica de destruir la DBO no peligrosa, los biorreactores no aerobios se pueden emplear conjuntamente con el tratamiento convencional cuando existen unas necesidades especiales de tratamiento. Los biorreactores no aerobios pueden jugar un papel elemental en el tratamiento de los residuos peligrosos, tal y como se discute más adelante en este capítulo.

Los tres procesos microbiológicos no aerobios utilizados con más frecuencia son: (1) anaerobio, es decir, metanogénesis; (2) anóxico, es decir, reducción de nitratos, y (3) reducción de sulfatos. Los procesos metanogénicos se caracterizan por un bajo crecimiento celular y una gran tolerancia a las concentraciones orgánicas altas, características que deberían convertirlos en una elección lógica para el tratamiento de residuos. Sin embargo, su baja tasa de utilización de materia orgánica, su sensibilidad a la temperatura (la temperatura óptima es 37 °C), y el alto coste del reactor limitan su uso a aplicaciones sobre pequeños caudales de aguas residuales, como por ejemplo la estabilización de fangos (reducción adicional de la DBO en los fangos del tratamiento secundario), y al tratamiento industrial de residuos orgánicos de alta concentración.

**TABLA 11.4.** Valores típicos de los procesos aerobios de tratamiento biológico (adaptado de Metcalf y Eddy, Inc., 1991)

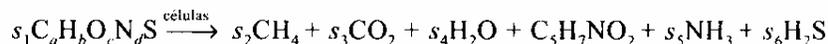
Proceso aerobio	Eliminación típica de DBO (%)	Tasa típica de eliminación de DBO	Tiempo de retención del líquido
Procesos de fangos activados			
Convencional (flujo pistón)	85-95	240-640 (15-40)*	4-8 h
Mezcla completa (CSTR)	85-95	640-1.760 (40-110)*	3-5 h
Estanques/lagunas			
Aerobio-anaerobio	80-95	14,4-64 (0,9-4)†	5-30 días
Aerobio (tasa baja)	80-95	17,6-40 (1,1-2,5)†	10-40 días
Lechos bacterianos			
Medio rocoso (tasa baja)	80-90	64-400 (4-25)†	
Medio plástico (tasa muy alta)	65-90	320-1.280 (20-80)†	
Biodiscos	60-95	32-56 (2-3,5)†	0,7-1,5 h

\* Medida en mg/l.d (lb/10<sup>3</sup>ft<sup>3</sup> · día).

† Medida en mg/l.d (lb/10<sup>3</sup>ft<sup>3</sup> · día).

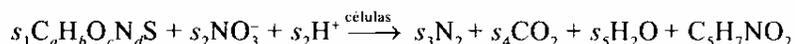
1 lb/10<sup>3</sup>ft<sup>3</sup> · d = 16 mg/l.d.

La reacción metanogénica típica (no ajustada) es



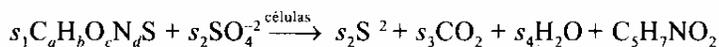
A menudo, los reactores metanogénicos se calientan para acelerar la reacción. Con frecuencia, el calentamiento se realiza recolectando y quemando el gas metano producido.

Los procesos anóxicos (reductores de nitratos) se emplean como paso final en la oxidación del amoníaco. Los niveles de amoníaco altos se deben eliminar del flujo de residuos por su alto valor nutritivo. Normalmente, un biorreactor aerobio, durante el proceso de tratamiento (por ejemplo, un proceso de fangos activos), oxida el amoníaco presente en el agua residual y el amoníaco generado en el reactor mediante la descomposición de las proteínas para formar nitratos (nitrificación). El nitrato retiene el valor nutritivo y es una toxina humana. Por lo tanto, si existen altos niveles de nitratos en el efluente secundario, se puede añadir un reactor anóxico en serie para reducir los nitratos convirtiéndolos en gas nitrógeno (desnitrificación) según la ecuación no equilibrada



Por lo tanto, debe haber compuestos biodegradables en el afluente del reactor anóxico, bien como remanentes del reactor aerobio, o bien como un añadido al agua residual (normalmente metanol).

Para las ARIs que contienen altos niveles de sulfatos y compuestos orgánicos, se puede emplear el proceso microbiológico de reducción de sulfatos; en este caso, los sulfatos se reducen a sulfuros mediante la oxidación del afluente orgánico. La reducción no ajustada es



### Limitaciones de los procesos biológicos convencionales para el tratamiento de productos químicos peligrosos

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, U.S.A.) controla las emisiones al ambiente de unos 120 compuestos procedentes de operaciones industriales activas mediante el Acta de Recuperación y Conservación de Recursos (RCRA), de 1976, y las emisiones al ambiente procedentes de los lugares no activos, abandonados o cerrados, mediante el Acta Global de Responsabilidad, Compensación y Respuesta Ambiental (CERCLA o Superfondo), de 1980. Se ha establecido una lista de compuestos peligrosos, es decir, de compuestos que presentan riesgos para el ecosistema o para la salud pública. En la Tabla 11.5 se recoge una muestra representativa de los compuestos orgánicos listados. También se citan como peligrosos varios metales, entre los que se incluyen: arsénico, cromo, mercurio, selenio, vanadio, y zinc.

**TABLA 11.5.** Algunos contaminantes y sus propiedades biológicas y físicas asociadas (de una base de datos perteneciente a Govind et al., 1991a)

Compuesto	Constante de la tasa de biodegradación ( $k_b \times 10^2$ l/mg · h)	Constante de la Ley de Henry ( $H \times 10^3$ atm · m <sup>3</sup> /mol)	Constante de distribución entre las fases octanol-agua ( $k_{ow}$ )
Acetona	0,020	$2,5 \times 10^{-2}$	0,57
Antraceno	0,30	$8,6 \times 10^{-2}$	$2,8 \times 10^4$
Benceno	2,9	5,5	140
Clorobenceno	0,30	3,6	$6,9 \times 10^2$
Cloroformo	$<10^{-3}$	3,4	91
Clordan	$3,0 \times 10^{-4}$	$9,4 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^5$
2,4-diclorofenol	10	$2,8 \times 10^{-3}$	790
Endrin	$1,0 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^{-4}$	$3,4 \times 10^4$
Etilbenceno	3,0	6,4	1.400
Fluoreno	1,0	$6,4 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^4$
Hexaclorobenceno	$3,0 \times 10^{-4}$	0,68	$2,6 \times 10^6$
Naftaleno	10	0,46	2.000
Nitrobenceno	1,5	$1,3 \times 10^{-2}$	72
Pireno	$1,0 \times 10^{-2}$	$5,1 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^6$
Tetracloroetano	$3,0 \times 10^{-4}$	11,0	1.100
Tolueno	10	6,7	620
Triclorometileno	$1,0 \times 10^{-4}$	9,1	260
Cloruro de vinilo (VC)	0,30	11,9	140

El éxito de los tratamientos convencionales en la degradación de estos compuestos peligrosos depende del destino final del compuesto en la instalación de tratamiento. Existen varios procesos en el mercado que procuran un destino final para un compuesto:

1. *Biodegradación.* El compuesto se destruye al menos parcialmente. Es posible que la biodegradación no se produzca porque los organismos aerobios no sean capaces de degradar el compuesto.
2. *Evaporación.* Los compuestos con constantes de la Ley de Henry relativamente altas (compuestos volátiles) pueden salir de la instalación cuando se encuentran en el decantador primario, en el biorreactor, o en el decantador secundario, mediante su evaporación a la atmósfera en la interfase aire-agua, o por la aireación o ventilación forzada del biorreactor.
3. *Adsorción a sólidos y precipitación.* Los compuestos orgánicos que se dividen o seccionan preferentemente pasando desde el agua a los sólidos en el biorreactor, como por ejemplo los microorganismos (con coeficiente de reparto octanol-agua relativamente alto), al final saldrán de la instalación en la evacuación de los fangos. En los fangos residuales de los proce-

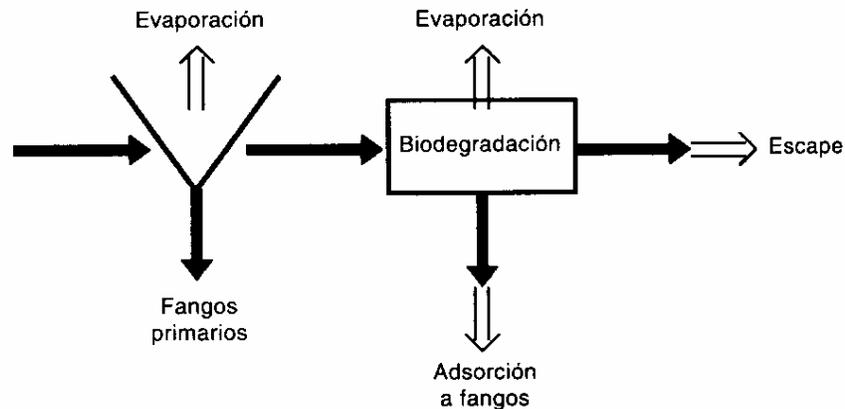
Los de tratamiento biológico con frecuencia se separan y precipitan metales pesados.

4. *Escape*. Los compuestos que no se biodegradan completamente, volatilizan, o se adsorben a los sólidos saldrán del biorreactor en el flujo del efluente líquido, descargándose posiblemente al ambiente en aguas superficiales o marinas.

Los diferentes destinos que procura el tratamiento convencional se ilustran en la Figura 11.2.

El destino de un compuesto en particular se establece mediante las tasas relativas de los procesos mencionados anteriormente. Estas tasas se determinan según las siguientes propiedades biológicas y físicas de los compuestos:  $k_b$ , constante de la tasa de degradación biológica de los fangos activos;  $H$ , constante de Henry para el reparto agua-aire; y  $k_{ow}$ , constante de reparto octanol-agua; esta constante se ha mostrado como una buena forma de medir el coeficiente de adsorción agua-fango (Dobbs et al., 1989). Todas estas propiedades se resumen en la Tabla 11.5. El destino de un compuesto se puede estimar comparando los valores de los parámetros recogidos en la Tabla 11.5. Por ejemplo, comparando los valores de los parámetros en el caso del 2,4-diclorofenol, el tricloroetileno (TCE), y el herbicida endrin, la estimación razonable de los destinos sería: biodegradación, evaporación, y adsorción con el fango, respectivamente.

El destino de un compuesto que entre en una planta también depende de los parámetros operativos de la instalación: por ejemplo, la tasa de aireación, el tiempo de retención del líquido, y otros. Por lo tanto, para realizar una estimación más exacta del destino de los productos químicos peligrosos en el tratamiento convencional se requiere, o un modelo matemático de todo el proceso de tratamiento que incorpore los distintos destinos, o mediciones experimentales de los destinos du-



**FIGURA 11.2.** Destino de los productos químicos en el tratamiento convencional de las aguas residuales.

rante el tratamiento real, o bien una simulación a escala piloto de las instalaciones de tratamiento.

En los procesos de tratamiento convencionales existen varios modelos matemáticos disponibles para establecer el destino de los compuestos tóxicos (p. ej., Petrasek et al., 1983; Barton, 1987; Blackburn, 1987; Namkung y Rittman, 1987; Govind et al., 1991a). Los modelos no pueden simular de igual forma el rendimiento de todas las plantas de tratamiento porque las premisas de simplificación de los modelos no siempre se cumplen en la instalación real. Sin embargo, los modelos permiten una variación independiente de los parámetros del sistema y la simulación del rendimiento resultante. Por ejemplo, el análisis de optimización de un biorreactor de fangos activos respecto a la aireación se puede lograr mediante el uso de un modelo que calcule la tasa de biodegradación y la tasa de evaporación de los compuestos orgánicos en función de la tasa de aireación.

Cuando se eligieron los parámetros operativos para simular una planta convencional de tratamiento de aguas residuales, uno de los modelos más sofisticados (Govind et al., 1991a) estableció una serie de destinos para el 2,4-diclorofenol, el TCE, y el pesticida endrin, destinos que se muestran en la Tabla 11.6, el cálculo realizado mediante este modelo concuerda con la estimación realizada previamente utilizando sólo parámetros biológicos y físicos.

Los metales peligrosos no se han incluido en la Tabla 11.5 porque hay poca información disponible sobre el reparto agua-fangos de los metales pesados. Sin embargo, como norma general, la mayor parte de los metales pesados que entran en una instalación de tratamiento convencional se dividen adhiriéndose a, y separándose con, los fangos.

El destino principal de muchos productos químicos peligrosos es la biodegradación; es decir, la tasa de biodegradación es mucho más rápida que la tasa de evaporación o de adsorción a sólidos en un reactor optimizado. Por ejemplo, y tomando como referencia la Tabla 11.5, el destino principal del benceno, nitrobenzeno y tolueno probablemente será la biodegradación. La Tabla 11.6 muestra que también se biodegrada la mayor parte del 2,4-diclorofenol. La introducción de

**TABLA 11.6.** Destino calculado para algunos compuestos seleccionados en una instalación convencional de tratamiento de aguas residuales\* utilizando el modelo FATE (Govind et al., 1991a)

Compuesto	Biodegradación	Evaporación	Adsorción	Escape
2,4-diclorofenol	81	4	5	10
Endrin	26	3	34	37
Tetracloroetileno	2	91	0	7

\* Tamaño de planta = 1 MGD (3.785 m<sup>3</sup>/d), incluye el tratamiento secundario de los fangos primarios y activados, aireación mediante burbujas gruesas difundidas, relación de recirculación = 0,5, tasa de producción de fangos = 32 m<sup>3</sup>/día, caudal = 3.785 m<sup>3</sup>/día, volumen = 646 m<sup>3</sup>.

compuestos de este tipo, aunque sean peligrosos, procedentes de una fuente industrial en el sistema de alcantarillado urbano, no supondrá problema alguno para su tratamiento en la instalación de aguas residuales urbanas, siempre que las concentraciones no sean intrínsecamente tóxicas para los microorganismos. Alternativamente, estos compuestos podrían ser tratados de forma convencional en la propia fuente industrial.

Sin embargo, muchos de los productos químicos peligrosos, en apariencia, no son fácilmente biodegradables mediante los procesos de tratamiento convencionales —los principales destinos son: evaporación, adsorción y escape—. Estos destinos son indeseables para los compuestos peligrosos porque implican su salida al ambiente con consecuencias a su vez indeseables, como se resume en la Tabla 11.7. Se han realizado varios estudios experimentales a escala real y piloto (p. ej., Bell et al., 1988; Bhattacharya et al., 1990; Burns y Roe Industrial Service Corporation, 1982; Hannah et al., 1986; Thompson et al., 1990). Bell et al. (1988) estudiaron la evaporación de los compuestos orgánicos volátiles en varias instalaciones canadienses de tratamiento de aguas residuales municipales a escala real. En la Tabla 11.8 se resumen parte de los datos recogidos en la planta Lakeview. La tasa de separación combinada mediante biodegradación y adsorción, mostrada en la Tabla 11.8, se calculó utilizando un balance de masas de los gases de chimenea y del efluente líquido. Obviamente, la evaporación puede ser un destino frecuente para los productos químicos peligrosos que entran en instalaciones convencionales de tratamiento. Por ejemplo, y según la Tabla 11.8, más del 50 por ciento del dicloroetano y más del 25 por ciento del tolueno y del TCE que habían entrado en la planta, se emitieron a la atmósfera mediante evaporación.

**TABLA 11.7.** Impacto ambiental de los destinos de compuestos peligrosos en instalaciones convencionales de tratamiento

<b>Destino del compuesto</b>	<b>Impacto ambiental</b>
Biodegradación	Ninguno, el resultado deseado.
Evaporación	Emisión a la atmósfera de compuestos volátiles; exposición de seres humanos a cancerígenos; contribuye a la degradación de la capa de ozono.
Adsorción	Los compuestos tóxicos van al vertedero junto con los fangos; puede provocar la contaminación de las aguas subterráneas, lo que podría amenazar a los suministros de agua potable.
Escape	Emisión de compuestos tóxicos a las aguas superficiales (ríos, lagos, océanos); puede contaminar fuentes de agua potable, dañar el ecosistema local.

**TABLA 11.8.** Destino de algunos compuestos orgánicos volátiles seleccionados (combinación de biodegradación y adsorción a fangos, evaporación y escape) en la instalación de tratamiento de Lakeview\*, Ontario, Canadá. (Adaptado de Bell et al., 1988)

Compuesto	Tasa de separación (g/día) por:				Porcentaje de separación por:		
	Carga afluente (g/día)	Biodegra- dación y adsorción	Evapo- ración	Escape	Biodegra- dación y adsorción	Evapo- ración	Escape
Benceno	31	27	4	ND	87	13	0
Cloroformo	435	271	85	79	62	20	18
Diclorometano	4.198	514	2.316	1.368	12	55	33
Etilbenceno	215	120	92	3,5	56	43	1
Tolueno	1.469	1.091	361	17	74	25	1
Tricloroetileno	72	36	21	15	50	29	21

\* Reactor de grava: volumen = 683 m<sup>3</sup>, caudal de aire = 10,4 m<sup>3</sup>/min. Depósito de aireación de fangos activos: volumen = 16.070 m<sup>3</sup>, caudal de aire = 2.064 m<sup>3</sup>/min., difusor grueso. Tiempo de retención de tratamientos primario y secundario = 6,0 h, tasa de aire global = 46 m<sup>3</sup> aire/m<sup>3</sup> agua.

A continuación se discuten las correcciones y alternativas biológicas que permitirán variar los destinos no aceptables de los productos químicos peligrosos en las instalaciones convencionales de tratamiento.

### Soluciones mediante procesos biológicos a las limitaciones de los tratamientos biológicos convencionales

La discusión anterior pone de relieve que las limitaciones del tratamiento convencional respecto a muchos de los compuestos peligrosos dependen en gran medida de la naturaleza del residuo peligroso que estemos considerando. Por lo tanto, la solución a estas limitaciones depende de los compuestos presentes en el agua residual.

Las plantas de tratamiento, municipales o industriales, que no puedan tratar de forma satisfactoria los residuos peligrosos afluentes se deben modificar para tratar estos compuestos de modo que se pueda evitar una emisión ilegal o poco ética al ambiente. Estas modificaciones también serán necesarias en el diseño de las instalaciones nuevas que traten estos residuos; cuando se diseña una instalación nueva, existe la posibilidad de optimizar el diseño y de poder integrar el tratamiento convencional a los procesos necesarios que permitan el tratamiento de los residuos peligrosos.

Se han desarrollado muchos sistemas biológicos para apoyar o sustituir el tratamiento convencional con el fin de eliminar los residuos peligrosos. Estos procesos emplean asociaciones microbiológicas extraídas de las instalaciones de trata-

miento convencional, estos organismos se inoculan directamente en el biorreactor, o bien se dejan para que se aclimaten a los compuestos tóxicos antes de la inoculación. En el futuro se podrá disponer de procesos biológicos que utilicen cultivos puros de microorganismos, alterados de forma natural o genéticamente. Estas posibilidades no serán tratadas aquí. En la Tabla 11.9 se citan las características biológicas y físicas de los residuos peligrosos junto con una selección de las técnicas desarrolladas para tratar estos compuestos. A continuación se examina cada una de estas tecnologías.

### Digestión anaerobia de fangos

En muchas plantas de tratamiento de aguas residuales, municipales e industriales, el fango efluente de los tratamientos primario y secundario se lleva a un biorreactor anaerobio (frecuentemente denominado *digestor* o *estabilizador anaerobio*) para reducir la DBO residual de los fangos (Metcalf y Eddy, 1991). Las condiciones anaerobias dan lugar a la degradación biológica metanogénica de la DBO, dejando a los fangos aptos para su evacuación en el vertedero. Si los compuestos orgánicos tóxicos se adsorben a los fangos, las condiciones metanogénicas del digestor pueden estimular la degradación de muchos de estos compuestos tóxicos (Govind et

**TABLA 11.9.** Alternativas/complementos con procesos biológicos para el tratamiento convencional de compuestos peligrosos con características físicas y biológicas diferentes

Características de los compuestos peligrosos	Alternativas/adiciones al tratamiento convencional
Fácil de biodegradar aerobiamente ( $k_b$ alto)	Ninguna necesaria.
Volátil ( $H$ alto)	Arrastrar con el aire del afluente, tratar el aire con un biofiltro para fase gaseosa. Tratar los gases del fango activado utilizando un biofiltro para fase gaseosa. Proceso PACT*. Pretratamiento anaerobio.
Adsorción a fangos ( $k_{ow}$ alto)	Estabilización de fangos anaerobios. Pretratamiento o tratamiento único con reactor biopelícula aerobio o anaerobio. Proceso PACT.
Escape ( $k_b$ , $H$ , y $k_{ow}$ bajos)	Pretratamiento anaerobio o tratamiento único. Proceso PACT.

\* Powdered Activated Carbon Treatment (Tratamiento con carbono activado en polvo) (Eckenfelder, 1989).

al., 1991b). Por lo tanto, si el destino primario de los compuestos orgánicos tóxicos afluentes en el tratamiento convencional es su adsorción a los fangos, su destino último será su biodegradación en el digestor anaerobio. Los parámetros operativos típicos para el digestor anaerobio son: un tiempo de retención de entre 10 y 20 días para líquidos y sólidos, y una temperatura de 35 °C. El metano producido por la actividad microbiana metanogénica a menudo se quema para ayudar al calentamiento del biorreactor.

### Proceso PACT

El proceso patentado PACT, *proceso de tratamiento con carbono activado en polvo* (proceso PACT), implica la adición continua de carbono activo, en forma de polvo, al biorreactor de fangos activados con el fin de adsorber los compuestos orgánicos tóxicos, y evitar así destinos no deseados para estos compuestos (Eck-enfelder, 1989). El carbono activado adsorbe orgánicos de todo tipo, es decir, volátiles, recalcitrantes, u orgánicos que se adhieren a fangos. Por lo tanto, el proceso PACT permite que las plantas de tratamiento puedan operar con un caudal afluente mayor, y ayuda a estabilizar el proceso frente a las cargas de choque de DBO o de orgánicos tóxicos en el afluente. Después del biorreactor, el polvo de carbono activo con compuestos orgánicos adsorbidos se sedimenta junto con los fangos en el decantador. Las plantas municipales que emplean el proceso PACT normalmente incineran la mezcla de fangos y carbono, destruyendo de esta forma los orgánicos adsorbidos. Una técnica alternativa de evacuación es la oxidación por aire húmedo, que provoca la solubilización o la destrucción de la biomasa, y una regeneración parcial del carbono. La mezcla fangos-carbono también se puede tratar mediante digestión anaerobia; en este caso, muchos de los compuestos orgánicos adsorbidos en el carbono se destruyen con la actividad microbiana metanogénica. El carbono se evacuaría con los fangos digeridos. Las concentraciones de carbono utilizadas normalmente en el proceso PACT están en torno a 20-200 mg/l (Metcalf y Eddy, 1991).

### Adsorción CAG/estabilización anaerobia

Una variante del proceso PACT, que ofrece una mayor flexibilidad operativa, es el proceso de tratamiento de *adsorción por carbono activado granular (CAG)/estabilización anaerobia*. Este proceso se puede aplicar especialmente al tratamiento de aguas residuales peligrosas, por ejemplo: aguas residuales industriales o lixiviados de vertederos, antes de su tratamiento convencional. El proceso implica dos procesos unitarios: (1) un tanque de mezcla CAG/agua residual, en el cual el afluente de un pretratamiento secundario pasa a través de un lecho CAG para separar los compuestos orgánicos solubles mediante adsorción, y (2) un biorreactor anaerobio, donde se coloca el CAG del tanque de mezcla para permitir la regeneración anaerobia del mismo. El carbono regenerado sustituye al carbono gastado en el tanque de mezcla, e, idealmente, durante su manipulación, las pérdidas de CAG serán limitadas. El proceso se ha ensayado a escala de laboratorio (Kupferle et al.,

1992) durante casi un año de operación continua. Los tiempos de retención para líquidos y CAG en la etapa de adsorción fueron de 30 min. y 2 días, respectivamente, y el tiempo de retención del CAG en el biorreactor anaerobio fue de 15 días. Se trató con éxito un agua residual compleja que contenía nueve compuestos orgánicos volátiles y cinco compuestos orgánicos semivolátiles. El grado de eliminación del clorobenceno, cloruro de metileno, TCE, dibutilftalato, y fenol fue de un 96, 50, 95, 66, y 85 por ciento, respectivamente.

### **Reactores biopelícula anaerobios**

Se sabe que los procesos microbianos anaerobios presentan varias ventajas importantes frente a los aerobios: (1) menor tasa de producción de fangos, (2) operatividad con una mayor DBO afluente y mayores niveles tóxicos, (3) ningún coste asociado con el suministro de oxígeno al reactor, y (4) generación de un producto secundario útil, el metano. Sin embargo, los procesos anaerobios presentan mayores gastos de inversión y operación que los aerobios, ya que los sistemas anaerobios deben permanecer cerrados y calientes. Por lo tanto, los procesos biológicos anaerobios para el tratamiento de aguas residuales peligrosas normalmente están limitados al tratamiento de flujos con bajas tasas, como por ejemplo: efluentes industriales, lixiviados de vertedero, aplicaciones tipo Superfondo. Boyle y Switzenbaum (1990) han estudiado la aplicabilidad de los procesos anaerobios al tratamiento de grandes volúmenes.

La tasa intrínseca de destrucción biológica de los orgánicos peligrosos en los sistemas anaerobios es más lenta que en los procesos aerobios; sin embargo, la tasa de destrucción global de un biorreactor anaerobio se puede maximizar mediante la inmovilización de la biomasa sobre un medio de soporte. Habitualmente, se utiliza un medio plástico muy poroso en un lecho compacto, o un CAG en una columna fluidizada.

El *reactor anaerobio CAG con lecho expandido* (Fig. 11.3) se ha mostrado ideal para el tratamiento de residuos que contienen mezclas de compuestos orgánicos fácilmente biodegradables y biológicamente refractarios. El medio CAG sirve para adherir a los constituyentes inhibitorios de la fase acuosa, permitiendo de esta forma el uso de los constituyentes fácilmente biodegradables. Cuando los constituyentes inhibitorios adsorbidos resisten la biodegradación, se puede poner en práctica una estrategia que implica la sustitución periódica de parte del CAG para reponer la capacidad de adsorción del CAG y convertir al residuo en biodegradable. Las características de adsorción del CAG permiten la retención de los orgánicos de biodegradación lenta. En estos casos, la capacidad de adsorción del CAG se puede ampliar indefinidamente debido a la regeneración promovida biológicamente. Se ha demostrado que el CAG tiene propiedades de acoplamiento microbiológico superiores a las que presentan otros medios en los lechos fluidizados (Khan et al., 1982; Gardner et al., 1988; Fox et al., 1990). Además, se ha demostrado que el CAG proporciona una resistencia a las cargas de choque y facilita la puesta en marcha de un sistema (Suidan et al., 1981; Khan et al., 1982).

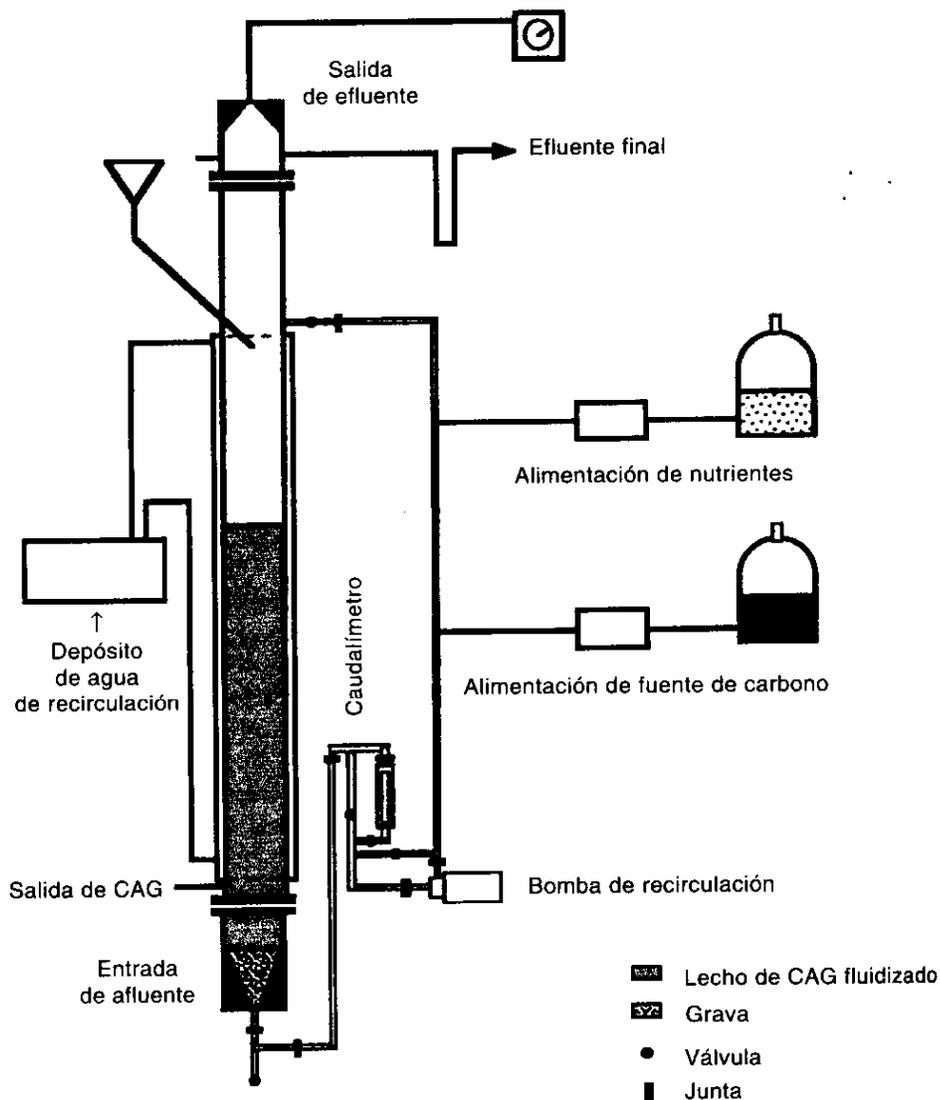


FIGURA 11.3. Reactor anaerobio CAG con lecho fluidizado.

El reactor anaerobio CAG de lecho expandido se ha mostrado muy eficaz en el tratamiento de varios residuos biológicamente inhibitorios, como por ejemplo: los baños de quitaesmaltes (Khan et al., 1982), las aguas residuales de gasificación del carbón (Nakhla et al., 1990) y los lixiviados de vertederos peligrosos (Schroeder et al., 1991). En la Tabla 11.10 se presentan datos que resumen el rendimiento observado en la eliminación de algunos compuestos problemáticos mediante este proceso.

**TABLA 11.10.** Rendimiento del lecho fluidizado anaerobio CAG (Schroeder et al., 1991)

Compuesto	Concentración afluente (mg/l)	Carga afluente (g/kg CAG/día)	Porcentaje de separación
Catecol	200-1.000	1,29-6,45	>99
Fenol	3-2.959	0,03-8,0	>97
<i>p</i> -cresol	70-280	0,19-0,76	>99
Indol	50-300	0,14-0,80	>99
Quinoleína	50-300	0,14-0,80	>99
<i>o</i> -clorofenol	2.000	4,0	>98
2,4-diclorofenol	400	0,8	>99,99
2,4,6-triclorofenol	150	0,3	>99,99
Di- <i>n</i> -butil ftalato	0,215-100	0,002-0,8	>83
Naftaleno	30	0,24	>99,9
<i>p</i> -Nitrofenol	100	0,8	>99,9
Nitrobenceno	0,5-100	0,005-0,8	>98
Lindano	10	0,08	>99,9
Acetona	10,0-755	0,10-4,0	>96
Metil-etil-cetona	12	0,10	>97
Metil-isobutil-cetona	10	0,01	>94
Tetracloroetileno	20	0,16	>99,99
Tricloroetileno	0,4	0,004	>98
Cloruro de metileno	1,2-20	0,01-0,16	>96
1,1,1-tricloroetano	20-400	0,04-0,8	>99,97
1,1-dicloroetano	0,1	0,001	>87
Tetracloruro de carbono	20	0,16	>99,9
Cloroformo	10-20	0,08-0,16	>97
Clorobenceno	1,1-20	0,01-0,16	>85
1,2,4-Triclorobenceno	0,2	0,002	>93
Etilbenceno	0,6	0,006	>86
Tolueno	8,2-20	0,08-0,16	>87

### Filtración biológica de la fase gas

Muchos procesos son capaces de generar fluidos gaseosos residuales que contienen compuestos orgánicos peligrosos. En el tratamiento de las aguas residuales, la evaporación mediante aireación (por arrastre) en el proceso secundario es el destino de muchos compuestos orgánicos volátiles (COVs) que entran en las plantas de tratamiento convencional. Las soluciones de bombeo y tratamiento para las aguas subterráneas contaminadas pueden requerir el arrastre por aire para limpiar los COVs; de esta forma, se genera un fluido gaseoso peligroso. Los procesos industriales a menudo emplean los COVs como reactivos o disolventes, y su uso puede

provocar un flujo de gas contaminado. En muchos países, y en Estados Unidos con la aprobación de las enmiendas de 1990 al Acta del Aire Limpio, se controla de forma estricta la emisión de compuestos tóxicos. El tratamiento biológico de los COVs en los gases residuales puede separar y destruir estos compuestos, y evitar así su emisión al medio ambiente. La alternativa más común, el tratamiento mediante adsorción en carbono activado, es costosa y, por sí misma, no da lugar a la destrucción de los contaminantes.

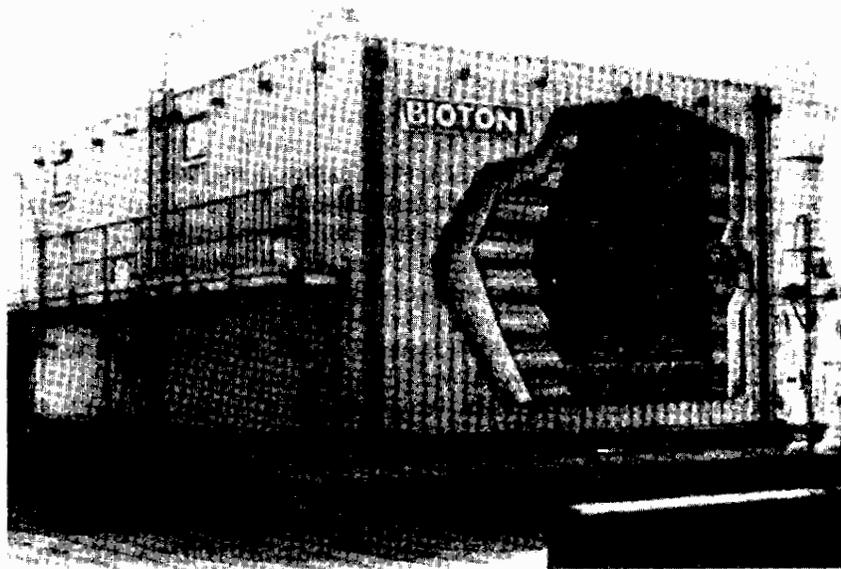
Históricamente, se ha utilizado el biotratamiento de la fase gaseosa para controlar los olores en las instalaciones de tratamiento convencional, donde el  $H_2S$  y otros gases olorosos se recogen y hacen pasar por un lecho de suelo o *compost* que contiene microorganismos (Carlson y Leiser, 1966; Metcalf y Eddy, Inc., 1991). Los tiempos de retención en los sistemas de control de olores pueden ser de tan sólo 15-30 s (ASCE, 1989).

La aplicación de biofiltros para la destrucción de los COVs actualmente es un área de desarrollo muy activa en Estados Unidos (Leson y Winer, 1991). En Alemania y Holanda, sin embargo, ya están funcionando hasta 500 biofiltros a escala real que tratan los gases procedentes de fuentes muy diversas, como fábricas de productos químicos, imprentas, plantas de cocción de pescados, plantas de tratamiento de aguas residuales industriales, y vertederos (Leson y Winer, 1991).

El diseño general de un biofiltro es el de un reactor de lecho con material de relleno. Sin embargo, existe poca o ninguna fase líquida (retención con líquidos) en el biofiltro; la mayor parte del volumen es un flujo de gas o un material sólido de soporte con microorganismos acoplados. El flujo líquido proporciona los nutrientes necesarios y la humedad a los microorganismos, aunque se utiliza turba o *compost* como soporte sólido, los nutrientes se pueden lixiviar directamente del soporte. En Europa, los biofiltros han seguido los diseños tradicionales utilizados para el control de olores, empleando lechos de suelo o de *compost*, horizontales y paralelos, de aproximadamente 1 m de altura (Leson y Winer, 1991). La mineralización del medio y el crecimiento celular excesivo, a menudo, requieren una mezcla periódica y la sustitución eventual del medio. Bohn (1992) constató una eliminación del 90 por ciento de los alcoholes y aldehídos en tiempos de residencia comprendidos entre 30 segundos y varios minutos.

En la Figura 11.4 se muestra una fotografía del diseño tradicional europeo de un biofiltro a escala real. El biofiltro mostrado es el sistema Bioton, construido por ClairTech b.v. en Holanda y comercializado en Estados Unidos por Ambient Engineering, Inc. ClairTech posee unidades en funcionamiento con tasas de flujo que alcanzan los 75.000  $m^3/h$ ; estas unidades tratan los gases de chimenea procedentes del tratamiento de aguas residuales con el fin de controlar los olores y los COVs (incluyendo el cloruro de metileno y el cloroformo).

Los diseños actuales de biofiltros en Estados Unidos han seguido muy de cerca los diseños europeos; sin embargo, se están investigando otros diseños que utilizan materiales de bajo mantenimiento, como CAG en lechos con material de relleno (Utkigar et al., 1991), o novedades en materia de soporte, como trozos de celita extrusionada (Govind et al., 1992).



**FIGURA 11.4.** Biofiltro Bioton. (Cortesía de Ambient Engineering, Inc., Matawan, N. J.)

## Conclusión

Aunque el tratamiento biológico del material residual orgánico haya sido estudiado durante más o menos un siglo, los nuevos retos en el tratamiento de aguas residuales, por ejemplo: el tratamiento biológico de los productos químicos peligrosos y las normas más estrictas sobre efluentes, siguen motivando el desarrollo de procesos nuevos e innovadores. Muchos de estos nuevos procesos se han descrito en este capítulo. Al mismo tiempo que aumenta nuestro conocimiento sobre los procesos fundamentales que tienen lugar en estos sistemas —metabolismo microbio-lógico de mezclas de productos químicos peligrosos, ecología de asociaciones microbianas, procesos de transporte en biopelículas, propiedades de adherencia de la biomasa a superficies sólidas, destino de los productos químicos tóxicos en los reactores—, también aumenta nuestra capacidad para diseñar bioprocesos rentables y con altos rendimientos.

## Renuncia

Este capítulo ha sido revisado y aprobado para su publicación siguiendo la política de revisión de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos. La men-

ción de productos comerciales no supone su aprobación ni recomendación de uso por parte de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos.

## Referencias bibliográficas

- American Society of Civil Engineers (ASCE). 1989. *Sulfide in Wastewater Collection and Treatment Systems*. ASCE Manuals and Reports on Engineering Practice No. 69, ASCE.
- Aryan, A. F., and S. H. Johnson. 1987. «Discussion Of: A Comparison of Trickling Filter Media». *J. Water Pollut. Contr. Fed.*, vol. 59, no. 10, pp. 180-183.
- Bailey, J. E., and D. F. Ollis. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd edition. Chapter 14. McGraw-Hill, New York.
- Barton, D. 1987. «Intermedia Transport of Organic Compounds in Biological Wastewater Treatment Process». *Environ. Progr.*, vol. 6, pp. 246-256.
- Bell, J. P., I. Osinga, and J. Meleer. 1988. *Investigation of Stripping of Volatile Organic Contaminants in Municipal Wastewater Treatment Systems, Phase I*. Ontario Ministry of the Environment, Ottawa.
- Bhattacharya, S. K., R. V. R. Angara, D. F. Bishop, Jr., R. A. Dobbs, and B. M. Austern. 1990. *Removal and Fate of RCRA and CERCLA Toxic Organic Pollutants in Wastewater Treatment*. U.S. EPA Project Summary, EPA-600/S2-89/026, Washington, D.C.
- Blackburn, J. W. 1987. «Prediction of Organic Chemical Fates in Biological Treatment Systems». *Environ. Progr.*, vol. 6, pp. 217-223.
- Bohn, H. 1992. «Consider Biofiltration for Decontaminating Gases». *Chem. Eng. Progr.*, April, pp. 34-40.
- Boyle, W. C., and M. S. Switzenbaum. 1990. «Anaerobic Treatment of Municipal Wastewaters: Status of the Technology-1990». Report for U.S. EPA Risk Reduction Engineering Laboratory, Cincinnati, under Contract No. 68-03-3429.
- Burns and Roe Industrial Services Corporation. 1982. «Fate of Priority Pollutants in Publicly-Owned Treatment Plants». *Final Report*, U.S. EPA Report 1440/1-82/303, Washington, D.C.
- Carlson, D. A., and C. P. Leiser. 1966. «Soil Beds for the Control of Sewage Odors». *J. Water Pollut. Contr. Fed.*, vol. 38, p. 829.
- Dobbs, R. A., L. Wang, and R. Govind. 1989. «Sorption of Toxic Organic Compounds on Wastewater Solids: Correlation with Fundamental Properties». *Environ. Sci. Technol.*, vol. 23, pp. 1092-1097.
- Eckenfelder, W. W., Jr., 1989. *Industrial Water Pollution Control*, 2nd edition. McGrawHill, New York.
- Federal Register (Fed. Reg.)*. 1988. «Secondary Treatment Regulation». 40 CFR Part 133, July 1.
- Federal Register (Fed. Reg.)*. 1989. «Amendment to the Secondary Treatment Regulations: Percent Removal Requirements during Dry Weather Periods for Treatment Works Served by Combined Sewers». 40 CFR Part 133, January 27.
- Fox, P., M. T. Suidan, and J. T. Bandy. 1990. «A Comparison of Media Types in Acetate Fed Expanded-Bed Anaerobic Reactors». *Water Res.*, vol. 7, no. 7, pp. 827-835.
- Gardner, D. A., M. T. Suidan, and H. A. Kobayashi. 1988. «Role of GAC Activity and Particle Size during the Fluidized-Bed Anaerobic Treatment of Refinery Sour Water Stripper Bottoms». *J. Water Pollut. Contr. Fed.*, vol. 60, no. 4, pp. 505-513.

- Govind, R., L. Lai, and R. Dobbs. 1991a. «Integrated Model for Predicting the Fate of Organics in Wastewater Treatment Plants.» *Environ. Progr.*, vol. 10, no. 1, pp. 13-23.
- Govind, R., P. A. Flaherty, and R. A. Dobbs. 1991b. «Fate and Effects of Semivolatile Organic Pollutants during Anaerobic Digestion of Sludge.» *Water Res.*, vol. 25, no. 1, pp. 547-556.
- Govind, R., V. Utkigar, Y. Shan, W. Zhao, G. D. Sayles, D. F. Bishop, and S. I. Safferman. 1992. «Development of a Novel Biofilter for Aerobic Biodegradation of Volatile Organic Compounds.» *18th Annual Risk Reduct. Engin. Lab. Res. Symp.: Abstract Proc.*, EPA/600/R-62/028.
- Hannah, S. A., B. M. Austern, A. E. Eralp, and R. H. Wise. 1986. «Comparative Removal of Toxic Pollutants by Six Wastewater Treatment Processes.» *J. Water Pollut. Contr. Fed.*, vol. 58, no. 1, pp. 27-34.
- Harrison, J. R., and G. T. Dagger. 1987. «A Comparison of Trickling Filter Media.» *J. Water Pollut. Contr. Fed.*, vol. 59, no. 7, pp. 276-283.
- Khan, K. A., M. T. Suidan, and W. H. Cross. 1982. «Role of Surface Active Media in Anaerobic Filters.» *J. Env. Eng., ASCE*, vol. 108, no. EE2, pp. 269-285.
- Kupferle, M. J., T. Chen, V. J. Gallardo, D. E. Lindberg, P. L. Bishop, D. F. Bishop, and S. I. Safferman. 1992. «Treatment of Dilute Hazardous Waste Streams by Sorption/Anaerobic Stabilization.» *18th Annual Risk Reduct. Engin. Lab. Res. Symp.: Abstract Proc.*, EPA/600/R-62/028.
- Leson, G., and A. M. Winer. 1991. «Biofiltration: An Innovative Air Pollution Control Technology for VOC Emission.» *J. Air Waste Manage. Assoc.*, vol. 41, no. 8, pp. 1045-1054.
- Mancini, J. L., and E. L. Barnhart. 1968. «Industrial Treatment in Aerated Lagoons.» In *Advances in Water Quality Improvement*. Edited by E. F. Gloyna and W. W. Eckenfelder, Jr., University of Texas Press, Austin.
- Metcalf and Eddy Inc. 1991. *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse*, 3rd edition. Edited by G. Tchobanoglous and F. L. Burton. McGraw-Hill, New York.
- Middlebrooks, E. J., C. H. Middlebrooks, J. H. Reynolds, G. Z. Waters, C. S. Reed, and D. B. George. 1982. *Wastewater Stabilization Lagoon Design, Performance and Upgrading*. Macmillan, New York.
- Nakhla, G. F., M. T. Suidan, and J. T. Pfeffer. 1990. «Control of Anaerobic GAC Reactors Treating Inhibitory Wastewaters.» *J. Water Pollut. Contr. Fed.*, vol. 62, no. 1, pp. 65-72.
- Namkung, E., and B. E. Rittmann. 1987. «Estimating Volatile Organic Compound Emissions from Publicly-Owned Treatment Works.» *J. Water Pollut. Contr. Fed.*, vol. 59, pp. 670-678.
- Petrasek, A. C., I. J. Kugelman, B. M. Austern, T. A. Pressley, L. A. Winslow, and R. H. Wise. 1983. «Fate of Toxic Organic Compounds in Wastewater Treatment Plants.» *J. Water Pollut. Contr. Fed.*, vol. 55, no. 10, pp. 1286-1296.
- Schroeder, A. T., M. T. Suidan, R. Nath, E. R. Krishnan, and R. C. Brenner. 1991. «Carbon-Assisted Anaerobic Treatment of Hazardous Leachates.» *Proc. of the 17th Annual RREL Haz. Waste Res. Symp.*, pp. 626-648.
- Stall, T. R., and J. H. Sherrard. 1978. «Evaluation of Control Parameters for the Activated Sludge Process.» *J. Water Pollut. Contr. Fed.*, vol. 56, no. 4, pp. 336-345.
- Suidan, M. T., W. H. Cross, M. Fong, and J. W. Calvert, Jr. 1981. «Anaerobic Carbon Filter for Degradation of Phenols.» *J. Env. Eng., ASCE*, vol. 107, no. EE3, pp. 563-579.
- Thayer, A. M. 1992. «Pollution Reduction.» *Chem. Eng. News*, vol. 70, no. 46, pp. 22-52.

- Thirumurthi, D. 1969. «Design of Waste Stabilization Ponds», *J. San. Eng. Div., ASCE*, vol. 95, no. SA2, pp. 516-523.
- Thompson, D., J. Bell, H. Melcer, and J. Kemp. 1990. *Investigation of Stripping of Volatile Organic Contaminants in Municipal Wastewater Treatment Systems, Phase II*. Ontario Ministry of the Environment, Ottawa.
- U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 1984a. *Review of Current RBC Performance and Design Procedures*. EPA-600/2-85-033, Washington, D.C.
- U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 1984b. *Summary of Design Information on Rotating Biological Contactors*. EPA-430/9-64-008, Washington, D.C.
- U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 1989. *Assessment of Needed Publicly Owned Treatment Facilities in the United States, 1988 Needs Survey Report to Congress*. EPA-430/09-89-0-001, Washington, D.C.
- Utkigar, V., Y. Shan, and R. Govind. 1991. «Biodegradation of Volatile Organic Compounds in Aerobic and Anaerobic Biofilters». *Proc. 17th Annual RREL Hazard. Waste Res. Symp.*, EPA/600/9-91/002.
- Water Pollution Control Federation (WPCF). 1987. *Activated Sludge. Manual of Practice OM-9*.

# Capítulo 12

## CUESTIONES REGLAMENTARIAS Y DE EFICACIA EN LA BIORRECUPERACIÓN DE LOS DERRAMES DE PETRÓLEO: EXPERIENCIAS CON EL DERRAME DEL *EXXON* *VALDEZ* EN ALASKA

---

**P. H. Pritchard**

*Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos  
Laboratorio de Investigación Ambiental  
Sabine Island, Gulf Breeze, Florida*

### **Resumen**

El uso de la biorrecuperación como tecnología adicional para la limpieza del derrame de petróleo del *Exxon Valdez*, en Prince William Sound, Alaska, ha sido un buen ejemplo de los problemas y éxitos que presenta la aplicación de esta tecnología. Los estudios de campo llevados a cabo por los científicos de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos han demostrado que se podía acelerar la degradación del petróleo realizada por la microflora autóctona de las playas de Prince William Sound añadiendo fertilizante directamente a las playas contaminadas con petróleo. Los resultados que hemos obtenido en la aplicación de un fertilizante oleofílico se presentan como ejemplos de trabajos de campo y de laboratorio. El fertilizante aumentó la biodegradación del petróleo, que fue aproximadamente

el doble que en las zonas no tratadas, tal y como se puede comprobar por los cambios en la composición del petróleo y el peso bruto del petróleo por unidad de material de playa.

Los estudios realizados apoyaron el uso de la biorrecuperación como alternativa de limpieza y, posteriormente, Exxon la utilizó a gran escala. Estos estudios ofrecieron también algunas lecciones poco agradables, pero relevantes para los esfuerzos futuros en la biorrecuperación del petróleo. Este capítulo trata estas lecciones y examina los problemas y dificultades que presenta la evaluación del rendimiento de la biorrecuperación en este campo.

Estudios de campo posteriores realizados en una playa contaminada con petróleo (que contenía menos material energético y mayores cantidades de materia orgánica no petrolífera), en los que se utilizó un granulado fertilizante de emisión lenta aplicado a diferentes concentraciones, mostraron el escaso efecto que producía la aplicación del fertilizante. Se discuten también las precauciones que se deben tomar para extrapolar resultados desde trabajos de laboratorio hasta trabajos de campo, o desde una zona real a otra.

Como sucede con muchos tipos de biorrecuperación, es necesario contar con protocolos para generar series de datos uniformes y relevantes que permitan tomar decisiones correctas en relación al uso del proceso o producto adecuado en una operación real de limpieza. La base conceptual de estos protocolos es un asunto complicado y su desarrollo recibe la influencia de las experiencias reales, como el derrame de petróleo del *Exxon Valdez*. La discusión de estos conceptos proporciona el marco de los problemas y suposiciones que surgen cuando hay que decidir sobre cuándo y cómo se aplica una tecnología de biorrecuperación.

El uso de la biorrecuperación para la limpieza de suelos, sedimentos, y acuíferos contaminados con hidrocarburos del petróleo y aceite es un hecho ampliamente aceptado (Lee y Levy, Bortha y Pramer). El éxito ha sido posible gracias a la biodegradabilidad relativa del petróleo y a que los degradadores de hidrocarburos pueden ser enriquecidos en muchos, si no en la mayoría, de los ambientes (Levy, Atlas). Además, la biorrecuperación está ganando terreno como tecnología viable; si se utiliza con prudencia, puede proporcionar una limpieza eficaz, poco costosa y ambientalmente segura de los productos químicos residuales. Por lo tanto, cuando se sugirió usar la biorrecuperación a modo de herramienta adicional para la limpieza del derrame del *Exxon Valdez*, en Prince William Sound, Alaska, se aceptó rápidamente como una tecnología nueva lista para una demostración real (Pritchard y Costa). La implantación de estudios de campo con el objeto de establecer que se podía acelerar significativamente la degradación del petróleo por la acción de la microflora autóctona en las playas de Prince William Sound mediante la aplicación de un fertilizante, y la aplicación final de fertilizantes a gran escala por parte de Exxon, proporcionó varias lecciones y experiencias útiles que, si se consideran en un contexto correcto, pueden tener una influencia considerable sobre el futuro de la biorrecuperación del petróleo.

Este capítulo se centrará en algunas de las dificultades y de los problemas asociados a la aplicación de fertilizantes, y en el efecto de éstos sobre la degradación del petróleo. Fundamentalmente, se tratará la aplicación de un fertilizante oleofili-

co en una zona llamada Snug Harbor, en Knight, Prince William Sound, y la aplicación lenta de granulados de fertilizante que se llevó a cabo en Disk Island, Prince William Sound. Estas aplicaciones proporcionan unos resultados opuestos e instructivos, tanto en lo que se refiere al éxito como al fracaso. (Nota: se realizaron aplicaciones adicionales de fertilizantes en estas y otras zonas, y existen resúmenes de los resultados; Pritchard et al., 1991.)

Asociadas a estas aplicaciones de fertilizantes en trabajos de campo están las cuestiones relativas a qué productos comerciales se deben utilizar, y cómo se deben elegir los mejores. Esto incluye no solamente los fertilizantes, sino también, los microorganismos y otros agentes y conceptos estimuladores de la biodegradación. En Alaska, muchos de estos productos comerciales no podían ser considerados debido al poco tiempo del que se disponía para realizar demostraciones en trabajos de campo, pero también porque los datos existentes para cada producto eran tan variados y/o insuficientes que no se podían realizar elecciones razonables en el tiempo adecuado. Sin embargo, después del derrame del *Exxon Valdez*, la Oficina de Investigación y Desarrollo de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) empezó a desarrollar una serie de protocolos de rendimiento y de ensayos medioambientales seguros con el objetivo de establecer una base de datos uniforme y relevante que posibilitase en el futuro el uso de productos comerciales concretos. Algunos de estos protocolos ya se han desarrollado y están siendo validados mediante estudios de laboratorio. El desarrollo de una base conceptual para estos protocolos se ha mostrado como un ejercicio útil, y depende en gran medida de las lecciones aprendidas en Alaska y en otros derrames de petróleo. La descripción parcial de dicho desarrollo conceptual sirve aquí para comprender mejor las complicaciones reglamentarias que entran en juego a la hora de aplicar la biorrecuperación a la limpieza del petróleo. Espero que esta información ayude a que otros consideren cuidadosamente el proceso mediante el cual van a medir en el trabajo de campo el éxito de la biorrecuperación. Es esta cuestión del éxito, junto con los aspectos de seguridad ambiental, la clave para una buena toma de decisiones.

## Introducción

En cualquier trabajo de biorrecuperación, el éxito invariablemente implicará una demostración científica válida de la eficacia del proceso y de su seguridad ambiental. Eficacia, en el caso de la biorrecuperación del petróleo, significa que (1) la separación o desaparición del petróleo se produce gracias a la biodegradación, y no es atribuible a otros procesos no biológicos, y (2) las tasas de biodegradación del petróleo son mayores que las tasas naturales, es decir, lo suficientemente altas como para justificar el esfuerzo que supone la implantación del proceso de biorrecuperación a gran escala. Aunque aquí no se plantearán las cuestiones de seguridad ambiental, se deben considerar en profundidad para verificar que no se va a producir ningún efecto ecológico adverso por la aplicación del fertilizante.

En el derrame del *Exxon Valdez*, ambos aspectos fueron cruciales para que el

público y las agencias reglamentarias estatales y federales aceptasen finalmente la biorrecuperación. Controlar el excepticismo, dadas las «sutilezas» de la biotecnología, ha sido y seguirá siendo un reto en casi cualquier caso de biorrecuperación, para el petróleo u otros productos químicos. Las cuestiones de eficacia y de seguridad ambiental que se plantearon en Prince William Sound, donde el tratamiento se concentró en playas de grava y guijarros contaminadas con petróleo, por supuesto, son muy diferentes a las que se pueden plantear en playas de arena, marismas y zonas húmedas contaminadas con petróleo. Sin embargo, la enseñanza extraída en términos de cómo demostrar una tecnología de limpieza viable no tendrá este tipo de limitaciones.

Las suposiciones iniciales de los científicos de EPA y sus colaboradores, cuando se comenzó a planificar el proyecto, dieron lugar a unas revelaciones importantes y útiles. Varias suposiciones, discutidas en relación a lo que realmente ocurrió en los trabajos de campo, proporcionaron una serie de enseñanzas instructivas que podrían influir en las respuestas dadas a la biorrecuperación en otros derrames de petróleo. ¡Aunque la confianza que dan casi veinte años acumulando datos de investigación sobre la biodegradación del petróleo sirvió de base para estas suposiciones, habríamos sido ingenuos si no hubiésemos esperado ninguna sorpresa!

### **Enriquecimiento de las comunidades microbianas degradadoras de petróleo**

Evidentemente, era razonable esperar, incluso en las aguas frías de Alaska, un aumento importante de la población de microorganismos degradadores de petróleo en las playas después de su exposición a este producto. La investigación, realizada por Atlas y sus colaboradores, apoyó esta idea (Atlas, 1981). Al final, para principios de junio de 1989 (aproximadamente dos meses después del derrame), la concentración de degradadores del petróleo estaba en torno a  $10^6$ /g de material de playa, lo que suponía un incremento de hasta 10.000 veces el número de degradadores en comparación con las playas no contaminadas con petróleo. Los estudios llevados a cabo por Lindstrom et al. (1991) han mostrado tendencias similares, y en la Tabla 12.1 se muestra un ejemplo de los resultados. Un enriquecimiento de esta magnitud sugería que el petróleo se estaba degradando (estudios previos habían demostrado que el petróleo de Prudhoe Bay era muy biodegradable), que había nitrógeno y fósforo suficientes para soportar el crecimiento de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, y que las bajas temperaturas (10-16 °C) no eran demasiado estrictas para la microflora autóctona. La información no solamente implicaba la posibilidad de una biodegradación limitada por el nitrógeno (es decir, un exceso de carbono orgánico degradable procedente del petróleo frente a un suministro limitado de nitrógeno en el agua), sino que además habría la posibilidad de acelerar la biodegradación del petróleo mediante la superación de este único obstáculo.

En este caso, creímos que era innecesario volver a verificar experimentalmente en el laboratorio, incluso utilizando muestras de las playas contaminadas con petróleo de Prince William Sound, el efecto estimulador del nitrógeno para la bio-

**TABLA 12.1.** Medianas ( $n = 5$  a 9 muestras) de microorganismos MPN degradadores de hidrocarburos por gramo (peso seco) de sedimento para las zonas tratadas (T) y de referencia (R)\*

Zona de playa	Día de muestreo	Mediana de células MPN ( $10^4$ ) por g de sedimento superficial		¿Dife- rente?†	Mediana de células MPN ( $10^4$ ) por g de sedimento superficial		¿Dife- rente?†
		T	R		T	R	
KN-135B	0	2,62	4,24	No	1,66	1,63	No
	2	4,79	1,58	No	1,02	0,47	No
	4	15,50	4,20	No	10,30	1,00	Sí
	8	1,56	15,60	No	10,10	2,27	No
	15	15,60	9,75	No	16,20	2,34	No
	52	13,70	23,40	No	75,40	36,00	No
	56	139,00	17,90	Sí	582,00	9,78	Sí
	70	149,00	25,20	Sí	126,00	13,00	Sí
78	185,00	122,00	No	170,00	117,00	No	
KN-211B	0	0,96	4,63	No	4,60	1,63	No
	2	77,00	127,00	No	193,00	2,23	Sí
	4	9,55	48,00	No	81,93	80,35	No
	16	45,40	44,44	No	46,22	97,49	No
	31	23,94	98,78	No	99,80	24,95	No
	45	30,83	53,23	No	33,18	25,32	No
	102	18,10	8,51	No	3,72	0,96	No
	112	3,19	11,70	No	8,51	1,28	Sí
KN-132B	0	24,90	23,00	No			
	2	155,00	21,70	No			
	4	77,70	16,00	No			
	8	160,00	37,10	No			
	16	97,30	15,70	Sí			
	29	28,00	16,00	No			
	43	135,00	0,59	Sí			
	60	84,10	1,78	Sí			
95	117,00	53,20	Sí				

\* Todos los valores obtenidos cada día estuvieron sujetos a un ensayo U Mann-Whitney de dos muestras para determinar si las poblaciones muestreadas eran diferentes a un nivel de confianza del 95 por ciento. KN-135B se trató inicialmente después del día 0 y se refertilizó después del día 52. KN211B se trató inicialmente después del día 0 y se refertilizó el día 42. KN132B se fertilizó después del día 0 y de nuevo el día 40.

† Se presentan las diferencias estadísticamente significativas para los sedimentos superficiales y subsuperficiales.

degradación del petróleo, ya que experiencias previas y numerosos informes publicados en la literatura sobre el tema apoyaban esta idea. En cambio, si pensábamos que, debido a la magnitud del problema en ese momento, era mejor ir directamente al trabajo de campo y llevar a cabo una demostración práctica del principio. Por lo tanto, en las primeras etapas del programa de limpieza del derrame en Alaska, la medición relativamente sencilla del número de degradadores del petróleo, junto con la información relevante disponible sobre el tema, proporcionaron un indicador razonable de «primera línea» en relación a la efectividad de la biorrecuperación del petróleo.

### **Ensayo de mineralización como indicador de la actividad degradadora del petróleo**

Según la situación medioambiental implicada en el derrame de petróleo, puede ser deseable contar con una serie de indicadores de primera línea sobre el potencial de biorrecuperación. Siempre existe la tendencia, cuando se implica al público local, de generar una información específica del medio, al menos para lograr un mayor grado de confort. Merece la pena, por lo tanto, tratar estos temas aquí, aunque no se utilizasen inicialmente en Alaska. Probablemente, en otros derrames se darán una serie de circunstancias en las que no será suficiente, para la toma de decisiones, el contar con una información sobre el enriquecimiento de los degradadores del petróleo solamente en las zonas contaminadas.

Los estudios de mineralización que implican la medición del  $\text{CO}_2$  total producido pueden proporcionar una excelente información de primera línea. La aproximación proporciona datos temporales rápidos y relativamente inequívocos aptos para proceder al ensayo de diferentes alternativas de tratamiento (p. ej., efectos al añadir nitrógeno). Si se produce una degradación natural del petróleo en el material de la playa contaminada, entonces, se generarán unas considerables cantidades de  $\text{CO}_2$  debido a la mineralización del petróleo. Para este tipo de mediciones se pueden utilizar varios sistemas de laboratorio. Los sistemas con medidores (Bartha y Pramer, 1965), diseñados para atrapar el  $\text{CO}_2$  en brazos laterales que contienen una disolución alcalina, se pueden adaptar para medir estas tasas de mineralización en el material contaminado (Mueller et al., 1992). También se pueden utilizar sistemas respirométricos comerciales, como el Micro-Oxymax™ (Columbus Instruments, Columbus, Ohio). El sistema Micro-Oxymax™, adaptable a los matraces estándar de laboratorio, mide también el consumo de oxígeno. El procedimiento implica colocar el material contaminado procedente de la playa (una mezcla de arena y grava en el caso de Prince William Sound), y su comunidad microbiana asociada, directamente en los matraces, e introducir y sacar agua de mar fresca para simular el cambio de mareas (Mueller et al., 1992). En la Figura 12.1 se muestra un ejemplo de los datos generados mediante este tipo de ensayo de mineralización. Este experimento se realizó con material contaminado procedente de la playa de Prince William Sound, material obtenido tiempo después del comienzo de nuestra demostración de biorrecuperación en el trabajo de campo. El método que utiliza el matraz respirométrico es indicativo de los ensayos que se pueden llevar a cabo

como ejercicio de toma de datos para un derrame de petróleo en particular. Destaca el efecto de aumento que provoca el añadir fertilizante de nitrógeno (Fig. 12.1). Comparando las tasas de producción de CO<sub>2</sub>, se puede obtener una estimación del aumento que se produce en la biodegradación del petróleo. El sistema se puede adaptar fácilmente para el ensayo del material de playa procedente de otros derrames de petróleo.

Como cualquier otro tipo de materia orgánica presente en la playa también puede generar CO<sub>2</sub>, hay que tomar las debidas precauciones para asegurarse de que se está midiendo la mineralización del petróleo. Además de trabajar con matrazes de control que contengan material de playa no contaminado, tal y como se

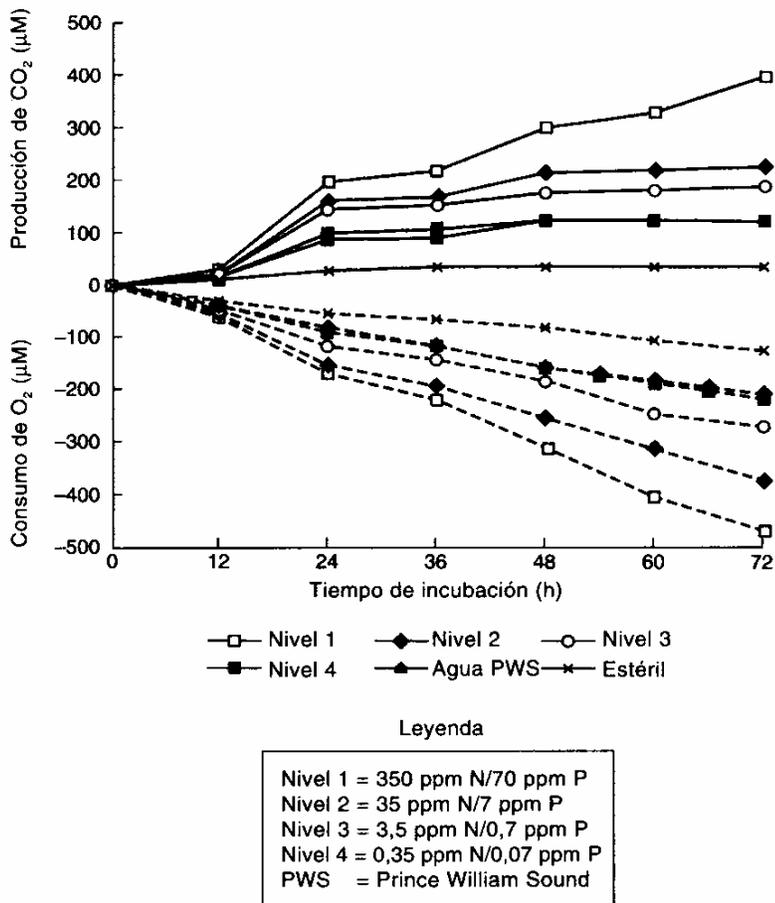


FIGURA 12.1. Actividad del fertilizante (consumo de O<sub>2</sub>, producción de CO<sub>2</sub>) para seis tratamientos.

indicó anteriormente (sin o con la adición de nutrientes de nitrógeno), para comprobar que la mineralización en presencia de petróleo es mayor que la que se produce normalmente en el ambiente, también se puede añadir un hidrocarburo radioetiquetado. Si se activa la degradación del petróleo, la producción de CO<sub>2</sub> radioetiquetado debería ser significativa e inmediata. Hemos descubierto que el fenantreno funciona bien porque es adsorbido por el suelo rápida y completamente (Mueller et al., 1992; Pritchard et al., 1991). El ciclo de mareas lavó cualquier fenantreno que quedase en la fase acuosa, y la producción posterior de CO<sub>2</sub> se debió principalmente a las comunidades bacterianas asociadas a las superficies de petróleo.

### **Biorrecuperación de derrames de petróleo como paso final**

También hicimos la suposición inicial, muy importante, de que la biorrecuperación sería más eficaz como paso final del programa de limpieza. Tal y como sucedió, el lavado físico realizado por Exxon consiguió quitar el grueso del petróleo, pero dejó las playas bastante contaminadas, con una baja calidad estética, y con petróleo ecológicamente disponible. Como había pocas alternativas disponibles, la biorrecuperación llegó a ser admitida como paso final. Sin la separación inicial del grueso del petróleo, la biorrecuperación no hubiese sido factible en el contexto de Alaska. Es decir, incluso con una biodegradación activa del petróleo, fundamentalmente se trata de un fenómeno de superficie, y tardaría mucho tiempo en completarse (en Alaska, existe una posibilidad de período relativamente corto en los meses de verano, cuando las temperaturas del agua permiten una buena biodegradación del petróleo). Para acelerar el proceso, primero hay que distribuir el petróleo por todo el material de la playa, con el fin de incrementar la relación superficie-volumen. Y como el volteo no era razonable en la mayoría de las playas de guijarros de Alaska, cuanto más petróleo se separase físicamente y cuanto más petróleo residual se pudiese dispersar en el material de playa, como se logró con el lavado físico, más eficaz sería la biorrecuperación. Para otros tipos de materiales de playa será necesario establecer una serie de consideraciones similares.

En las playas altamente porosas, como las de Prince William Sound, el petróleo se difunde en parte entre la grava, con lo que aumenta la superficie contaminada. El lavado físico puede incrementar este proceso. Sin embargo, con un litoral de arena o barro, donde la porosidad es mucho más baja, la mayor parte del petróleo se concentrará preferentemente en la superficie. Inicialmente, el material contaminado se puede separar muy bien físicamente. Pero el material contaminado que quede se podrá tratar de forma eficaz mediante biorrecuperación, de nuevo como paso final. En este caso, se puede utilizar el volteo para dispersar más el petróleo restante entre el material de la playa, aumentando así la relación superficie-volumen, y mejorando las posibilidades de éxito de la biorrecuperación. El volteo también consigue airear el material de playa y ayuda a diseminar los fertilizantes añadidos, de esta forma, se evita que la disponibilidad de oxígeno o de nutrientes inorgánicos se convierta en un factor limitante para la biorrecuperación. En Alaska la limitación de oxígeno nunca llegó a ser algo a considerar, debido a la

naturaleza altamente porosa de las playas, las altas concentraciones de oxígeno en el agua fría de mar, y el efecto de lavado de las mareas de 5 m.

### Elección de formulaciones de fertilizantes

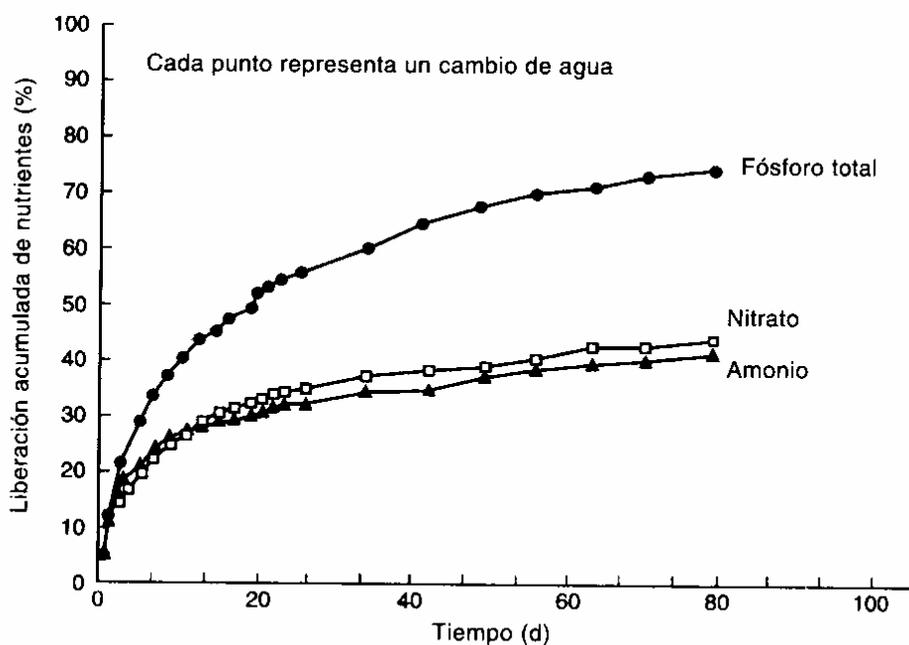
Se suponía que en las playas de Alaska se debía aplicar nitrógeno (y fósforo), de forma que las comunidades microbianas degradadoras del petróleo quedasen expuestas pasivamente a unas elevadas concentraciones de nutrientes durante un período de tiempo amplio. Dado el gran ciclo de mareas y la importante acción de las olas, los fertilizantes que se colocasen sobre la superficie de la playa probablemente desaparecerían en unos pocos días. Para superar este problema, se consideraron inicialmente dos tipos de fertilizantes de emisión lenta: dosificaciones sólidas en forma de grano y dosificaciones oleofílicas líquidas. En la Tabla 12.2 se resumen las características de cada fertilizante considerado.

Sería relevante resumir algunos de los criterios utilizados para realizar las elecciones, ya que esto podría ayudar en las elecciones futuras de fertilizantes. Los

**TABLA 12.2.** Descripción de los fertilizantes sometidos a ensayos

	Nombre comercial		
	Woodace	Customblen	Inipol EAP 22
Fabricante	Vigoro Industries	Sierra Chemical Co.	Elf Aquataine
Forma	Briqueta	Grano	Líquido
Tamaño	5 × 5 × 5 cm	2- a 3-mm diám.	—
Fuente de N	Isobutiraldehído-diurea	Nitrato de amoníaco	Urea
N:P:K	14:3:3	28:8:0	7,3:2,8:0
Gravedad específica	1,8	1,8	0,996 g/ml
Viscosidad	—	—	250 cSt
Tasa de aplicación en parcelas de 12m × 35 m	986 g/m <sup>2</sup>	100 g/m <sup>2</sup>	284 g/m <sup>2</sup>
Método de aplicación	Bolsas (11,8 kg c.u.)	Distribuidor de fertilizante	Rociador portátil
Zonas de ensayo	Snug Harbor	Snug Harbor Passage Cove	Snug Harbor Passage Cove

tres criterios principales fueron: (1) facilidad de aplicación y potencial para mantener su posición en la playa, (2) características de emisión de nutrientes, (3) resistencia física. Al final, los granos fertilizantes parecían encajar mejor en estos criterios (Pritchard et al., 1991). Eran fáciles de aplicar sobre una gran superficie y se pegaban muy bien al material de playa contaminado con petróleo; además, se podían introducir bajo los guijarros, de donde era difícil desalojarlos. Las características de emisión de nutrientes, establecidas mediante unos sencillos sistemas de ensayo en el laboratorio (Venosa et al., 1990; Glaser et al., 1991), mostraron que la mayor parte de la emisión de nitrógeno (amoniaco y nitrito) y de fósforo (fosfato) procedente de los granos tenía lugar en las primeras 24-72 h (Fig. 12.2). Sin embargo, se siguieron emitiendo cantidades constantemente durante mucho tiempo después. Por lo tanto, mientras las mareas entraban y salían de las playas, los nutrientes se distribuían entre las comunidades microbianas asociadas al petróleo durante un período de 2-3 semanas o más. Aunque la condición física de los granos se deterioró lentamente por el contacto con el agua de mar, observamos sobre la playa granos que tenían fertilizante transcurridas 2-3 semanas desde su aplicación. Al final, Exxon utilizó los granos de fertilizante en combinación con el fertilizante oleofílico líquido para todas las operaciones a gran escala en Prince William Sound.



**FIGURA 12.2.** Liberación acumulada de amonio y nitrato a partir de los granos SIERRA CHEMICAL en equipos de matraz estático.

Las briquetas de fertilizantes también dieron resultados satisfactorios en base a los criterios anteriores (Venosa et al., 1990). Estas briquetas son aproximadamente del tamaño de las briquetas de carbón vegetal, y contienen fuentes orgánicas de nitrógeno y fósforo que se hidrolizan lentamente por emitir urea y fósforo durante un período de tiempo. Las emisiones de nutrientes de las briquetas fueron muy similares a las conseguidas mediante los granos. Aunque las briquetas mantenían mucho mejor su integridad física, desaparecían sobre la superficie de la playa, es decir, eran fáciles de mover por la acción de las mareas y olas, provocando unas distribuciones muy heterogéneas. Por ello, se tenían que empaquetar en bolsas de red y asegurar a la playa mediante estacas metálicas. Aunque esto era eficaz, presentó importantes problemas logísticos cuando se planteó a gran escala. No obstante, las briquetas se utilizaron como parte de nuestra demostración de biorrecuperación en el trabajo de campo, y se mostraron eficaces a la hora de aumentar la biodegradación del petróleo (Pritchard et al., 1991).

En vez de distribuir los granos y briquetas de fertilizante sobre la superficie de la playa, también se pueden enterrar en la misma, pongamos por ejemplo, en zanjas paralelas al litoral en la zona contaminada intermareal. Según la porosidad de las playas, las mareas y el movimiento del agua podrían distribuir eficazmente los nutrientes entre las bacterias. Debido a la integridad física de las briquetas, serían más aptas para este tipo de aplicación. En Alaska, el enterramiento se consideró inicialmente, pero no se probó, de nuevo debido a las restricciones que se percibían de tipo logístico (posteriormente sin fundamento). Sin embargo, Exxon y el Estado de Nueva York aplicaron granos de fertilizante siguiendo este método en una playa de arena contaminada con gasóleo en Prall's Island (localizada en un estuario al suroeste de la Ciudad de Nueva York). Los primeros informes (Madden, 1991) mostraron que la aplicación tuvo éxito y logró aumentar la biodegradación del gasóleo. La distribución de nutrientes, por supuesto, depende de la hidrodinámica de las aguas en la playa, y, en muchos casos, no se contará con una información específica relacionada con esta cuestión. En vez de proceder según estos éxitos limitados, se podría realizar fácilmente un estudio piloto de varios días de duración con el fin de medir los movimientos reales de los nutrientes en las aguas (Madden, 1991).

Desde un punto de vista práctico, el mejor criterio para determinar cuánto fertilizante de emisión lenta se debe colocar en una playa dada, fue aplicar el máximo posible sin exceder las concentraciones tóxicas de amonio y/o nitrato. Estos nutrientes son tóxicos (96 h,  $LC_{50}$ ) para los invertebrados marinos (un buen bioensayo para la mayoría de las especies sensibles) en concentraciones acuáticas en torno a 10-15 ppm (Pritchard et al., 1991). Nuestra experiencia ha demostrado que se llegará al umbral de efectos ambientales adversos mucho antes de que se sature la demanda de nitrógeno de las comunidades microbianas degradadoras del petróleo. Se debe tener en cuenta, respecto al umbral del efecto tóxico, la gran emisión inicial de nutrientes que se produce con las dosis de fertilizantes mencionadas. Por otra parte, es complejo determinar la tasa de aplicación del fertilizante en base a la cantidad de petróleo presente en el ambiente, ya que el petróleo se distribuye y concentra de forma muy heterogénea en la zona afectada.

### Fertilizante oleofílico

El concepto de fertilizante oleofílico se basa en el uso de fuentes orgánicas de nitrógeno y fósforo en un portador líquido que se puede mezclar con el petróleo. En teoría, cuando se aplica el portador líquido, los nutrientes se disuelven en el petróleo, y, de esta forma, se ponen en contacto durante largos períodos de tiempo con las bacterias que crecen sobre la superficie del petróleo. Se han probado con éxito, tanto en el laboratorio como en los experimentos de campo a pequeña escala, varios tipos de fertilizantes oleofílicos. La mayor parte de estos fertilizantes se diseñaron y probaron para tratar petróleo sobre superficies de agua, y no sobre material de playa. Unos estudios pioneros llevados a cabo por Atlas y Bartha (Atlas y Bartha, 1973), demostraron que la adición de urea parafinizada y de octilfosfato al petróleo de Prudhoe Bay, petróleo que se encontraba sobre la superficie del agua, aumentaba de forma significativa la biodegradación del crudo. Se ha informado de éxitos similares con un producto comercial, el Victawet 12, o fosfato de óxido 2-etilhexil-dipolietileno (Bergstein y Vestal, 1978); con varias fuentes naturales de nitrógeno y fósforo lipofílicos, como lecitina de soja y etil alofanato (Olivieri et al., 1978); y con  $MgNH_4PO_4$  incorporado a una base de apoyo de parafina (Olivieri et al., 1976). La aplicación de estos productos quizás se haya visto limitada por las inquietudes que se plantean con algunos mecanismos específicos cuando se hace aumentar la velocidad de degradación del petróleo; por los factores que inciden sobre las tasas de emisión física de los nutrientes *in situ*; y por los efectos que se pueden producir al añadir grandes cantidades de carbono orgánico al petróleo. Además, varios informes mostraron pocas diferencias entre la degradación del petróleo potenciada por fertilizantes oleofílicos o normales (Lee y Levy, Halmo). Por lo tanto, aún no se ha establecido claramente qué ventajas lleva consigo la utilización de fertilizantes oleofílicos. No obstante, el concepto de fertilizante oleofílico era inquietante para nosotros, dado que se trataba del método más utilizado a la hora de colocar nutrientes directamente en contacto con las comunidades microbianas, y, por lo tanto, parecía justificado el realizar más ensayos en los trabajos de campo.

Seleccionamos el fertilizante oleofílico Inipol EAP 22, producido por Elf Aquitaine Company en Francia, ya que era la única fuente comercial disponible con una gran capacidad de producción inmediata. Este producto es una microemulsión estable formada por un corazón de urea (fuente del nitrógeno) rodeado por un portador de ácido oleico. El laurilfosfato (surfactante y fuente de fósforo) actúa como estabilizante de la emulsión, y el 2-butoxietanol (metil celosolve) reduce la viscosidad. Esta dosificación se ha mostrado prometedora en los ensayos llevados a cabo en el laboratorio y en grandes depósitos exteriores, en estos ensayos se han utilizado diferentes tipos de materiales contaminados procedentes de playas y de lugares medioambientalmente distintos (Lee y Levy, 1987; Sveum y Ladousse, 1989; Tramier y Sirvins, 1983). Se obtuvieron unos interesantes resultados en una playa contaminada con petróleo en Spitsbergen, Noruega (Sveum y Ladousse, 1987); según estas pruebas parecía que el Inipol incrementaba las tasas de degradación del petróleo cuando se aplicaba a material de playas de grava gruesa pero no cuan-

do se aplicaba a material de playa de arena fina. Según estos estudios, el Inipol tenía un gran potencial para la biorrecuperación. Cuando se aplicó Inipol a una mezcla de grava y arena contaminada con petróleo procedente de Prince William Sound, en unos estudios de laboratorio diseñados para realizar una inmersión intermitente en agua de mar, aproximadamente el 60 por ciento de la urea (medida como nitrógeno total Kjeldahl, NTK) salió a los pocos minutos de la aplicación (Tabla 12.3). Las mediciones del fósforo total mostraron un porcentaje similar. Después de 6 horas de la primera inmersión se obtuvieron los mismos resultados que después de 5 minutos, lo cual sugería que el Inipol «fraguaba» muy rápido. Sin embargo, después de esta explosión inicial de NTK y fósforo, esencialmente, no había ninguna emisión de estos materiales. Presumiblemente, el nitrógeno y fósforo residuales, aunque fuertemente sujetos al material de playa contaminado con petróleo, de hecho, se encontraban disponibles para las bacterias que estaban degradando el petróleo. Demostrar experimentalmente esta disponibilidad era difícil, tal y como se discute a continuación.

La aplicación de Inipol en Prince William Sound se llevó a cabo inicialmente mediante un aspersor portátil que permitiese extender una capa fina sobre el material de playa contaminado con petróleo (Pritchard et al., 1991). Las capas se podían controlar porque el petróleo aparecía mojado y de un color negro más oscuro después de cubrirlo con Inipol. Este efecto visual desaparecía varias horas después de la aplicación. Cuando Exxon usó Inipol a gran escala, se aplicó en una cantidad aproximada de 0,3 l/m<sup>2</sup>, cifra basada en gran medida en la cobertura superficial obtenida en nuestro proyecto de demostración.

**Cambios visuales.** Las playas de ensayo de Snug Harbour, donde se aplicó Inipol como parte de una demostración de campo para probar su efectividad, ofrecieron algunos resultados visuales sorprendentes (Pritchard y Costa, 1991). Estas playas estaban moderadamente contaminadas con petróleo y no habían sido sometidas al proceso de lavado físico en el momento de nuestro ensayo. Fueron elegidas como representativas de aquellas que no recibieron lavado físico. Visualmente, las zonas de guijarros tenían una capa fina de petróleo viscoso que cubría las piedras, y una zona de arena y grava por debajo de los guijarros. El petróleo no penetraba más de unos pocos centímetros por debajo de la superficie de grava. En algunas zonas, se podían encontrar pequeños parches gruesos de petróleo y *mousse* (mezcla de petróleo/agua/aire en forma de coloide).

Aproximadamente, unos 10-14 días después de aplicar el fertilizante oleofílico, la reducción de la cantidad de petróleo sobre las piedras fue visualmente aparente. El cambio fue especialmente evidente en las observaciones aéreas, donde se puso de manifiesto que el contraste con las restantes zonas contaminadas era dramático, dando lugar a un rectángulo «limpio» (12 × 28 m) sobre la superficie de la playa. El contraste también fue impresionante a nivel del suelo; había una línea precisa entre las zonas tratadas y no tratadas con fertilizante. En este momento, las zonas de control no tratadas no habían cambiado visualmente.

Un examen más de cerca mostró que gran parte del petróleo había desaparecido de la superficie de los guijarros, sin embargo, quedaron importantes cantidades

**TABLA 12.3.** Emisión de amonio, nitrógeno total Kjeldahl (NTK) y fósforo total (PT) a partir del inipol EAP 22 durante un experimento de inmersión intermitente

Minutos desde el comienzo del experimento	Tiempo de contacto 5 minutos *	Tiempo de contacto 6 horas *
Amonio emitido (mg N/l)†		
5	1,1	0,5
15	1,1	0,4
30	1,4	0,5
60	1,3	0,7
120	1,4	0,7
510 <sup>^</sup>	0,2	
540	0,1	
600	0,0	
FT emitido (mg P/l)		
5	1,3	1,4
15	1,2	1,2
30	1,0	1,1
60	1,5	1,3
120	1,0	1,0
510 <sup>^</sup>	1,1	
540	0,9	
600	0,9	
NKT emitido (mg N/l)†		
5	24,6	29,8
15	26,1	34,8
30	27,2	35,5
60	32,5	34,3
120	29,4	32,3
510 <sup>^</sup>	4,6	
540	4,6	
600	4,3	

\* Tiempo entre la aplicación del fertilizante y la inmersión inicial.

† Concentración inicial de nitrógeno = 57 mg/l.

<sup>^</sup> Se drenó el agua, el material de playa quedó fuera del agua durante 6 horas; se puso de nuevo el agua de mar.

de petróleo debajo de los guijarros, en la mezcla inferior de arena y grava. El petróleo que permanecía no era seco y mate como el petróleo de las playas de control no tratadas, sino más blando y mojado. También era muy viscoso al tacto, sin tendencia a separarse de las piedras. Cuando se realizaron estas observaciones, no se vio salir de la playa con las mareas ninguna marea negra de petróleo ni materiales petrolíferos.

Nosotros pensábamos que la desaparición visual del petróleo sobre los guijarros, 2-3 semanas después de la aplicación de Inipol, se debía fundamentalmente a la biodegradación y no a un fenómeno de lavado químico. Los datos químicos que apoyan esta creencia se presentan a continuación. Además, intentamos forzar los efectos del lavado químico añadiendo repetidamente grandes concentraciones de Inipol sobre varias zonas pequeñas en Snug Harbour, y no afectó a la eliminación del petróleo; era necesario un período de al menos 2-3 semanas para poder ver cualquier efecto de «lavado» independientemente de la cantidad de Inipol dada. La aplicación de disoluciones acuosas fertilizantes (probadas en otra playa), que contenían sólo productos químicos inorgánicos y no materiales orgánicos tipo surfactante, también producía el efecto de «limpieza» más o menos en el mismo período de tiempo, apoyando aún más la idea de la biodegradación (Pritchard et al., 1991). Finalmente, algunos experimentos realizados por investigadores de Exxon (R. Prince, S. Hinton, y J. Bragg, mediante comunicados personales) han mostrado que, en unos ensayos especiales diseñados para medir la efectividad de diversos productos comerciales de limpieza de rocas, el Inipol no era eficaz. También, observaron, en estudios de microcosmos, que el Inipol parecía llegar a asociarse más estrechamente con el material de playa; es decir, el petróleo tenía mucha más tendencia a moverse hacia las paredes de vidrio de los microcosmos en ausencia del Inipol.

Después de 6-8 semanas desde la aplicación del fertilizante, había bajado el contraste entre las zonas tratadas y no tratadas en la playa de guijarros. Probablemente, este descenso del contraste se debió a la subida a la superficie del petróleo desde el material contaminado debajo de la superficie en la zona tratada con Inipol, y/o a la lenta eliminación del petróleo sobre la superficie de la playa que rodeaba las zonas tratadas. A finales del verano, la zona utilizada para los estudios de biorrecuperación llegó a estar más limpia, incluyendo las zonas de control. Varias tormentas y un incremento de las lluvias, así como la biodegradación natural, contribuyeron sin duda a estos cambios.

Globalmente, la rápida desaparición del petróleo provocada por la aplicación del fertilizante oleofílico hizo que estas playas fuesen más compatibles con la fauna local (menor tendencia a que la fauna local padeciese las manchas de petróleo en piel y plumas). Estos importantes cambios sucedieron en un período de tiempo más corto que los cambios limitados en zonas no tratadas, y posiblemente ayudaron a acelerar la recuperación biológica de la zona intermareal.

## **Medición del rendimiento**

Obtener información definitiva sobre el papel de la biodegradación en la separación de residuos de petróleo en el material de playa, o de hecho, sobre cualquier matriz ambiental compleja, es una tarea difícil. Por lo general, para la biorrecuperación de derrames de petróleo, se debe producir tanta información cualitativa sobre los cambios en la composición del petróleo —indicativos de los procesos biológicos—, como información cuantitativa en relación a las tasas de degradación

del petróleo, o de algunos de sus hidrocarburos, lo que también es indicativo de los procesos biológicos que se están desarrollando. La información cualitativa establece el alcance de la biodegradación; sin embargo, cuando se cuenta con una mezcla química compleja, como sucedía en el caso del petróleo de Prudhoe Bay, lo deseable es lograr la eliminación de algo más que unos pocos hidrocarburos de cadena corta (que suponen sólo un pequeño porcentaje del petróleo), o la fracción alifática del petróleo (es decir, se trataría de no dejar atrás los hidrocarburos aromáticos, heterocíclicos y ramificados, los productos químicos polares, etc.).

De forma simultánea, una información cuantitativa que estableciese que el aumento de la biodegradación del petróleo mediante tratamientos con fertilizantes era suficiente como para merecer una operación a gran escala, generalmente un aumento del doble o triple sobre los controles no tratados, probablemente sería aceptable para muchos ejecutivos y grupos reglamentarios, aunque esta decisión no se asentase sobre una base de datos global. De todos modos, ambos tipos de informaciones fueron difíciles de obtener en los trabajos de campo debido a los numerosos problemas que se plantearon.

Cualquier programa de ensayo sobre biorrecuperación que se base en técnicas analíticas que impliquen la desaparición de residuos de petróleo o de hidrocarburos medidos mediante cromatografía gaseosa, está abierto a críticas científicas porque existen varios procesos (incluyendo: fotosíntesis, disolución física, lavado químico, volatilidad, etc.) que pueden afectar o contribuir a la desaparición de los residuos. Para hacer frente a estas posibles críticas, elegimos una aproximación que integraba varios procedimientos analíticos con diversas suposiciones clave. En primer lugar, supusimos que la desaparición de algunos grupos de hidrocarburos se podía utilizar como indicador definitivo de la biodegradación. Además, suponíamos que los indicadores de la biodegradación estarían asociados a cambios sustanciales en la composición de varias fracciones del petróleo, especialmente hidrocarburos aromáticos. Por lo tanto, atribuimos estos cambios composicionales a la biodegradación.

En segundo lugar, supusimos que si se pudiese establecer una correlación entre los cambios en la composición de los hidrocarburos y los cambios en el peso residual del petróleo, entonces, se podrían emplear las tasas de desaparición de los pesos residuales como primer indicativo cuantitativo del efecto del fertilizante. Después, esta información se podría emplear para estimar la eficacia de la limpieza durante períodos de tiempo más amplios.

Sin embargo, hay que tratar la razón por la cual se eligieron estos parámetros ya que los criterios sobre lo que constituye la biodegradación del petróleo son complejos y controvertidos. Muchos estudios han considerado que la reducción de la concentración de hidrocarburos alifáticos es, en general, un indicativo de la biodegradación, pero su valor a menudo se cuestiona, ya que estos hidrocarburos son: (1) con frecuencia, la fracción más fácil de biodegradar, (2) los menos tóxicos, y (3) a menudo solamente suponen un pequeño porcentaje (en peso) del petróleo. Medir los cambios composicionales de la fracción aromática añade una dimensión más, ya que estos hidrocarburos son menos propensos a biodegradarse y, potencialmente, más tóxicos de forma crónica. Sin embargo, la mayor parte de los pro-

cedimientos más comunes utilizados para medir los hidrocarburos aromáticos se basan en el análisis espectral de masas, este análisis se concentra en tan sólo 10-20 compuestos seleccionados, lo que supone una fracción muy pequeña de los aromáticos totales. No se ha establecido aún si estos hidrocarburos aromáticos seleccionados son buenos representantes de la degradación que se produce en el resto de los compuestos aromáticos. Sin embargo, si se presta atención tan sólo a los hidrocarburos aromáticos y se comprueba que se degradan, existe la ventaja de poder suponer que también se degradarán ampliamente los hidrocarburos alifáticos.

Independientemente de los cambios composicionales parece razonable exigir que la biodegradación, como herramienta de limpieza óptima, debería lograr la eliminación de la mayor parte del material; los cambios en la composición sin eliminación del petróleo residual sólo son una parte de la cuestión. Además, la biodegradación del petróleo en las condiciones óptimas del laboratorio da lugar a una reducción del 40-60 por ciento del peso total del petróleo (Atlas y Bartha, 1973), y, por lo tanto, sería razonable esperar que se produjese alguna reducción del petróleo residual en las condiciones de campo. La última forma de medir la biodegradación consiste en dividir el petróleo en diversas fracciones: alifática, aromática, heterocíclica, polar y asfáltica, y determinar la reducción en peso de cada una de ellas. Estas fracciones se pueden analizar generalmente mediante cromatografía de gases para determinar los cambios de composición. Este procedimiento analítico ha sido utilizado por Westbake y sus colaboradores en varios estudios (Jobson et al., 1972).

### **Cambios en las relaciones alcanos normales a alcanos ramificados**

Los resultados obtenidos en Alaska para el fertilizante oleofílico son instructivos a la hora de proporcionar una perspectiva que permita medir el rendimiento de la biorrecuperación en los trabajos de campo. El análisis químico del material de playa contaminado con petróleo, expuesto y no expuesto al fertilizante oleofílico, se realizó recogiendo el material de playa según un diseño de bloque (21 muestras tomadas en cada momento del muestreo, 7 en cada bloque contiguo a lo largo de una línea en las zonas de pleamar, media, y bajamar de la playa) y, después, extrayendo muestras (con cloruro de metileno) de la superficie de los guijarros y de la mezcla de arena y grava por debajo de ellos. El peso del petróleo recuperado (medido en mg/g de material de playa) se determinó gravimétricamente, y se estableció su composición inyectando extractos en un cromatógrafo de gases según procedimientos analíticos normalizados (Pritchard et al. 1991).

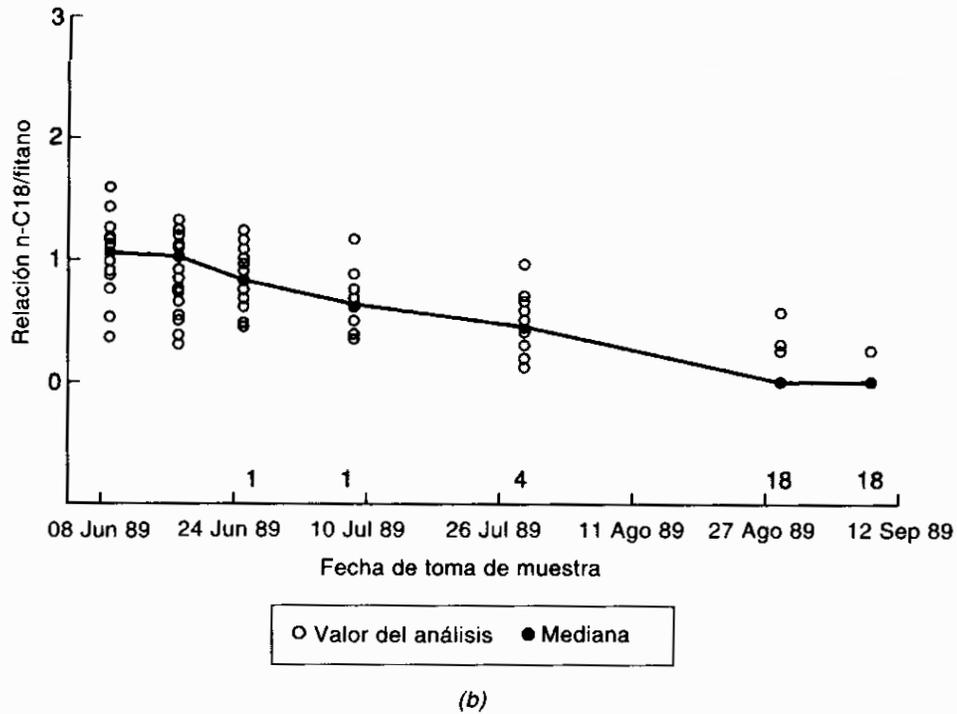
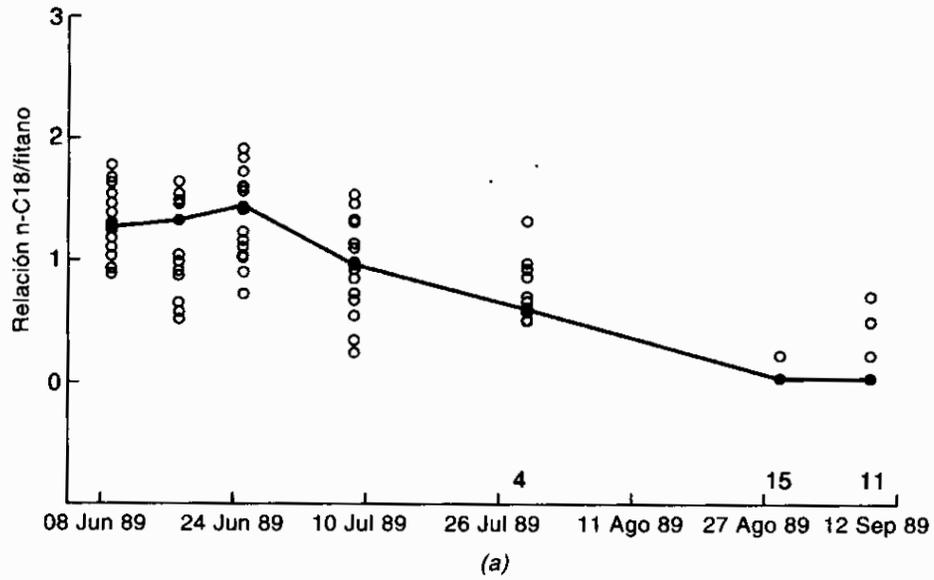
Los cambios en la composición se determinaron examinando primero los alcanos determinables. Históricamente, esto se ha realizado mediante el cálculo de la relación en peso entre un hidrocarburo de biodegradación fácil conocida (generalmente los alcanos normales C17 y C18) y un hidrocarburo que se biodegrade más lentamente (generalmente los alcanos ramificados pristano y fitano, con tiempos de retención cromatográficos muy similares a los alcanos n-C17 y n-C18) (Atlas). Nosotros nos centramos principalmente en la relación n-C18/fitano, ya que en oca-

siones se encuentra pristano de forma natural en el agua del mar. El concepto de relaciones se basa en la idea de que la mayoría de los procesos no biológicos de destino (erosión física, evaporación, lixiviación, etc.) no darán lugar a pérdidas significativas de hidrocarburos alifáticos y ramificados que tienen comportamientos cromatográficos y químicos similares. Este concepto se apoya en algunos estudios biogeoquímicos realizados sobre el petróleo (Kennicutt, 1988). Sin embargo, como los alcanos ramificados, de hecho, se biodegradan (Prinik et al., 1977; Mueller et al., 1992), solamente se tienen que degradar más lentamente que los alcanos lineales para aprovechar el método de relación.

Centrándonos en los efectos del fertilizante oleofílico Inipol EAP™22, los resultados de la Figura 12.3a muestran que, después de un retraso inicial, se produjo una gran degradación en la relación n-C18/fitano para las muestras de guijarros. También se produjo una degradación en la playa de control no tratada, pero a una velocidad de aproximadamente la mitad de la velocidad de biodegradación de la playa tratada con fertilizante (Fig. 12.3b). A pesar de la gran variabilidad alrededor de los valores de las medianas, las pendientes de las curvas de degradación (siguiendo la muestra del 17 de junio, y sin incluir la muestra del 9 de septiembre) eran estadísticamente diferentes a cero, y de una a otra, con un intervalo de confianza del 95 por ciento. Según las suposiciones anteriormente descritas sobre el significado de los cambios en la relación, se produjo la biodegradación en ambas playas, y aumentó por la aplicación del fertilizante. Hay que destacar que el petróleo ya había sufrido una biodegradación antes de la aplicación del fertilizante, ya que la relación para el petróleo de Prudhoe Bay erosionado y no degradado estaba en torno a 2,0. Además, los grandes descensos de las relaciones invariablemente estuvieron relacionados con una considerable reducción, si no eliminación completa, de los alcanos analizados mediante cromatografía de gases, del n-C17 al n-C30.

La gran variabilidad de las relaciones mostradas en la Figura 12.3 (es decir, algunas muestras dieron evidencia de una gran biodegradación mientras otras evidenciaron muy poca) estaba relacionada con la distribución altamente heterogénea del petróleo en la playa. Posiblemente, sobre la superficie de la playa se producía la misma biodegradación, pero el muestreo aleatorio (casi inevitable en este caso) necesariamente englobaba suficientes cantidades de petróleo no degradado procedente de debajo de la superficie como para diluir la medida de biodegradación.

En la mezcla de arena y grava por debajo de los guijarros se dio un cambio mucho menor o inexistente en la relación n-C18/fitano, tanto para la playa tratada con fertilizante oleofílico como para la playa de control no tratada (Figs. 12.4a y 12.4b). Igual de sorprendente, sin embargo, fue la diferencia inesperada en la relación inicial entre las muestras de la superficie de guijarros y las muestras de la mezcla de arena y grava (considerando  $t = 0$ , el muestreo del 8 de junio de 1989). En ambos casos, se había producido una biodegradación sustancial del petróleo antes de aplicar el fertilizante, pero era mucho más pronunciada en las muestras de arena y grava mezcladas. No estaba claro el porqué de esta relación menor. Quizás la biodegradación era más aparente debido a una menor disolución del petróleo no degradado durante el muestreo.



**FIGURA 12.3.** Cambios en las relaciones n-C18/fitano en las playas de gujarros tratadas y de control.

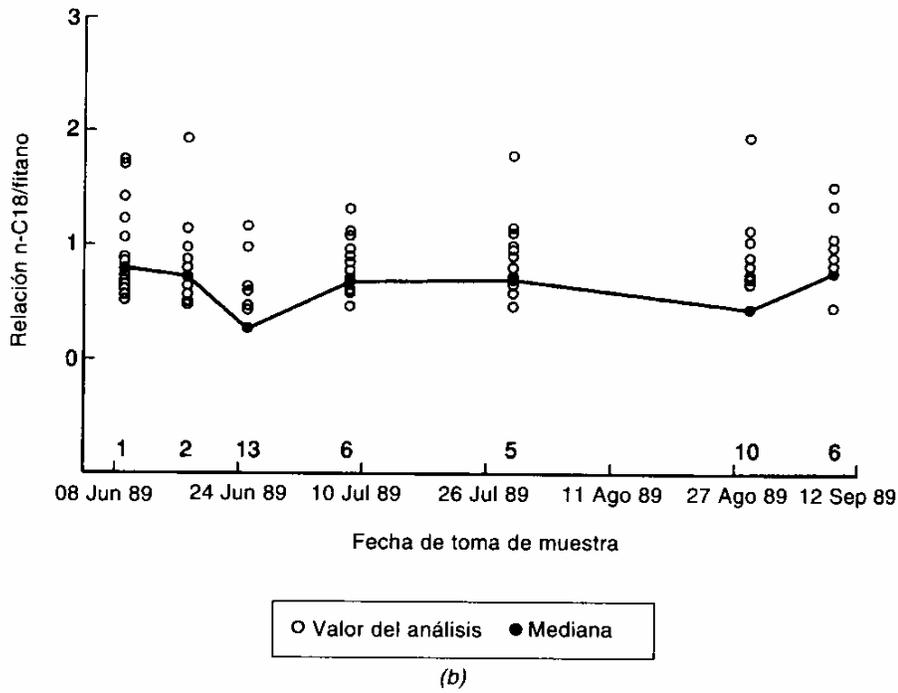
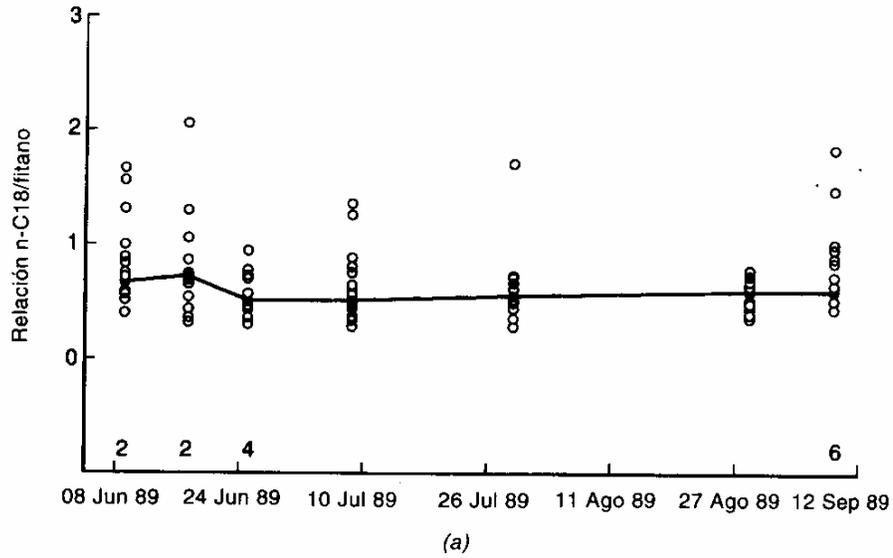
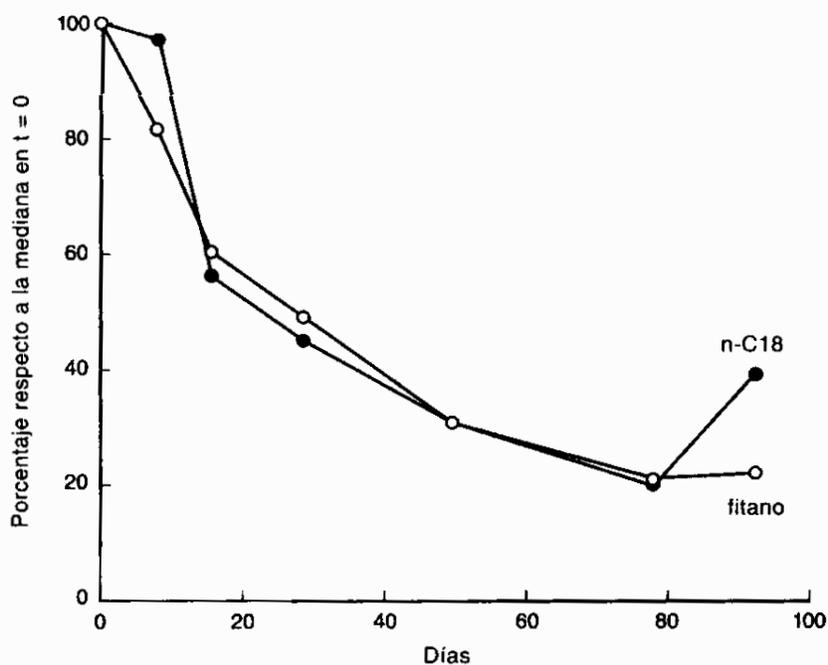


FIGURA 12.4. Cambios en las relaciones n-C18/fitano en las playas de arena y grava tratadas y de control.

### Biodegradación del fitano

Siguiendo la lógica establecida anteriormente, la ausencia de un cambio en la relación n-C18/fitano para las muestras de arena y grava mezclada sugirió que no se estaba dando una biodegradación del petróleo a pesar de su estado degradado antes de la aplicación del fertilizante. La baja relación inicial puede limitar la observación de los cambios. Sin embargo, parte de este efecto se puede explicar mediante otro proceso. Un examen del propio fitano en la mezcla de arena y grava debajo de los guijarros en la playa tratada con Inipol mostró que su degradación era tan rápida como la del alcano n-C18 (Fig. 12.5). Por lo tanto, o la biodegradación no tenía lugar (es decir, algún proceso no biológico estaba separando ambos hidrocarburos de forma simultánea), o el fitano se estaba degradando tan rápido como el n-C18. La degradación del fitano no es común, pero existe (Pirink et al., 1977; Mueller et al., 1992), y se aislaron fácilmente microorganismos degradadores de fitano en las playas de Prince William Sound. Por lo tanto, las comunidades microbianas de las playas de Alaska pueden tener una gran capacidad de degrada-



**FIGURA 12.5.** Cambios en la concentración de fitano y n-C18 (expresado como cambio porcentual en relación a la concentración media a  $t = 0$ ) en las muestras de petróleo en la arena y grava mezcladas (bajo los guijarros) de las playas tratadas con Inipol en Snug Harbour.

ción de los alcanos ramificados, y en ese caso se comprende el concepto de usar fitano como marcador biológico interno. Las muestras tomadas de los guijarros también evidenciaron con el tiempo un importante descenso del fitano, pero a una velocidad menor que el n-C18.

Por otra parte, los resultados obtenidos en las muestras de arena y grava extraídas de debajo de los guijarros sugirieron la posibilidad de que el Inipol estuviese actuando de forma química (efecto surfactante) para separar los hidrocarburos alifáticos y ramificados. Sin embargo, el n-C18 y el fitano desaparecieron a la misma velocidad que en las muestras de arena y grava tomadas en la playa de control (datos no mostrados). Como no existía la posibilidad de un efecto químico en la playa de control, hay que deducir que la separación del fitano se debió principalmente a la biodegradación.

### **Cambios de composición en los hidrocarburos aromáticos**

En este momento se puede concluir que se produjo una biodegradación de la fracción alifática del petróleo en las muestras tomadas en la superficie de guijarros, y, posiblemente, también en las muestras de arena y grava. Tal y como se mencionó anteriormente, creemos que la biodegradación de la fracción alifática no es suficiente en sí misma como para poder hablar de una biorrecuperación efectiva. Otra aproximación para examinar la biorrecuperación global del petróleo consiste en realizar una espectroscopia de masas como detector en la separación del cromatógrafo de gases (EM/CG). Utilizando este método se pueden examinar diversos hidrocarburos aromáticos que quizás son más difíciles de degradar que los alifáticos (Kennicutt, 1988; Rowland et al., 1986). Esto es importante no sólo porque se sigue la huella de otra fracción degradable del petróleo, sino porque se sabe que algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) son precancerígenos bajo ciertas condiciones. Por lo tanto, si se observa su eliminación, se está constatando una reducción de los posibles efectos ecológicos adversos. Si esta cuestión de toxicidad es realmente relevante o no (debido a que se trata de escenarios de exposición improbables) se tomó como un factor a considerar en las evaluaciones de efectividad. Además, como la baja solubilidad de los HPAs los hace difíciles de degradar, se pueden emplear para medir el alcance de la degradación del petróleo. En la Tabla 12.4 se muestra el análisis espectral de masas de diversos hidrocarburos aromáticos y heterocíclicos de varias muestras de petróleo con relaciones n-C18/fitano y concentraciones de hidrocarburos alifáticos muy reducidas. Los hidrocarburos aromáticos seleccionados representan un grupo de homólogos metil-sustitutos con un peso molecular cercano a una estructura química conocida. Los valores de la tabla se comparan con el hopano (17 alfa, 21 beta), alcano cíclico multianillo (C30). El hopano y sus homólogos, bastante resistentes al ataque biológico, han sido utilizados durante algún tiempo por los geoquímicos como biomarcadores internos conservados en el petróleo (Kennicutt, 1988). Sin embargo, a diferencia del caso de la relación n-C18/fitano, los cambios relativos no se pueden atribuir a la biodegradación con tanta confianza; la descomposición diferencial entre un hidrocarburo y el hopano podría deberse a procesos no biológicos, ya que

**TABLA 12.4.** Concentraciones relativas (mediana\* y desviación típica) de los hidrocarburos aromáticos, heterocíclicos y cíclicos comparados con el hopano

	<b>Petróleo de Prudhoe Bay</b>	<b>Playa no fertilizada</b>	<b>Playa fertilizada</b>
n-C18	52,9	1,14 (1,43)	0,96 (0,78)
Fitano	28,3	13,80 (2,30)	6,63 (3,63)
C3/Naftalenos	31,9	0,15 (0,13)	0,08 (0,04)
C3/Fluorenos	5,30	1,74 (0,38)	1,01 (0,89)
C3/Fenantrenos	10,0	5,40 (0,25)	3,36 (1,35)
Dibenzotiofeno	5,93	0,07 (0,03)	0,04 (0,03)
C3/Dibenzotiofeno	9,49	5,34 (0,64)	3,42 (1,43)
Crisenos	1,22	0,89 (0,04)	0,71 (0,17)
C3/Crisenos	2,49	1,13 (0,22)	1,03 (0,44)
Norhopano	0,56	0,62 (0,93)	0,59 (0,06)
Estearanos	5,5	5,91 (0,50)	5,15 (0,42)

\* N = 8; seleccionado aleatoriamente del muestreo del 7/29/89; todas las muestras son 50 miligramos de petróleo residual por mililitro extraído.

es posible que exista una menor similitud química entre el hidrocarburo objetivo y el hopano. No obstante, el hopano proporciona un estándar constante para normalizar las concentraciones de los hidrocarburos aromáticos.

En la Tabla 12.4, la diferencia relativa de cantidad en cada grupo de homólogos de las muestras de petróleo de la playa de Prudhoe Bay indica el grado de cambio en la composición que tuvo lugar en las muestras de playa. Las muestras de playa tratadas con Inipol, con muy bajas relaciones n-C18/fitano, mostraron también grandes cambios en muchos de los hidrocarburos aromáticos. El norhopano y los estearanos son tan resistentes a la biodegradación como el hopano, y su permanencia apoya el concepto de hopano como marcador biológico interno. De nuevo, no hay forma explícita de asegurar que los cambios de los hidrocarburos aromáticos y heterocíclicos se deban a la biodegradación, pero la posibilidad es grande. De hecho, algunos de los HPAs de mayor peso molecular probablemente no pueden verse afectados por los procesos químicos y físicos, y, por lo tanto, la biodegradación puede ser el único mecanismo que pueda explicar su desaparición. Además, estas muestras se tomaron en la playa aproximadamente 78 días después de la aplicación del fertilizante Inipol; cualquier efecto químico residual del fertilizante que pudiese provocar estos cambios en la composición era igual de improbable.

Si suponemos que los procesos no biológicos (como, por ejemplo: lixiviación o disolución) separan grupos de hidrocarburos aromáticos según su solubilidad, los más solubles se separarán primero, entonces, cualquier excepción a esta tendencia se podría atribuir a la biodegradación, ya que la solubilidad no es la única característica que determina la susceptibilidad al ataque biológico. Un examen de

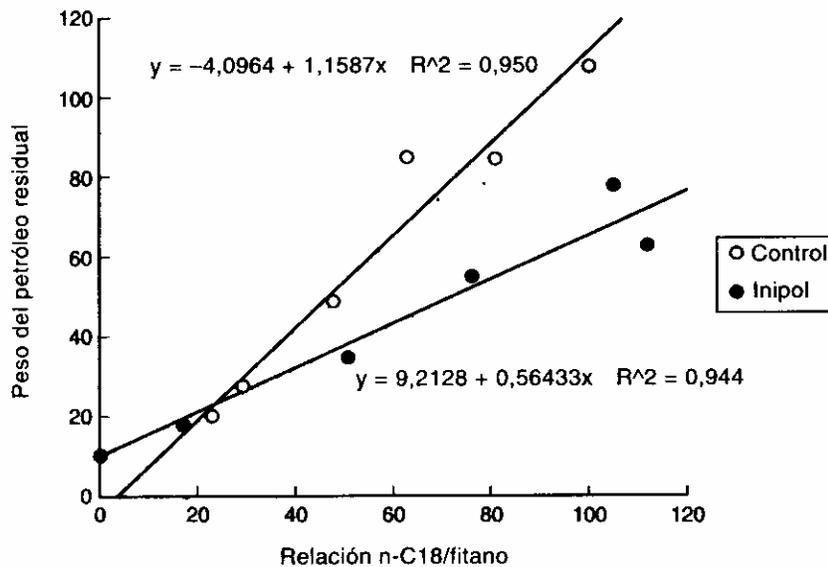
la Tabla 12.4 muestra que existen varios casos en los que los descensos de las concentraciones de hidrocarburos aromáticos en las muestras de campo (relativas al petróleo de Prudhoe Bay) son mayores para los hidrocarburos menos solubles. Por ejemplo, había un mayor descenso en C3-crisenos del que había en el propio criseno, y había un mayor descenso en C3-fluorenos del que había en C3-fenantenos. Aunque estas diferencias podrían ser consecuencia del muestreo y/o análisis, la biodegradación es el único proceso en el que este efecto diferencial es una posibilidad. Por lo tanto, en la mayoría de las muestras en las que se produjo una biodegradación sustancial del petróleo (tal y como se mide por las relaciones n-C18/fitano), también se produjo un descenso concomitante en muchos de los hidrocarburos aromáticos de peso molecular alto.

### **Relación entre el cambio de composición y el cambio en el peso residual**

El siguiente paso era establecer una relación entre los cambios de composición y la pérdida de residuos petrolíferos. Una correlación positiva apoyaba la idea de que la pérdida de residuos de petróleo se debía a los procesos de biodegradación. En la Figura 12.6 se muestran los cambios en el peso residual frente a los cambios en la relación n-C18/fitano. Es evidente la existencia de una correlación positiva. Los resultados son interesantes ya que se podría producir una rápida reducción en la relación sin un cambio significativo en el peso residual del petróleo. Sin embargo, éste no era el caso, y podemos concluir que una vez que comienza la descomposición de la fracción alifática, también se inicia la biodegradación de muchas otras fracciones del petróleo, a velocidades diferentes.

En este momento se puede obtener una buena información cuantitativa sobre la biodegradación. Como la velocidad de descomposición del petróleo residual parece ser de primer orden, se puede calcular la vida media del petróleo (Tabla 12.5). La aplicación de fertilizante oleofílico provocó un incremento de más del doble en la velocidad de desaparición del petróleo residual sobre los guijarros en comparación con el control no tratado. La diferencia fue estadísticamente significativa a pesar de la variabilidad de los datos. No se detectó ninguna diferencia en las velocidades de descomposición del petróleo residual en la arena y grava mezcladas.

Según la discusión anterior, atribuimos la mayor tasa de descomposición en la playa tratada con fertilizante al aumento de la biodegradación provocado por el suministro de nitrógeno y fósforo. Es interesante que el efecto de aumento del fertilizante parezca sostenerse durante 90 días. Este período de tiempo era mucho más largo que el período de emisión de nutrientes o que el período en el que el fertilizante pudiese tener un efecto de lavado. Por lo tanto, «favorecer» el proceso de biodegradación con unos pocos nutrientes parecía tener éxito. Se puede generalizar y decir que durante un período de 120 días (es decir, el período máximo, en Alaska, en el que las temperaturas del agua están por encima de los 10 °C y, por lo tanto, son adecuadas para la biodegradación del petróleo), la biorrecuperación eliminaría (suponiendo linealidad) aproximadamente 4 veces más de petróleo en los



**FIGURA 12.6.** Relación de cambios en el peso residual del petróleo y cambios en la relación c-C18/fitano (expresada como porcentaje del valor de medio a  $t = 0$ ) de las muestras de petróleo tomadas de los guijarros de las playas de Snug Harbor tratadas con Inipol y no tratadas. Los datos de la esquina izquierda del gráfico representan las muestras tomadas más tarde en el período de muestreo.

**TABLA 12.5.** Análisis de las tasas de descomposición frente a los pesos residuales del petróleo transformado (mg/g) en las muestras de guijarros (sólo del 8 de julio de 1989 al 29 de julio de 1989) para las playas de ensayo de Snug Harbor

Playa	Pendiente (desv. típica)	Importancia de la pendiente, mayor que cero			Vida media (días)	Tiempo para separar el (90%, días)
		N	valor-T	P'		
Tratada con Inipol	-0,016 (0,007)	80	-2,4	0,02	44	146
Control, no tratada	-0,006 (0,010)	65	-0,56	0,58	124	411

\* La tasa del Inipol difiere de cero de forma importante únicamente a un nivel de confianza del 95 por 100.

guijarros que en la playa de control no tratada. Por lo tanto, con una concentración inicial de 1,0 mg de petróleo/g de material de playa (superficie de guijarros), la biodegradación potencialmente puede eliminar la mayor parte del petróleo en un solo verano. Esto coincidía con nuestras observaciones visuales. La ausencia de cualquier efecto sobre el petróleo residual en la arena y grava mezcladas debajo de los guijarros, sugería que el petróleo quizás no se eliminaba en una capa lo suficientemente gruesa como para permitir que la biorrecuperación tuviese efecto durante este período de ensayo. O, posiblemente, el Inipol no era capaz de proporcionar nutrientes en esta parte de la playa: es decir, estaba actuando principalmente en la superficie.

### **Nutrientes y biomasa microbiana**

Después de la aplicación del fertilizante oleofilico, se tomaron muestras del agua intersticial durante varios ciclos de mareas para determinar si se podía observar algún incremento en las concentraciones de nitrógeno y fósforo. Las muestras de agua se tomaron mediante un aparato modificado que muestreaba agua 10-15 cm por debajo de la superficie de arena y grava mezcladas. El muestreo se realizó 2, 10 y 30 días después de la aplicación del fertilizante. Sólo se observaron elevadas concentraciones de nitrógeno en el muestreo del día 2 (Tabla 12.6), pero en las zonas de la playa de ensayo se observaron concentraciones muy elevadas. Sin embargo, la variabilidad era bastante grande con alguna inclinación hacia una parte de la zona tratada. Si en la pleamar todo el nitrógeno del fertilizante entrase en un golpe hipotético de agua que cubriese la zona de ensayo de la playa, se podrían esperar unas concentraciones de aproximadamente 200-300  $\mu\text{M}$  de N. Obviamente, estas concentraciones se alcanzaron en algunas zonas de la playa. Como se habían producido tres ciclos de mareas antes del muestreo, probablemente, gran parte del nitrógeno del fertilizante Inipol se había emitido durante los primeros días. Esto se corresponde con los datos de emisión de nitrógeno generados en los estudios de laboratorio descritos anteriormente. Por lo tanto, el efecto acelerador del fertilizante oleofilico sobre la biodegradación del petróleo puede haber sido resultado de un golpe inicial de nutrientes en vez de ser el resultado de una concentración de nutrientes sostenida en el tiempo. Otros datos de laboratorio y de campo apoyan esta posibilidad (Pritchard et al., 1991).

El incremento de las tasas de biorrecuperación por la aplicación del fertilizante también debería provocar un incremento en el número de bacterias degradadoras del petróleo. Para determinar si éste era el caso, se analizaron muestras de playa (arena y grava mezcladas) utilizando un procedimiento NMP (número más probable) (Pritchard et al., 1991), mediante este procedimiento se controlaban los cambios en la consistencia física del petróleo como indicadores de su biodegradación. No hubo ninguna diferencia significativa entre las playas de control y las tratadas durante los tres meses de muestreo (datos no mostrados). Sin embargo, tal y como se indicó anteriormente, las concentraciones de organismos degradadores del petróleo eran muy altas al principio, y, con la gran variabilidad observada en los datos, harían falta unos incrementos de aproximadamente dos órdenes de magni-

**TABLA 12.6.** Nitrógeno amoniacal ( $\mu\text{M}$ ) en muestras de agua intersticial tomadas en una marea entrante, 2 días después de la aplicación del fertilizante oleofílico en una playa de guijarros en Snug Harbor

	Bloque*			
	1	3	5	7
Zona pleamar	57	300	10	4
Zona media	410	61	3	6
Zona bajamar	190	3	2	3

\* Los bloques eran de 5 m de largo y 4 m de ancho y se situaban de forma paralela a la línea del agua cubriendo tres zonas paralelas, cada una de 4 m de anchura de lado a lado subiendo la playa. En cada zona no se muestreaban los bloques 2, 4, y 6.

tud para ser significativos. Además, el incremento de la biomasa podía verse oscurecido por un desprendimiento de células o una conducta predatoria de los protozoos. Los estudios de campo realizados el verano siguiente (1990), finalmente, fueron capaces de demostrar los importantes incrementos que se producían en relación a los organismos degradadores de hidrocarburos, pero solamente en la sub-superficie de la playa (Lindstrom et al., 1991).

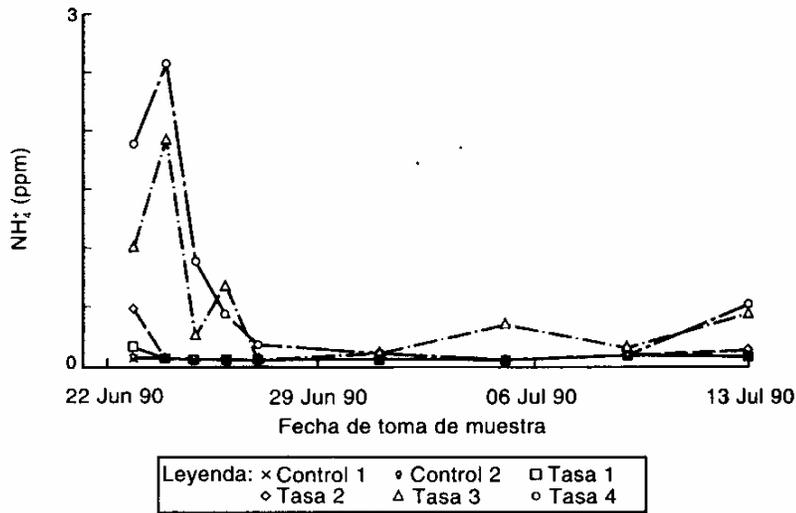
### Estudio de campo en Disk Island

En el verano de 1990, un año después del derrame de petróleo, se eligió como zona de estudio una parte del litoral noroeste de Disk Island (isla localizada entre las islas Ingot y Knight). El estudio se diseñó para obtener información de la respuesta que se producía según la dosis aplicada de fertilizante. Se eligieron los granos de fertilizante porque era fácil aplicar diferentes concentraciones de forma controlada.

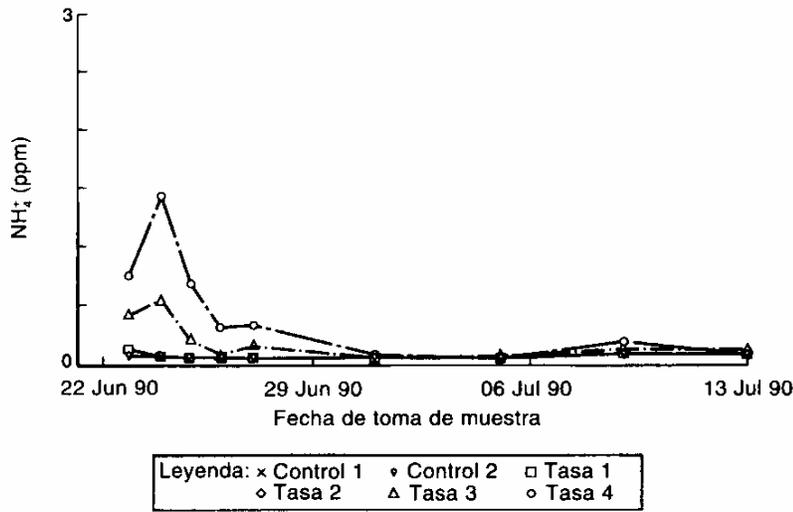
La zona de estudio se eligió porque era uno de los pocos lugares que quedaban con playas moderadas o fuertemente contaminadas que podían ser útiles experimentalmente. La playa seleccionada para el estudio, que no había sufrido el proceso de lavado físico utilizado por Exxon, tenía una ligera pendiente y poca actividad de olas. La contaminación con petróleo era superficial y subsuperficial, y más densa en la arena y grava mezcladas de lo observado en otros tipos de playas, como por ejemplo en Prince William Sound.

Se aplicaron diferentes cantidades de granos de fertilizante en distintas zonas, tal y como se muestra en la Figura 12.7. La concentración de granos aplicada por Exxon a gran escala fue de  $100 \text{ g/m}^2$ . Antes de la aplicación del fertilizante, las muestras de material de playa se homogeneizaron y colocaron en cestas de muestreo localizadas en cada zona. Después, estas cestas de muestreo se trataron pe-



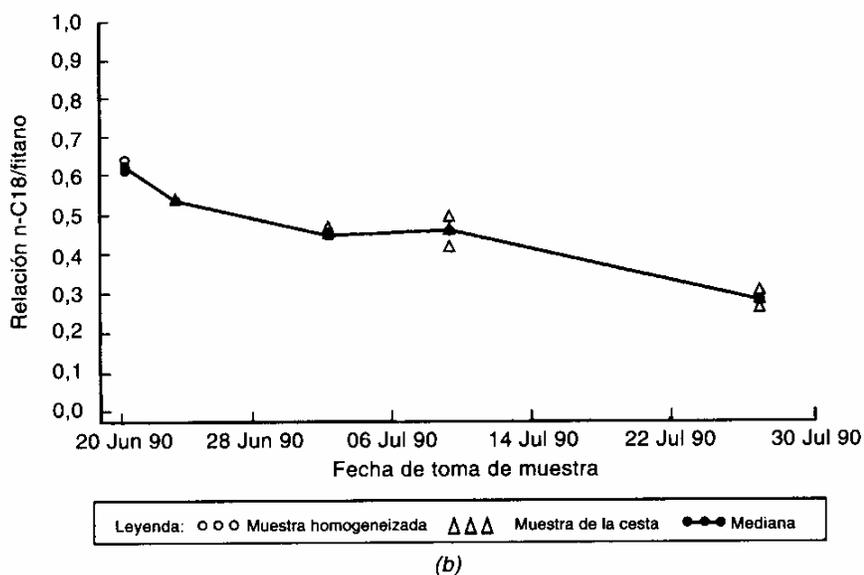
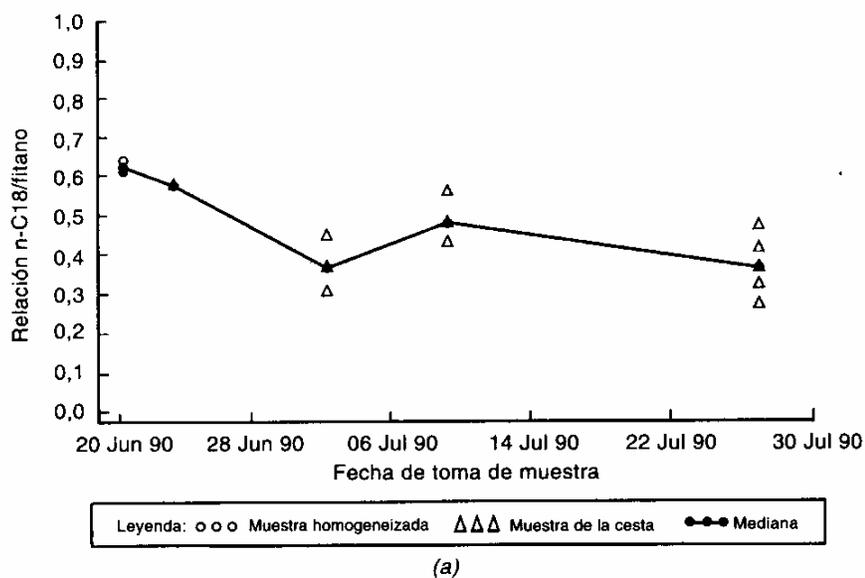


(a)



(b)

**FIGURA 12.8.** (a) Cambios en la concentración de amonio para la marea entrante en todas las zonas del Estudio sobre la Tasa de Aplicación de Fertilizante en Disk Island. (b) Cambios en la concentración de amonio para la marea saliente en todas las zonas del Estudio sobre la Tasa de Aplicación de Fertilizante en Disk Island.



**FIGURA 12.9.** (a) Cambios en la relación n-C18/fitano para la aplicación de 500 g/m<sup>2</sup> de fertilizante en el Estudio sobre la Tasa de Aplicación de Fertilizante en Disk Island. (b) Cambios en la relación n-C18/fitano para la zona de control no tratada número 1 en el estudio de Disk Island.

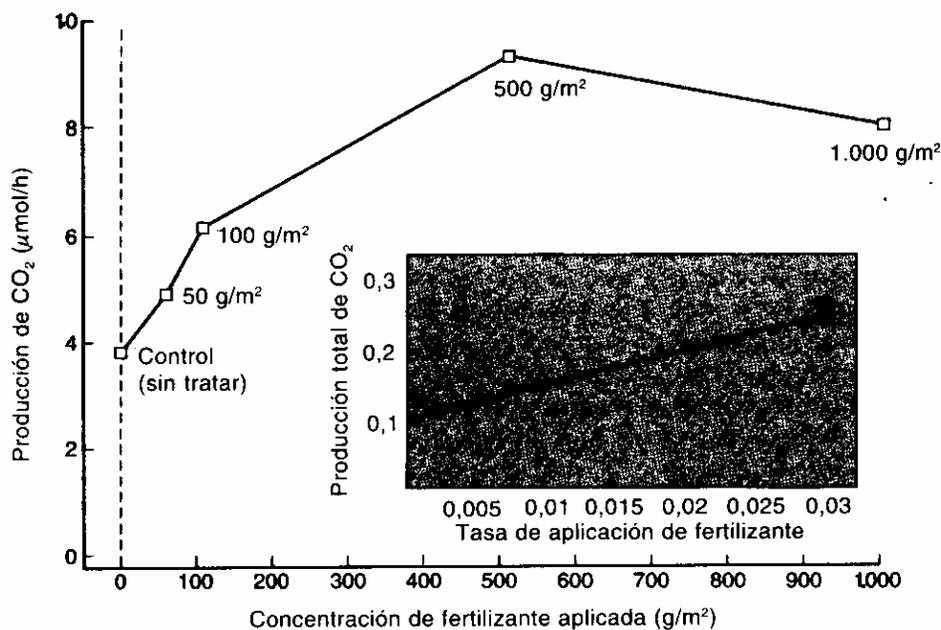
ma importante, y éste es un factor clave que se debe considerar a la hora de usar la biorrecuperación en otros tipos de playas contaminadas con petróleo. También sabemos que el material de playa contenía material húmico; esto puede haber interactuado con las comunidades microbianas degradadoras del petróleo, bien como competidor respecto al oxígeno disponible, o bien como fuente de carbono degradable preferible para los hidrocarburos petrolíferos.

Esta experiencia proporciona una lección acerca del uso de los ensayos de laboratorio como indicador del potencial de biorrecuperación. Si era un fenómeno de transporte de masas lo que afectaba al éxito de la biorrecuperación en Disk Island, entonces, la separación del material de playa en el laboratorio y la realización de ensayos similares a los descritos anteriormente, con toda probabilidad, no hubiesen revelado las limitaciones inherentes al trabajo de campo. La mayoría de estos ensayos de laboratorio implican el uso de matraces que, por su diseño, optimizan el transporte de masas, y, por lo tanto, hay que esperar que se muestren unas actividades engañosamente altas en comparación a las que se producen en campo. Esto viene ilustrado por los estudios de mineralización llevados a cabo conjuntamente con el estudio de Disk Island. El material de playa de las cestas de muestreo, cuando se colocó en matraces biométricos, mostró unas actividades de mineralización que reflejaron un efecto de aumento por la presencia del fertilizante (Fig. 12.10). Parte de la producción total de CO<sub>2</sub> es posible que procediese del material orgánico no petrolífero presente en el material de playa; sin embargo, unos estudios similares que utilizaron hidrocarburos radioetiquetados revelaron que, probablemente, estaba teniendo lugar en estos matraces una estimulación de la degradación del petróleo por la acción del fertilizante. También parece que existe una relación dosis-respuesta en estos resultados, pero al doblar las concentraciones de fertilizante no se dobló la tasa de degradación del petróleo, tal y como se mide con la mineralización. Obviamente, esta relación no se daba en el trabajo de campo.

Por lo tanto, el efecto estimulador observado en el laboratorio no se reflejó en el trabajo de campo. Sin embargo, los estudios en matraces indicaron que existía algún tipo de limitación al transporte de masas que estaba afectando a la biorrecuperación en los trabajos de campo. La única forma de protegerse de los problemas que plantea la extrapolación es realizar estudios de microcosmos; en estos estudios se analizan en el laboratorio las muestras intactas del material de playa bajo una serie de condiciones similares a las que se dan en el trabajo de campo. De hecho, estos sistemas se desarrollaron y probaron durante el proyecto del derrame de petróleo en Alaska (Pritchard et al., 1991), pero implican mayores complejidades, tiempo y gastos.

### **Programa de EPA para el desarrollo de un protocolo de biorrecuperación de un derrame de petróleo**

Muy vinculada a los estudios de campo que se acaban de describir está la cuestión de cuáles son los productos comerciales, sean microorganismos, nutrientes, sur-



**FIGURA 12.10.** Tasa de producción de CO<sub>2</sub> frente a la tasa de aplicación del fertilizante.

factantes, u otros, que se podrían o deberían utilizar en un contexto de biorrecuperación. Tal y como hemos mencionado anteriormente, en Alaska, muchos de estos productos comerciales no podían ser considerados debido al corto margen de tiempo que existía para las demostraciones de campo, pero también porque los datos disponibles para cada producto eran tan diversos y/o insuficientes que no se podían seleccionar razonablemente en el tiempo disponible. El desarrollo de protocolos de ensayo sobre rendimiento y seguridad ambiental que permita establecer una base de datos constante y relevante, sobre la cual se puedan adoptar decisiones para el uso de productos comerciales específicos, ya está en camino en la Oficina de Investigación y Desarrollo de EPA. La formación de una base conceptual para estos protocolos ha resultado complicada debido a la necesidad de mantener el alcance de los ensayos dentro de lo razonable. Sin embargo, los problemas planteados en cuanto a la variabilidad, tal y como se indicaba anteriormente, hace muy difícil el diseño de protocolos que finalmente proporcionen el tipo de información «correcta» para adoptar las decisiones reglamentarias apropiadas. De hecho, es importante revisar la conceptualización inicial que hemos realizado hasta la fecha. Evidentemente, mientras se ensayan y validan los protocolos, estos conceptos tendrán que ser modificados; por lo tanto, la información que se presenta aquí no se debe considerar como una directriz final.

Los protocolos para establecer el rendimiento de los productos de biorrecuperación del petróleo, al final, deben contener los siguientes componentes:

1. Un «sistema experto» simplificado (básicamente un árbol de decisiones), utilizado por los reguladores para considerar los factores periféricos que son fundamentales para el éxito de la biorrecuperación en aguas abiertas (Nivel I, árbol de decisiones).
2. Un ensayo de clasificación que permita la evaluación del rendimiento en relación a los distintos productos de biorrecuperación según su capacidad para promocionar una biodegradación importante del petróleo bajo una serie de condiciones estándar de laboratorio (Nivel II, información de clasificación).
3. Un procedimiento para extrapolar la información obtenida en el laboratorio al trabajo de campo sobre una base lugar-específica, utilizando información definitiva sobre cinética y respuestas a la dosis en marcos predictivos simplificados y cuantitativos (Nivel III, información de extrapolación al trabajo de campo).
4. Un procedimiento para el uso de sistemas de microcosmos continuos con el fin de establecer el efecto relativo de diferentes productos comerciales de biorrecuperación sobre los derrames de petróleo bajo las condiciones ambientales probables durante un derrame de petróleo (Nivel III, información de extrapolación al trabajo de campo).
5. Directrices para realizar estudios de campo controlados en cercados artificiales con objeto de establecer claramente el destino del petróleo durante la biorrecuperación (Nivel IV, demostración directa en campo).

Es prudente centrarse en una parte del desarrollo de los protocolos debido a las limitaciones de espacio. Los ensayos se realizarían bajo los componentes del protocolo de extrapolación lugar-específica (punto 3) y el ensayo de microcosmos (punto 4). Sin embargo, primero se hará una breve descripción de los conceptos que se encuentran detrás de un protocolo de ensayos del Nivel II como método para establecer comparaciones.

El propósito de los ensayos del Nivel II es determinar la capacidad de un producto en particular a la hora de proporcionar una biodegradación significativa del petróleo bajo una serie de condiciones de ensayo estándar en el laboratorio. No se diseña para plantear el rendimiento en un producto de biorrecuperación bajo condiciones lugar-específicas.

Además, los ensayos del Nivel II se dividieron en partes: la que mide la actividad de los productos biológicos y la que examina el rendimiento de los productos no biológicos. Los ensayos para los productos biológicos implican la adición del producto directamente sobre el derrame de petróleo en la proporción recomendada por el fabricante. También se añaden otros aditivos recomendados por el fabricante. Se supone que no es necesaria la flora microbiana del agua natural porque el producto proporciona la mayor parte de la actividad microbiana. Los ensayos se realizaron sin y con los nutrientes añadidos al agua, y con productos estériles (esterilizados) y no estériles. Los matraces se incuban mediante agitación a 20 °C. Si el producto es eficaz, los resultados se comparan con una serie de datos estándar desarrollados con una información que especifica la cantidad de actividad mínima

necesaria (perfil de captación del oxígeno y cambios en la química del petróleo) para que el producto sea eficaz como agente de biorrecuperación.

En el ensayo de productos no biológicos, se supone que éstos generalmente implican a algún mecanismo o procedimiento para estimular las capacidades degradadoras de la flora microbiana natural. En la mayoría de los casos, esto supone el enriquecimiento rápido de los microorganismos degradadores del petróleo dentro del conjunto de la población bacteriana. Como en el Nivel II de ensayo no es apropiado considerar los factores específicos de un lugar determinado que afectan a la actividad o el enriquecimiento de los microorganismos degradadores del petróleo, se debe utilizar una mezcla estándar de cultivos bacterianos puros que degraden todas las fracciones más importantes del petróleo. Alternativamente, se puede seleccionar un lugar específico para el muestreo como fuente constante de poblaciones naturales de bacterias. Sin embargo, no hay garantías de que la sensibilidad de una muestra de agua de este lugar siempre sea constante, y, por ello, el uso de una mezcla de cultivos puros tiene diversas ventajas: (1) permite almacenar las bacterias durante largos períodos y conservar su actividad, de esta forma, será la misma cada vez que se utilice; (2) elimina las variaciones probables cuando se utilizan las muestras naturales como inóculos, de esta forma, se suprime la necesidad de utilizar productos de control cada vez que se hace un ensayo; (3) se emplean unas condiciones de enriquecimiento óptimas, con lo cual la evaluación del producto de biorrecuperación se proporciona bajo condiciones ideales. Si no ofrece un buen funcionamiento bajo estas condiciones, entonces será muy poco probable que funcione en el trabajo de campo, donde las condiciones serán mucho menos idóneas.

El rendimiento del producto se medirá en tiempo real, tal y como tiene lugar bajo las condiciones prácticas en una zona de derrame, y según el tiempo que tarde en enriquecer el cultivo mezclado hasta alcanzar el punto en el que afecte al petróleo. La mancha de petróleo se puede romper sobre la superficie del agua rápidamente como consecuencia de la adición del producto. El sistema de ensayo se diseña no solamente para controlar este suceso, sino también como sistema cerrado, para poder seguir el destino del petróleo durante las semanas posteriores. Si se observa una degradación importante durante el período de incubación, entonces se supone que el petróleo que quede en la superficie del agua se va a descomponer. La investigación que actualmente se está llevando a cabo bajo el Programa de Investigación de Derrames de Petróleo verificará esta suposición.

### **Concepto y desarrollo de los protocolos de ensayo del Nivel III para aguas abiertas**

La idoneidad de los productos para la biorrecuperación de petróleo en mar abierto se debe ensayar en el laboratorio bajo una serie de condiciones razonablemente representativas de las condiciones de campo. Aunque los ensayos de esta naturaleza pueden llegar a ser bastante complejos, se han diseñado sistemas de microcosmos que modelan unas características especiales que pueden ser la clave para el éxito de la biorrecuperación en aguas abiertas. La característica principal de los

microcosmos es la incorporación de una capacidad de disolución. Los microcosmos que contienen un derrame de petróleo sobre la superficie del agua se utilizan en esta parte del protocolo para evaluar:

1. La tendencia del producto de biorrecuperación a quedarse con el petróleo el tiempo suficiente como para ser eficaz.
2. El potencial de un producto para emulsionar el petróleo y provocar su dispersión.

Se utilizan sistemas de microcosmos que posibilitan la aplicación de un producto de biorrecuperación y los complementos necesarios a una superficie de petróleo, y, después, permiten que el agua del mar fluya por debajo del petróleo a velocidades y turbulencias distintas para crear la capacidad de disolución necesaria a partir de una situación de campo concreta. Este ensayo determinará el tiempo en el que el producto y sus complementos se unirán al petróleo. Por supuesto, no indica que se vaya a producir una disolución similar en los trabajos de campo, pero proporcionará un método para seleccionar los productos y el rendimiento dentro de una estrategia de aplicación. Si, por ejemplo, un producto (o complemento necesario) se separa rápidamente del derrame de petróleo en el microcosmos, es casi seguro que se separará aún más rápidamente en los trabajos de campo. Un producto que parezca eficaz (es decir, que se quede con el derrame y afecte al destino del petróleo) se considerará para la realización de más ensayos. Además, las condiciones de flujo y de turbulencia en los microcosmos se pueden modificar para proporcionar un rango de condiciones bajo las cuales se pueda evaluar el rendimiento del producto.

El sistema de ensayo del Nivel III se basa en las cinéticas de biodegradación e implica el uso de estudios de microcosmos para determinar el efecto de algunos parámetros ambientales sobre la capacidad del producto biorrecuperador a la hora de aumentar las tasas de biodegradación del petróleo. La información cinética es muy importante para los protocolos que se dedican al tratamiento del petróleo sobre aguas abiertas, ya que siempre será importante la cuestión de la velocidad a la que opera el producto bajo una serie específica de condiciones ambientales *en relación* a la velocidad con la que el derrame se dispersa de forma natural.

El uso de microcosmos continuos es imprescindible debido a la necesidad de establecer el rendimiento de un producto bajo condiciones que no pueden ser modeladas en un estudio de matraces o en ensayos del Nivel II. Estas condiciones se definen de la siguiente forma:

1. La presencia de una mancha de petróleo intacta flotando sobre la superficie de una columna de agua.
2. La capacidad de impartir y controlar la turbulencia de la columna de agua durante los ensayos con la mancha de petróleo intacta.
3. La entrada continua de agua que contenga importantes concentraciones de partículas en la columna de agua.
4. Condiciones de flujo continuo que permitan el intercambio de agua y disolución debajo de la capa de petróleo.

5. La temperatura, especialmente porque afecta a la naturaleza física del petróleo.
6. Concentraciones de nutrientes inorgánicos en el agua de flujo.
7. Actividad microbiana en el agua afluyente.

Para realizar los ensayos de microcosmos del Nivel III, se deben considerar cuidadosamente varios puntos:

1. Los ensayos con microcosmos son caros para el vendedor porque requieren instalaciones de ensayo bastante elaboradas, un análisis químico y amplio, y sistemas sofisticados para interpretar los datos. Por lo tanto, los ensayos se deben mantener en un mínimo.
2. Debido a estos gastos y complicaciones, los ensayos con microcosmos no se pueden emplear para examinar la influencia que tienen los factores ecológicos o los derrames sobre el rendimiento del producto de biorrecuperación.
3. Los microcosmos, por definición, se diseñan para simular ciertas condiciones ambientales de forma más realista que los ensayos más sencillos, como sucede con los matraces. Por lo tanto, las condiciones específicas que van a ser modeladas en el microcosmos se deben evaluar críticamente, de tal forma que el ensayo con microcosmos no dé lugar a datos que podrían haber sido obtenidos más fácilmente mediante sistemas más sencillos.
4. Cuando se está considerando la aplicación de un producto biorrecuperador en aguas abiertas, hay que tener en cuenta que la modelización de las condiciones típicas de un lugar de derrame será muy compleja, hasta el punto de que será cuestionable su correcta modelización en el microcosmos. Por ejemplo, el rendimiento de un producto de biorrecuperación probablemente dependerá, en parte, de las condiciones de las olas y de la turbulencia. Es difícil desarrollar estas condiciones en un microcosmos. Además, la extrapolación al trabajo de campo de la información del microcosmos es complicada porque las condiciones varían de día en día, o incluso cada hora. Se podría ensayar un rango de condiciones turbulencia/olas en el microcosmos, pero esto se debe limitar por las restricciones de coste y tiempo.
5. Finalmente, se debe tener en cuenta que los ensayos del Nivel III implican guardar la información utilizada en el momento del derrame (después de un derrame no hay tiempo para realizar ensayos tipo microcosmos). Por lo tanto, la información recogida debe ser de tal naturaleza que permita su utilización eficaz en la toma de decisiones cuando se produzca otro derrame de petróleo.

Tal y como se mencionó anteriormente, uno de los factores más críticos cuando se realizan estudios de microcosmos es la capacidad para interpretar los datos resultantes. Cuanto mayor sea la base de datos disponible sobre el rendimiento del producto, especialmente en términos cinéticos, mejor se podrán utilizar los resultados del microcosmos y extrapolar a una situación lugar-específica. Como cada

zona es diferente, es imposible tener información «registrada» de un producto en particular idóneo para cada zona. Por lo tanto, hay que saber cómo generalizar el método de ensayo. Esto se puede lograr, bien ensayando aguas procedentes de varias zonas designadas (Costa Atlántica frente a Costa Pacífica o Costa del Golfo, aguas norteñas frente a aguas sureñas, bahías protegidas frente a abiertas, tierras húmedas frente a marismas, etc.), o bien examinando el efecto de algunos parámetros ambientales seleccionados que engloben de forma general todas las condiciones de estas áreas diferentes y, después, se trataría de extrapolar los resultados generales a las condiciones lugar-específicas que se pueden determinar en el momento del derrame. Esta última aproximación parece ser la más razonable.

Por consiguiente, se debe desarrollar un protocolo basado en una decisión inicial acerca de los factores más importantes que probablemente afectarán al rendimiento del producto en el tratamiento del petróleo. Por lo general, los factores más importantes serán:

1. Temperatura.
2. Turbulencia.
3. Salinidad.
4. Concentración existente de nutrientes inorgánicos.
5. Partículas en suspensión.
6. Actividades microbianas existentes.
7. Tipo y concentración de petróleo.

Se debe determinar si los factores se pueden medir en el trabajo de campo en el momento del derrame (en un período de 1-2 días). Para los que se puedan medir, se establecerán unas relaciones cuantitativas entre el factor y el rendimiento del producto. Un buen ejemplo es la turbulencia. El rendimiento del producto se puede establecer bajo tres condiciones diferentes de turbulencia: alta, media y baja. Los datos se introducen en un gráfico (rendimiento frente a turbulencia expresado en número Reynolds o equivalente), y se establece una relación (lineal, exponencial, etc.) utilizando técnicas estadísticas. Una vez conocida la relación, se puede predecir el rendimiento del producto en un lugar concreto. Es decir, se obtendrá una indicación general de las condiciones de turbulencia en el lugar del derrame y se utilizará el gráfico para establecer el rendimiento del producto.

Como al final se tratarán varios factores ambientales juntos y varias condiciones ambientales especiales, se puede utilizar un sencillo marco de cálculo. Un protocolo debe contener, para cualquier producto, los factores ambientales clave que afectarán al rendimiento en cualquier zona, y éstos serán: turbulencia, temperatura, actividad microbiana, tipo de petróleo, concentración de nutrientes en la columna de agua, y partículas en la columna de agua. Ningún otro factor deberá ser considerado, ya que se supone que los demás factores no serán significativos en la decisión global de utilizar o no el producto. Por lo tanto, cada producto tendrá datos «registrados» que relacionarán estos factores ambientales clave con el rendimiento del producto.

## Resumen y conclusiones

Los resultados de nuestra demostración de campo en relación a la biorrecuperación de un derrame de petróleo en Prince William Sound indicaron que el fertilizante oleofílico Inipol EAP™ 22 servía como fuente de nutrientes eficaz para las comunidades microbianas degradadoras de petróleo. Este producto aumentó la biodegradación del petróleo, tal y como se midió mediante los cambios de composición del petróleo y los pesos residuales del mismo, hasta doblar las tasas registradas en los controles no tratados. Esto supone una efectividad suficiente como para merecer la incorporación de la biorrecuperación, a gran escala, en el plan de recuperación de las playas contaminadas con petróleo de Prince William Sound. A pesar de este efecto de aumento, la importancia de la naturaleza oleofílica aún no está clara, por lo menos para el material de playa contaminado con petróleo de Prince William Sound. Sin embargo, nuestros estudios confirman la creencia de que la observación visual de la eliminación del petróleo en las playas 8-10 días después de la aplicación de Inipol se debió fundamentalmente a la biorrecuperación y no a un efecto de lavado químico.

Globalmente, la rápida desaparición del petróleo provocada por la aplicación del fertilizante oleofílico hizo que estas playas fuesen más compatibles con la vida salvaje local (menor tendencia a manchar la piel y las plumas de los animales con petróleo). Estos cambios se producían en un período de tiempo más corto que los cambios observados en las zonas de control no tratadas, y posiblemente ayudaban a que se acelerase la recuperación biológica de la zona de intermareas.

También hemos tratado algunas de las cuestiones asociadas a la medición del éxito de la biorrecuperación en el trabajo de campo. Se han enfatizado como elementos clave las mediciones eficaces de la biodegradación y la interpretación de los datos resultantes, dada la naturaleza altamente variable de los estudios de campo. Además, se discutieron también las complicaciones y dificultades que surgieron durante nuestros trabajos de biorrecuperación en Alaska. Es de esperar que esto sirva de guía en aplicaciones similares de biorrecuperación para futuros derrames de petróleo.

## Referencias bibliográficas

- Atlas, R. and R. Bartha. 1973. Stimulated biodegradation of oil slicks using oleophilic fertilizers. *Environ. Sci. Technol.* 7:538-541.
- Atlas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45:180-209.
- Bartha, R. and D. Pramer. 1965. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Sci.* 100:68-70.

- Chianelli, R. R., T. Aczel, R. E. Bare, G. N. George, M. W. Genowitz, M. J. Grossman, C. E. Haith, F. J. Kaiser, R. R. Lessard, R. Liotta, R. L. Mastracchio, V. Minal-Bernero, R. C. Prince, W. K. Robbins, E. I. Stiefel, J. B. Wilkinson, S. M. Hinton, J. R. Bragg, S. J. McMille, and R. M. Atlas. 1991. Bioremediation technology development and application to the Alaskan spill. In *Proceedings 1991 Oil Spill Conf.*, Am. Petroleum Inst., Washington, D.C., pp. 545-555.
- Bergstein, P. E. and J. R. Vestal. 1978. Crude oil biodegradation in arctic tundra ponds. *Arctic* 31:159-169.
- Glaser, J. A., A. D. Venosa, and E. J. Opatken. 1991. Development and evaluation of application techniques for the delivery of nutrients to contaminated shoreline in Prince William Sound. In *Proceedings 1991 Oil Spill Conf.*, Am. Petroleum Inst., Washington, D.C., pp. 556-562.
- Halmø, G. 1985. Enhanced biodegradation of oil. In *1985 Proceedings Oil Spill Conf.*, Am. Petroleum Inst., Washington, D.C., pp. 531-537.
- Jobson, A. M., F. D. Cook, and D. W. S. Westlake. 1972. Microbial utilization of crude oil. *Appl. Microbiol.* 23:1082-1089.
- Kennicutt, M. C. 1988. The effect of biodegradation on crude oil bulk and molecular composition. *Oil Chem. Pollut.* 4:89-112.
- Lee, K. and E. M. Levy. 1987. Enhanced biodegradation of light crude oil in sandy beaches. In *1987 Proceedings, Oil Spill Conf.*, Am. Petroleum Inst., Washington, D.C., pp. 411-479.
- Lindstrom, J. E., R. C. Prince, J. C. Clark, M. J. Grossman, T. R. Yeager, J. F. and E. J. Brown. 1991. Microbial populations and hydrocarbons biodegradation potential in fertilized shoreline sediments affected by the T/V *Exxon Valdez* oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2514-2522.
- Madden, P. C. 1991. Final Report Prall's Island Bioremediation Project. Exxon Res. and Engineering, Florham Park, N.J. 82 pp.
- Mueller, J. G., S. M. Resnick, M. E. Shelton, and P. H. Pritchard. 1992. Effect of inoculation on the biodegradation of weathered Prudhoe Bay crude oil. *J. Ind. Microbiol.* In press.
- Olivieri, R., P. Bacchin, A. Robertiello, N. Oddo, L. Degen, and A. Tonolo. 1976. Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow-release fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:629-634. (57)
- Olivieri, R., A. Robertiello, and L. Degen. 1978. Enhancement of microbial degradation of oil pollutants using lipophilic fertilizers. *Marine Pollut. Bull.* 9:217-220. (59).
- Pirnik, M. P., R. M. Atlas, and R. Bartha. 1977. Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: Normal and branched alkanes. *J. Bacteriol.* 119: 868-878.
- Pritchard, P. H., C. F. Costa, and L. Suit. 1991. Alaska Oil Spill Bioremediation Project. U.S. EPA, Office of Res. and Dev. Report, EPA/600/9-91/046a, 522 pp. Washington, D.C.
- Pritchard, P. H. and C. F. Costa. 1991. EPA's Alaskan oil spill bioremediation project. *Environ. Sci. Technol.* 25:372-379.
- Rowland, S. J., R. Alexander, R. I. Kazi, D. M. Jones, and A. G. Douglas. 1986. Microbial degradation of aromatic components of crude oils: A comparison of laboratory and field observations. *Org. Geochem.* 9:153-161.
- Sveum, P. and A. Ladousse. 1989. Biodegradation of oil in the Arctic: Enhancement by oil-soluble fertilizer application. In *1989 Proceedings Oil Spill Conf.*, Am. Petroleum Inst., Washington, D.C., pp. 439-446.
- Tramier, B. and A. Sirvins. 1983. Enhanced oil biodegradation: A new operational tool to control oil spills. In *Proceedings 1983 Oil Spill Conf.*, Am. Petroleum Inst., Washington, D.C., pp. 155-219.

- Venosa, A. D., J. R. Haines, J. A. Glaser, E. J. Opatken, P. H. Pritchard, and C. F. Costa. 1990. Bioremediation treatability trials using nutrient application to enhance cleanup of oil contaminated shoreline. In *Proceedings 83rd Air and Waste Management Association Annual Meeting*, Air and Waste Management Assoc., Pittsburgh, Pa., pp. 90-22.3.

# Capítulo 13

## ORIENTACIONES FUTURAS EN LA BIORRECUPERACIÓN

---

**Rita Colwell**

*Instituto de Biotecnología de Maryland  
Universidad de Maryland  
College Park, Maryland*

**Morris A. Levin**

*Instituto de Biotecnología de Maryland  
Universidad de Maryland  
College Park, Maryland*

**Michael A. Gealt**

*Departamento de Biociencia y Biotecnología  
Universidad de Drexel  
Philadelphia, Pennsylvania*

Los pronósticos para las tendencias futuras se deben basar en los hechos y descubrimientos del pasado inmediato y del presente. Las áreas en las que la investigación actual está avanzando más rápidamente son: la aplicación de la genética molecular al desarrollo de nuevas cepas bacterianas capaces de degradar más los compuestos o de metabolizar a aquellos que de otra forma resultarían «refractarios» al metabolismo microbiano; y el desarrollo de nuevas tecnologías de ingeniería para aumentar la velocidad y el alcance de la degradación. Se han realizado observaciones similares<sup>41,42,47</sup> en las que se han discutido ejemplos de aplicaciones específicas que combinan las aproximaciones microbianas y de ingeniería. Desde el principio destacamos la importancia de plantear la infraestructura reglamentaria paralelamente a las innovaciones científicas y de ingeniería en la biodegradación, ya que no se pueden utilizar nuevas cepas fuera del marco reglamentario.

Se está progresando mucho en la ciencia y tecnología de la biodegradación y biorrecuperación. En 1991, el mercado de biorrecuperación de residuos peligrosos

supuso unos 60 millones de dólares y se estima que crecerá hasta 125-300 millones de dólares para 1995. La predicción es una tasa de crecimiento del 65 por ciento anual<sup>16</sup>. Otro indicativo importante de la madurez de la industria se ve en los esfuerzos de los miembros de la Asociación de Biotecnología Aplicada, quienes están utilizando, hasta la fecha, sólo microorganismos no modificados. La asociación se formó en 1988 para promocionar los intereses de las empresas implicadas en el biotratamiento<sup>3</sup>. Ha preparado un compendio de los éxitos y actualmente está buscando una forma de acreditación para los proveedores que utilizan microorganismos modificados en el tratamiento de residuos.

La importancia de la estructura reglamentaria es cada vez más evidente. Por ejemplo, los factores reglamentarios específicos que influyen en el desarrollo de la industria de biotratamiento son: (1) los reglamentos de limpieza federales y estatales, y (2) las cuestiones de transferencias inmobiliarias. Muy importante es la necesidad de demostrar inequívocamente que la degradación microbiana es el mejor método para la desaparición de los contaminantes, y que el proceso dará lugar a la mineralización o producción de sustancias inocuas.

Desgraciadamente, en algunas áreas el progreso es menos rápido. Después de analizar la literatura relativa al tema en busca de evidencias sobre el éxito del biotratamiento, Madsen<sup>31</sup> sólo pudo recoger siete casos en los que se pudiese documentar sin dudas una biodegradación originada por la actividad microbiana. Estos siete casos incluyeron tres aplicaciones en suelo, dos acuáticas y dos marinas. Solamente uno de los tratamientos de suelo contó con adición de microorganismos; los otros tuvieron una adición de nutrientes en forma de fertilizante. Ninguna de las pruebas marinas o acuáticas utilizó la adición de fertilizantes. Madsen<sup>31</sup> pudo identificar otros estudios en los que el trabajo de laboratorio avalaba la capacidad de los microorganismos autóctonos para degradar residuos concretos, pero los estudios de campo asociados no generaron datos concluyentes para apoyar la idea de que la biodegradación se debía a la acción microbiana. Obviamente, es necesario contar con más datos que detallen los efectos *in situ* de la acción microbiana antes de que los políticos, el público y los posibles clientes acepten el biotratamiento como alternativa viable, segura y rentable.

En un artículo reciente, Alexander<sup>2</sup> constató que las áreas de investigación prioritarias incluían: (1) el incremento de la biodisponibilidad de contaminantes, (2) la mejora de los diseños para la recuperación en reactor e *in situ*, (3) la superación de los problemas de escalas, y (4) la búsqueda de procesos mejores de biorrecuperación. Aunque cuando existe suficiente tiempo, los microorganismos degradan casi la totalidad de los compuestos, en la próxima década se debe lograr un incremento del rendimiento de los microorganismos autóctonos y reactores (o prácticas *in situ*) para que la tasa de degradación supere a la tasa de deposición.

### Áreas de progreso

Los residuos cianogénicos se están tratando mediante degradación utilizando microorganismos. Es decir, el cianuro se genera a partir de diversos procesos indus-

triales, incluyendo la electrodeposición y la fabricación de acero y pintura. Debido a la toxicidad del cianuro, es necesario conseguir su degradación antes de permitir el vertido al ambiente de los residuos que contienen cianuro. Como existen aproximadamente 2.000 especies de plantas verdes que producen cianógenos (compuestos orgánicos que contienen cianuro), que se convierten en HCN cuando la planta es atacada por los hongos, no es sorprendente que éstos, como mecanismo de defensa, hayan desarrollado enzimas (p. ej., hidratasa de cianuro) capaces de detoxificar el HCN convirtiéndolo en formamida<sup>58</sup>. Estos mecanismos de detoxificación están bajo investigación para su aplicación en el tratamiento del cianuro residual. Ya se ha demostrado la conversión estequiométrica del cianuro en formamida utilizando un hongo inmovilizado en una columna. La empresa Imperial Chemical Industries (ICI) ha desarrollado un sistema enzimático que se puede utilizar para tratar altas concentraciones de cianuro en un flujo continuo, que puede variar desde unos pocos a varios cientos de metros cúbicos al día. La empresa Homestake Chemical Company, en Dakota del Sur, ha desarrollado un sistema de biotratamiento que utiliza biodiscos (RBCs). La empresa eligió un proceso biológico para el tratamiento de los residuos cianogénicos después de evaluar cuidadosamente los tratamientos químicos y físicos, que se rechazaron por su rendimiento, costes de inversión, y altas concentraciones de cianuro en los efluentes (hasta 20 mg/l). También se ha informado de éxitos en la degradación del cianuro utilizando bacterias metanogénicas en condiciones anaerobias<sup>12</sup>.

Queda claro, entonces, que se pueden citar muchos ejemplos del uso de organismos vivos para la recuperación ambiental. En general, éstos incluyen plantas microorganismos. Las plantas se han utilizado para la acumulación y separación de residuos tóxicos en el agua y suelo, especialmente cuando los residuos tóxicos contienen metales pesados. Los pioneros en esta aplicación fueron Minguzzi y Vergano en 1949, en esta ocasión, las plantas acumularon níquel procedente del suelo [hasta niveles (sim) del 1 por ciento]<sup>21</sup>. Se utilizó el término *hiperacumuladoras* para las especies de plantas que acumulaban 0,1 por ciento de metal, medido en las hojas secas. Más de 50 especies de alhelies pueden hiperacumular metales pesados. Homer et al. informaron sobre la captación de níquel, cobre y cobalto. Otros han constatado que algunas plantas acumulaban entre el 0,1 y 5 por ciento de su peso seco total en contenido en metales. En base a estos descubrimientos se ha propuesto que las plantas sean utilizadas para acumular metales y que el tejido de las mismas sirva como fuente para la recuperación de dichos metales. Baker<sup>5</sup> estableció una hipótesis según la cual la acumulación es lineal hasta alcanzar un nivel a altas concentraciones de metal en el suelo.

La investigación en la biorrecuperación marina utilizando microorganismos marinos que poseen una amplia gama de capacidades degradadoras y pueden sobrevivir en condiciones adversas se sigue realizando y ha sido revisada recientemente<sup>60</sup>. Se están estudiando diversas capacidades en el ambiente marino por el interés que existe en la codificación de genes para las enzimas de degradación, y la necesidad de capacidades genéticas que continúen activas bajo condiciones adversas (p. ej., altas presiones en las profundidades marinas y altas temperaturas en los sistemas de ventilación hidrotérmicos).

## Desarrollo de cepas

Se han realizado muchos estudios que describen cepas bacterianas y hongos que pueden descomponer uno o más tipos de residuos peligrosos. Es casi axiomático que las nuevas cepas puedan ser aisladas fácilmente. Por ejemplo, recientemente se informó de que la *Alcaligenes* sp. O-1 mineralizaba el ácido o-sulfanílico<sup>22</sup> y se ha descrito que la *Nocardia* sp. HB descompone los 1,2-epoxialcanos<sup>57</sup>. Con una mayor investigación, se puede esperar que se consigan nuevas cepas para la descomposición de materiales nocivos que los organismos actualmente no pueden degradar con facilidad<sup>1,45</sup>.

Antes de utilizar organismos modificados en los trabajos de campo se deben tener en cuenta las cuestiones de seguridad y de inquietud pública<sup>41,42,43</sup>. Inicialmente, es necesario realizar demostraciones en el laboratorio y a escala piloto para comprobar que los microorganismos modificados genéticamente (MMGs) ofrecen una clara ventaja sobre los organismos convencionales y no suponen ningún peligro. Obviamente, hay que cumplir los reglamentos en vigor. Además, las cuestiones económicas, de mercado, los obstáculos sociales y el ambiente político, todos estos factores juntos, jugarán un papel importante en la biorrecuperación. Estas cuestiones se discuten más ampliamente en el Capítulo 2.

Se están desarrollando varias estrategias para utilizar los MMGs en la superación de los problemas que plantea el uso de bacterias autóctonas. Por ejemplo, es normal que cuando se tienen muchos productos residuales diferentes sea necesario el desarrollo simultáneo de varias rutas para que se produzca la degradación. Varios investigadores<sup>1,23,56</sup> han sugerido la posibilidad de obtener diferentes funciones en una sola especie, que después podría entrar en el ambiente para degradar un compuesto complejo o mezcla de compuestos. Alternativamente, puede ser más idóneo controlar la proporción de diferentes especies de bacterias dentro de una asociación para conseguir la misma mezcla de actividades<sup>34</sup>. Desgraciadamente, falta información sobre cómo funcionan las especies asociadas. Obviamente, se trata de una cuestión que se debe resolver, bien de un modo general, o caso por caso, para obtener la información deseada.

Uno de los impedimentos para introducir los MMGs en el medio ambiente es el requisito legal de que sean seguidos y controlados después de su emisión deliberada o escape desde un reactor. Se han desarrollado diversos métodos con el fin de seguir a los MMGs; el más común es el uso de secuencias únicas como objetivos, bien para la hibridación o para la reacción en cadena polimerasa (RCP)<sup>36,51</sup>. Se ha sugerido el uso de métodos selectivos de placa que emplean características especiales clonadas. Por ejemplo, Nakamura et al.<sup>37</sup> propusieron un método de cultivo en placas para detectar a una *Pseudomona* sp. capaz de asimilar el monofluoroacetato como fuente única de carbono<sup>37</sup>.

El control, una vez desarrollado el método de detección, es más difícil cuando la secuencia de ADN se transporta entre cepas o especies bacterianas en el ambiente. Se ha demostrado que el transporte de genes se produce tanto en sistemas acuosos<sup>13,14,15,24,32,35,48</sup> como en suelos<sup>17,49,59</sup>. Este transporte necesita el uso de sondas de ADN y RCPs para controlar los MMGs emitidos, ya que estos métodos son

sensibles al ADN modificado y no al organismo anfitrión (que puede cambiar debido al transporte de genes). Un trabajo reciente confirma que las bacterias pueden recibir ADN libre del medio<sup>36</sup>.

Quizás más fructífera que la adición de nuevas funciones metabólicas a una sola bacteria —es decir, la creación de un «superbicho»— sea la modificación de las actividades metabólicas de los microorganismos autóctonos y la creación de asociaciones. Por ejemplo, la simple modificación de la actividad promotora puede incrementar la cantidad de enzima producida por un organismo. Muy pocos cambios en la secuencia primaria de los aminoácidos pueden alterar la estructura enzimática, posiblemente se logre aumentando su estabilidad, haciendo descender la especificidad del sustrato (incrementando el número de posibles sustratos), o ampliando el rango de condiciones ambientales bajo las cuales funcionará la enzima (pH, temperatura, etc.). La posibilidad de llevar a cabo estos logros mediante ingeniería genética ya ha sido demostrada y probada mediante la modificación de la subtilisina (véase Ensley y Zylstra, Capítulo 3).

Las mezclas de materiales tóxicos vertidas en los flujos residuales se pueden tratar mejor con mezclas de microorganismos que trabajen asociados o en consorcios. Sin embargo, puede haber ocasiones en las que los microorganismos trabajen más eficazmente cuando se aplican especies o cepas individuales, en vez de toda la mezcla al principio de la recuperación. Se ha demostrado<sup>34</sup> que los microorganismos producidos de forma natural, pero seleccionados, se pueden aplicar con éxito a escala comercial en tales situaciones. La empresa Waste Stream Technologies (WST) ha informado sobre el tratamiento con éxito de mezclas de contaminantes con compuestos volátiles, semivolátiles y alifáticos. La empresa utilizó la introducción secuencial de microorganismos, con la aplicación de un organismo para degradar los compuestos volátiles, seguido de la adición de una serie de microorganismos para continuar el proceso; de esta forma se degradan los pirenos y los compuestos con mayores pesos moleculares. Se han seleccionado microorganismos que metabolizan específicamente cada grupo de compuestos. WST ha demostrado que, utilizando todas las especies microbianas de forma simultánea, la degradación se inhibe, una observación interesante e importante. La empresa seleccionó microorganismos termoespecíficos (termofílicos, psicofílicos, y/o mesofílicos), de esta forma, se consiguió la biodegradación durante todas las estaciones del año. En uno de los casos, el suelo contaminado con gasóleo se trató con *Pseudomonas* psicofílicas a finales del otoño, el resultado fue que no se detectó gasóleo en el suelo durante la primavera. En otro caso, se inocularon en noviembre entre 6.000 y 7.000 m<sup>3</sup> de suelo que contenía naftaleno a un nivel de 8.000-12.000 ppm. Cuando se comprobó el suelo en marzo, la concentración había descendido a 100 ppm<sup>33</sup>. WST también apoya el uso de grandes cantidades de microorganismos, con una sustitución continua cuando puedan ser problemáticas las cuestiones de toxicidad o de deficiencia de nutrientes. Esta aproximación se basa en la suposición de que algunos de los microorganismos digieren parte del material, y el propio inóculo generará una fuente de nutrientes durante algún periodo corto de tiempo.

El rendimiento de la degradación depende de las rutas y de los receptores terminales de electrones disponibles en la cepa o asociación microbiana utilizada<sup>52</sup>.

La diferencia fundamental no estará en si una reacción es anaerobia o aerobia; el éxito dependerá de los factores ambientales que favorezcan las reacciones realizadas por aquellos microorganismos para los cuales el sustrato es accesible. Esta clase de información, obtenida de la ecología microbiana, se puede utilizar para modelar el destino y el transporte de los compuestos, así como de las propias bacterias, y es útil en el diseño de tratamientos específicos. Alexander et al.<sup>2</sup> señalaron que como la adsorción contribuye en gran parte a la retención y el movimiento de las bacterias en los acuíferos, la manipulación de los constituyentes iónicos puede facilitar el funcionamiento de los microorganismos.

En el futuro, no existe ninguna duda de que la degradación se mejorará mediante ingeniería genética. Se incrementarán las tasas de degradación y el rango de materiales que se pueden tratar. La aplicación de la tecnología del ácido nucleico conseguirá grandes avances en microbiología ambiental y en el biotratamiento de los materiales residuales<sup>40</sup>. Las aplicaciones ambientales de los microorganismos no modificados, junto con el uso de las sondas de ácido nucleico y RCP, para identificar a los microorganismos implicados en los procesos de biorrecuperación y control ambiental harán del campo del biotratamiento un componente importante en la biorrecuperación.

Si la industria del biotratamiento va a prosperar es imprescindible que el público acepte el biotratamiento y el uso de microorganismos modificados en biorrecuperación. La aceptación por parte de la comunidad industrial y del público no se basa sólo en el éxito de las aplicaciones sin efectos adversos, sino también en datos sólidos que demuestren un tratamiento con éxito a un coste reducido (en tiempo y/o dinero). Existen muchos datos disponibles en los trabajos de laboratorio sobre la capacidad de un microorganismo dado para degradar un compuesto en particular bajo una serie de condiciones controladas. No se puede enfatizar demasiado la importancia que tiene el demostrar que un proceso se puede aplicar a escala real y operar bajo condiciones reales. De hecho, éste es un gran obstáculo en el desarrollo de la biotecnología, y especialmente de la biorrecuperación<sup>39,42</sup>.

El uso específico de MMGs en biorrecuperación es una cuestión de seguridad, debido a la posible emisión al ambiente del propio MMG o del ADN modificado genéticamente, con su potencial de transporte entre los microorganismos naturales. Una aproximación que ha logrado algunos apoyos es la incorporación de un gen «suicida» a la bacteria propuesta para su emisión deliberada<sup>9</sup>. La función de autodestrucción se puede combinar con las funciones degradadoras modificadas, de modo que la bacteria muera cuando desaparezca el residuo peligroso, es decir, cuando se metabolice el sustrato. Un ejemplo sería la inserción de una proteína (la proteína GEF) en la membrana celular. Cuando cesa la degradación, esta proteína facilita el flujo sin restricción hacia dentro y fuera de la célula, provocando su muerte. El funcionamiento del sistema basado en la GEF se ha demostrado en varias especies con posibilidades de emisión deliberada.

Existen datos que demuestran que los organismos modificados quizás no prosperen, o incluso resistan, en algunas condiciones ambientales<sup>27</sup>. Es posible que no sobrevivan lo suficiente como para lograr el objetivo deseado. Los ensayos en el laboratorio se han realizado con cepas mutadas, y se han planificado ensayos simi-

lares para las cepas modificadas<sup>7</sup>. Celgene y Envirogen han investigado las ventajas de usar microorganismos modificados y han comenzado a desarrollar cepas para su uso en el futuro; creen que los MMGs serán emitidos con el beneplácito del público<sup>10</sup>.

Un área que ha conseguido grandes mejoras durante los últimos años es el desarrollo de métodos de control. Se están desarrollando modelos para controlar la degradación: un buen ejemplo son los hidrocarburos de una zona en recuperación<sup>4</sup>. En el futuro, cuando el uso *in situ* de los MMGs sea rutinario, la actividad degradadora se medirá construyendo el MMG de modo que incluya al gen *Luxe* de *Vibrio harveyii*. Tal construcción permitirá la generación de luz (que se puede controlar) mientras sube el ATP intracelular durante la degradación<sup>25</sup>. Sin duda, ¡algunos residuos proporcionarán una visión impresionante durante la noche! En cualquier caso, la presencia de organismos que contengan genes degradadores específicos se podrá controlar mediante hibridación clásica<sup>44</sup> o métodos RCP<sup>26</sup>, cuando se consiga mejorar estas técnicas.

## Métodos de tratamiento

Los nuevos métodos de biotratamiento en desarrollo incluyen tecnologías para tratar los hidrocarburos clorados volátiles y los aromáticos ligeros en las aguas subterráneas y en los flujos de aire<sup>8,55</sup>. Center et al.<sup>8</sup> revisaron diversos procesos innovadores para la recuperación de ambientes subsuperficiales contaminados, especialmente flujos que contenían hidrocarburos alifáticos clorados y constituyentes aromáticos ligeros procedentes de productos petrolíferos. Estos investigadores llegaron a la conclusión de que se podía conseguir una separación del 60-90 por ciento utilizando las técnicas existentes. El grado de separación dependía del tipo de material, tipo de sustrato utilizado en el reactor, tasa de flujo, temperatura, y de otros parámetros ambientales relevantes. Obviamente, la investigación adicional conseguirá mejorar el rendimiento.

Venterea y Fogel<sup>55</sup> han estudiado los métodos para la biofiltración de flujos de aire, señalando que la adsorción de los contaminantes mediante carbono, por ejemplo la adsorción de tricloroetileno (TCE), requiere entre 5 y 10 veces más carbono en peso que TCE adsorbido y que el material no cambie, sino que sencillamente se adsorba. En contraste, la biofiltración da lugar a la mineralización del contaminante, sin productos secundarios (p. ej., cloruro de vinilo) que puedan contener propiedades adversas. La técnica ya se ha mostrado eficaz para el tratamiento de flujos gaseosos que contengan bajas concentraciones de compuestos orgánicos.

Se están desarrollando activamente técnicas de biorrecuperación para flujos con altas concentraciones. También se ha utilizado con éxito la biofiltración cuando se usa la ventilación como proceso de recuperación. Un estudio reciente de las Fuerzas Aéreas de Estados Unidos mostró que se conseguía separar 50 g/h de combustible de reactores utilizando un biofiltro<sup>55</sup>. Los costes de inversión y operación para la biofiltración se estiman en más o menos los mismos que para los sistemas de oxidación catalítica. Los costes operativos han supuesto la tercera parte de los costes empleados en los sistemas de adsorción mediante carbono.

El tratamiento de los lixiviados de vertederos es una aplicación cada vez más común en biotratamiento. Con el uso incrementado (y obligatorio) de vertederos con revestimientos, la recolección y tratamiento de los lixiviados presenta múltiples problemas. El tratamiento de modo semicontinuo posibilita el mantener el tratamiento durante periodos de tiempo prolongados. El biotratamiento semicontinuo de un lixiviado de vertedero que contenía un producto químico herbicida fenoxi permitió el tratamiento de una carga diaria media de 1,6 kg de herbicida y de 0,5 kg de fenoles, con una descomposición superior al 98 por ciento para ambos<sup>6</sup>.

El uso de condiciones reductoras en degradación ha permitido abrir un nuevo campo. Actualmente, muchos compuestos halogenados se deshalogenan utilizando organismos anaerobios, después de lo cual se produce rápidamente una ruptura de los anillos bajo condiciones aerobias. Para el tratamiento anaerobio de los residuos se pueden emplear sistemas con lecho fluidizado<sup>50,54</sup>. De hecho, se están desarrollando diversos reactores anaerobios, como el lecho de biomasa con flujo ascendente y el reactor de filtro, para tratar los residuos del azúcar sintético<sup>17</sup>. Las condiciones anaerobias también ayudan a la degradación del cianuro, cuya biodegradación se trató anteriormente<sup>12</sup>.

Los reactores de lecho fluidizado también se utilizan ampliamente para los residuos que se degradan de forma aerobia, incluyendo la degradación de aguas residuales industriales que contienen S-triazina. Se pueden separar hasta 18 g/l de sólidos volátiles en suspensión con las S-triazinas como fuente única de nitrógeno para los microorganismos que llevan a cabo la degradación. Se ha registrado una eliminación máxima del 80 por ciento<sup>19</sup>. También se ha demostrado que los cultivos mezclados de microorganismos degradan la 3,4-dicloroanilina en un reactor fluidizado de tres fases con un rendimiento del 95 por ciento<sup>29</sup>.

Aunque muchas reacciones degradadoras se producen cuando se emplean cultivos en suspensión, puede ser útil el inmovilizar las células antes de empezar el tratamiento. La ingeniería de bioprocesos ha demostrado que la inmovilización conduce a una mayor estabilidad de la reacción, evitando quizás la degradación de los organismos biocatalizadores. Una especie de la *Arthrobacter* (NCIB 11075) inmovilizada cataliza el paso que limita la velocidad de degradación del plomo trimetilo en plomo dialquilo<sup>30</sup>. Se han tratado aguas contaminadas subterráneas durante más de 90 días, con un caudal de flujo de 300 l/día, utilizando un reactor de lecho con células inmovilizadas<sup>46</sup>. También se ha informado de que las células inmovilizadas del hongo *Phanerochaete chrysosporium* degradan el pentaclorofenol<sup>28</sup>.

Aunque no son nuevos, algunos usos bastante innovadores de los métodos tradicionales de degradación, como el compostaje o el tratamiento terrestre, se están mostrando muy útiles para la degradación de los residuos peligrosos. Se pueden lograr mejoras en el rendimiento de estos métodos mediante un perfeccionamiento continuo. El compostaje se ha utilizado para descontaminar fangos que contenían el explosivo trinitrotolueno (TNT), reduciendo el peligro de forma notable. Los datos de un estudio a gran escala en Oregón indican que el compostaje puede ser entre un 50 y un 67 por ciento más barato que la incineración<sup>20</sup>.

## Procesos reglamentarios

Se han producido unos cambios importantes en el marco reglamentario de los procesos de biotratamiento; muchos de estos cambios se han producido a nivel federal, y Giamporcaro los describe en el Capítulo 6. Estos cambios han dado lugar al desarrollo de nuevas técnicas y a una mayor aplicación de los métodos existentes en los trabajos de campo. La aceptación de la bioingeniería desde el ámbito federal ha posibilitado el que se preste una mayor atención a la biodegradación. La presión de esta atención y los costes asociados a los métodos físico-químicos son fuerzas motrices que impulsan el desarrollo de un mayor interés hacia los proyectos de biotratamiento.

Al mismo tiempo, la importancia de la influencia de las normativas estatales y locales sobre el estado actual y las posibilidades futuras de la biorrecuperación es cada vez más evidente. Desgraciadamente, las distintas estructuras reglamentarias estatales y locales han frenado el desarrollo de la industria, ya que las empresas deben estar preparadas para cumplir multitud de normativas ambientales. En algunos casos, las normas federales pueden ayudar al desarrollo sencillamente porque obligan a la limpieza de los residuos. En otros casos, se mezclan o son negativas. En muchos estados los derechos de propiedad no se pueden transmitir de forma legal si no se cubren las responsabilidades respecto a la contaminación<sup>53</sup>, lo que obliga a que la empresa limpiadora ofrezca una serie de garantías sobre el éxito del tratamiento —esto, a su vez, requiere que los ingenieros y biólogos unan sus esfuerzos para desarrollar tecnologías a gran escala que sean factibles, rentables y contrastadas—. Como las alternativas al biotratamiento —incineración, enterramiento, o vertido al mar— ya no tienen el visto bueno del público y son costosas, el biotratamiento se sitúa en el primer lugar como método preferente de recuperación de zonas contaminadas en el futuro.

## Referencias bibliográficas

1. Abramowicz, D. A. 1989. Biodegradation of PCB contaminated soil using recombinant DNA bacteria. In: Proc. A&WMA/EPA Symp., Cincinnati, OH, Feb. 1989, pp. 301-312.
2. Alexander, M., R. J. Wagenet, P. C. Baveye, J. T. Gannon, U. Mingelgrin, and Y. Tan. 1991. Movement of bacteria through soil and aquifer sand. U.S. Environmental Protection Agency, U.S. EPA 600/s2-91/010, June 1991, Washington, D.C.
3. Applied Biotreatment Association. 1989. Compendium of Biotreatment Applications. ABTA, Washington, D.C.
4. Baehr, A. L., J. M. Fischer, M. A. Lahvis, R. J. Baker, and N. P. Smith. 1991. Method for estimating rates of microbial degradation of hydrocarbons based on gas transport in the unsaturated zone at a gasoline-spill site in Galloway Township, New Jersey. In: The Proceedings of the U.S. Geological Survey Toxic Substance Hydrology Technical Meeting, Monterey, CA, March 1991, pp. 129-141.
5. Baker, A. J. M. 1981. Accumulators and excluders-Strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant. Nutr.* 3:643-654.

6. Bhamidimarri, S. M. R., D. Catt, and C. Mercer. 1990. Semi-continuous biotreatment of a landfill leachate containing phenoxy herbicida chemicals. In: CHEMECA 90. Processing Pacific Resources. 18th Australasian Chemical Engineering Conference, Auckland, New Zealand, Vol. II, pp. 1039-1044.
7. Bioremediation Report. 1991. Waste Stream Technology Not Slowed by Winter. Dec. 1991, 1:1-2. Cognis, Santa Rosa, CA 95407.
8. Canter, L., L. E. Streebin, M. C. Arquiga, F. E. Carranza, D. E. Miller, and B. H. Wilson. 1990. Innovative processes for reclamation of contaminated subsurface environments. U.S. Environmental Protection Agency, U.S. EPA 600/S2-90/017, July 1990, Washington, D.C.
9. DePalma, A. 1992. GX Biosystems targets various markets with its suicide gene technology. *Genet. Eng. News*, 12:13, 27.
10. Dwyer, D. F. 1992. Evaluation of GEMs for environmental bioremediation in microcosms and *in situ* (abstract). Biosafety Results of Field Tests with Genetical Modified Organisms, pp. 141-149, Publisher: Biologische Bundesanstalt Fur Land und Forstwirtschaft, Braunschweig, Germany.
11. Dwyer, D. F., F. Rojo, and K. N. Timmis. 1988. Fate and behavior in an activated sludge microcosm of a genetically-engineered microorganism designed to degrade unsubstituted aromatic compounds. Presented at First International Conferences on the Release of Genetically-Engineered Microorganisms (REGEM I). In: The Release of Genetically-Engineered Micro-Organisms. (ed.: M. Sussman, C. H. Collins, A. Skinner, D. E. Stewart-Tull), pp. 77-88, Academic Press, London.
12. Fallon, R. D., D. A. Cooper, R. Speece, and M. Henson. 1991. Anaerobic biodegradation of cyanide under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1656-1662.
13. Fulthorpe, R. R. and R. C. Wyndham. 1991. Transfer and expression of the catabolic plasmid pBRC60 in wild bacteria recipients in a freshwater ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1546-1553. Gealt, M. A. 1988. Recombinant DNA plasmid transmission to indigenous organisms during waste treatment. *Water Sci. Technol.* 20:179-184.
14. Gealt, M. A. 1992. Gene transfer in waste treatment. In: Microbial Ecology: Principles, Methods, and Applications (ed.: M. A. Levin, R. J. Seidler, and M. Rogul). McGraw-Hill, New York, pp. 327-343.
15. Gealt, M. A., M. Chai, K. Alpert, and J. Boyer. 1985. Transfer of plasmids pBR322 and pBR325 from laboratory strains of *Escherichia coli* to bacteria indigenous to the waste disposal system. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:836-841.
16. Glaser, V. 1992. Strong growth in biotechnology market sectors predicted for 1991-2002. *Genet. Eng. News*. 12:3, 6-7.
17. Guiot, S. R., M. F. Podruzny, and D. D. McLean. 1989. Assessment of macroenergetic parameters for an anaerobic upflow biomass bed and filter reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 34:1277-1288.
18. Henschke, R. B., and R. J. Schmidt. 1990. Plasmid mobilization from genetically engineered bacteria to members of the indigenous soil microflora *in situ*. *Curr. Microbiol.* 20:105-110.
19. Hogrefe, W., H. Grossenbacher, A. M. Cook, and R. Hutter. 1990. Biotreatment of s-triazine-containing wastewater in a fluidized bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 28:1577-1581.
20. Horn, S. S. M. 1992. Composting explosivas now competitive. *Bioremediation Rep.* 1(1):1.
21. Homer, F. A., R. S. Morrison, R. R. Brooks, J. Clemens, and R. J. Reeves. Compar-

- tive studies of nickel, cobalt and copper uptake by nickel hyperaccumulators of the genus *Alyssum*. In press.
22. Jahnke, M., T. El-Banna, R. Klintworth, and G. Auling. 1990. Mineralization of orthonilic acid is a plasmid-associated trait in *Alcaligenes* sp. O-1. *J. Gen. Microbiol.* 136:2241-2249.
  23. Kellogg, S. T., D. K. Chatterjee, and A. M. Chakrabarty. 1981. Plasmid-assisted molecular breeding: New technique for enhanced biodegradation of persistent toxic chemical. *Science* 214:1133-1135.
  24. Khalil, T. and M. A. Gealt. 1987. Effect of exogenous compounds on the mobilization of plasmids in synthetic wastewater. *Can. J. of Microbiol.* 33:733-737.
  25. King, J. M. H., P. M. DiGrazia, B. Applegate, R. Buriage, J. Sanseverino, P. Dunbar, F. Larimer, and G. S. Saylor. 1990. Rapid and sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation. *Science* 249:778-781.
  26. Knight, I. T., W. E. Holben, J. M. Tiedje, and R. R. Colwell. 1992. Nucleic acid hybridization techniques for detection, identification, and enumeration of microorganisms in the environment. In: *Microbial Ecology: Principles, Methods, and Applications* (ed.: M. A. Levin, R. J. Seidler, and M. Rogul). McGraw-Hill, New York, pp. 65-91.
  27. Lenski, R. E. 1991. Quantifying fitness and gene stability in microorganisms. In: *Assessing Ecological Risks of Biotechnology* (ed.: L. Ginzburg). Butterworth, Boston, pp. 173-190.
  28. Lin, J-E., H. Y. Wang, and R. F. Hickey. 1991. Use of coimmobilized biological systems to degrade toxic organic compounds. *Biotechnol. Bioeng.* 38:273-279.
  29. Livingston, A. G. 1991. Biodegradation of 3,4-dichloroaniline in a fluidized bed bioreactor and a steady-state biofilm kinetic model. *Biotechnol. Bioeng.* 38:260-272.
  30. Macaskie, L. E. and A. C. R. Dean. 1990. Trimethyl lead degradation by free and immobilized cells of an *Arthrobacter* species and by the wood decay fungus *Phaeolus schweintzii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33:81-87.
  31. Madsen, E. L. 1991. Determining in situ biodegradation. *Environ. Sci. Technol.* 25:1663-1673.
  32. Mancini, P., S. Fertels, D. R. Nave, and M. A. Gealt. 1987. Mobilization of plasmid pHSVIO6 from *Escherichia coli* in a laboratory waste treatment facility. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:665-671.
  33. Mayer, W. 1991. Company profile; Waste stream technology not slowed by winter. *Bioremediation Report Premiere Issue 1-2*, Cognis, Santa Rosa, CA.
  34. Mayer, W. 1992. Bioaugmentation: The bugs used do make a difference. *Bioremediation Rep.* 1:3-6. Cognis, Santa Rosa, CA.
  35. McPherson, P. and M. A. Gealt. 1986. Isolation of indigenous wastewater bacterial strains capable of mobilizing plasmid pBR325. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:904-909.
  36. Miller, R. V. 1992. Overview: Methods for the evaluation of genetic transport and stability in the environment. In: *Microbial Ecology: Principles, Methods, and Applications* (ed.: M. A. Levin, R. J. Seidler, and M. Rogul). McGraw-Hill, New York, pp. 229-246.
  37. Nakamura, Y., K. Itoh, N. Mikami, T. Matsuda, R. Kikuchi, M. Matsuo, H. Yamada, and J. Miyamoto. 1991. A selective plating method to enumerate target microorganisms in an environment. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 37:85-92.
  38. Neidle, E. L., M. K. Shapiro, and L. N. Ornston. 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Acinetobacter calcoaceticus* genes for benzoate degradation. *J. Bacteriol.* 169:5496-5503.

39. Office of Technology Assessment. 1988. New developments in Biotechnology 4. U.S. Investment in Biotechnology. Office of Technology Assessment, Washington, D.C.
40. Olson, B. H. 1991. Tracking and using genes in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 25(4):604-610.
41. Omenn, G. and A. Hollaender (eds.). 1983. Genetic Control of Environmental Pollutants. Plenum Press, New York.
42. Omenn, G. and A. Hollaender (eds.). 1989. Environmental Biotechnology. Plenum Press, New York.
43. Omenn, G. S. and A. W. Bourquin. 1990. Risk assessment of biodegradation in pollution control and cleanup. *Adv. Appl. Biotechnol. Ser. 2*:443-465, Gulf Pubco, Houston, Texas.
44. Pettigrew, C. and G. S. Saylor. 1986. Application of DNA colony hybridization to the rapid isolation of 4-chlorobiphenyl catabolic phenotypes. *J. Microbiol. Methods* 5:205-213.
45. Pierce, G. E. 1982. Diversity of microbial degradation and its implications in genetic engineering. In: Impact of Applied Genetics in Pollution Control (ed.: C. F. Kulpa, R. L. Irvine, and S. J. Sojka). University of Notre Dame, IN, pp. 20-25.
46. Portier, R. J., J. A. Nelson, J. C. Christianson, J. M. Wilkerson, R. C. Bost, and B. P. Flynn. 1989. Biotreatment of dilute contaminated ground water using an immobilized microorganism packed-bed reactor. *Environ. Progr.* 8:120-125.
47. Roberts, L. 1987. Discovering microbes with a taste for PCBS. *Science* 237: 975-977.
48. Saye, D. J. and R. V. Miller. 1989. The aquatic environment: Consideration of horizontal gene transmission in a diversified habitat. In: Gene Transfer in the Environment (ed.: S. B. Levy and R. V. Miller). McGraw-Hill, New York. pp. 223-259.
49. Selvaratnam, S. and M. A. Gealt. 1992. Plasmid gene transfer in amended soil. *Water Res.* 26:39-43.
50. Shieh, W. K., C. T. Li, and S. J. Chen. 1985. Performance evaluation of anaerobic fluidized bed system: III. Process kinetics. *J. Chem. Technol. Biotechnol., Biotechnol.* 35B:229-234.
51. Steffan, R. J. and R. M. Atlas. 1988. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2185-2191.
52. Suflita, J. M. and G. W. Sewell. 1991. Anaerobic biotransformation of contaminants in the subsurface. *Env. Res. Brief* U.S. Environmental Protection Agency, U.S. EPA 600/M-90/024, February, Washington, D.C.
53. Thayer, A. M. 1991. Bioremediation: Innovative technology for cleaning up hazardous waste. *Chem. Eng. News*, Apr. 26, 1991, pp. 23-42.
54. Veeramani, H. 1987. Fluidized bed systems for anaerobic biotechnology in waste management. *Chem. Age India* 38:543-546.
55. Venterea, R. T. and S. Fogel. 1991. Cleaning the air with biofiltration. *ABB J.* 4:6-7.
56. Walia, S., A. Khan, and N. Rosenthal. 1990. Construction and applications of DNA probes for the detection of polychlorinated biphenyl-degrading genotypes in toxic organic-contaminated soil environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:254-259.
57. Weijers, C. A. G. M. and J. A. M., de Bont. 1990. Enantioselective degradation of 1,2-epoxyalkanes by *Nocardia* HB. *Enzyme Microbiol. Technol.* 13:306-308.
58. Wyatt, J. M. and S. J. Palmer. 1992. Biodegradation of nitriles and cyanide. In: Biode-

- gradation: Natural and Synthetic Materials (ed.: W. T. Betts). Springer Verlag, London, pp. 69-88.
59. Zeph, L. R., M. A. Onaga, and G. Stotzky. 1988, Transduction of *Escherichia coli* by bacteriophage P1 in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1731-1737.
  60. Zilinskas, R. A. and C. G. Lundin. 1992. Marine Biotechnology for the Developing Countries. World Bank, Washington, D.C.

# Índice

---

- Acción correctora, 142, 147-154, 165, 166
- Aceite mineral, 163
- Acetona, 188
- Ácido 4-clorobenzoico, 46
- Ácido 2,4-diclorobenzoico, 46
- Ácido 2, 4-liclorofenoxiacético (2, 4-D), 203, 222
- Ácido oleico, 32, 285
- Acta de Agua Limpia, 144, 153, 154
- Acta de Aire Limpio, 268
- Acta de Recuperación y Conservación de Recursos (RCRA), 11, 142, 144, 257
- Acta de Responsabilidad, 142, 154, 257
- Acta Federal Sobre Pestes Agrícolas, 11, 142, 165, 166, 167
- Acta de Control de Sustancias Tóxicas, 11, 142, 159
- Adaptación microbiana, 2-12, 21-33, 50, 75, 87-90, 98, 99, 109, 119, 173-177, 203, 283, 292, 297-299, 307
- Adaptación, 42, 51, 174, 202, 205
- ADN polimerasa  
RCP, 59, 60
- ADN recombinante, 61, 201
- ADN, 201, 316, 317
- de doble hélice, 43, 47-50, 53, 54, 56-62, 123, 124, 161
- de una hélice, 56-62
- Adsorción, 68, 95, 96, 172, 258-260, 261, 263, 264, 265, 317
- Advección, 126
- Aeropuerto Internacional de Miami, 184
- Agencia de Protección Ambiental (EPA, EPA, U.S.A.), 1, 141, 142, 249, 257, 269, 273, 274, 275
- Aguas subterráneas
- cuestiones reglamentarias, 145-147, 150-154, 156, 161
- pH, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 178
- temperatura, 2, 3, 5, 7, 12
- Aireación *in situ*, 28-29, 189
- Aireadores de superficie, 79, 80, 87
- Alaska, 13, 32, 273, 274, 275-278, 280, 281, 283, 289, 293, 297, 304, 310
- Alcaligenos
- A5, 203
- faecalis*, 216
- sp 0-1, 316
- Alcanos, 289, 290, 294
- Alcohol, 188
- Aldehído, 23, 268
- Alemania, 12, 173, 181, 183, 184, 188, 268
- Algas, 27, 87, 99, 109
- Alhelies, 315
- Alifáticos, 201
- Alquilbencenos, 29, 31
- Almacenamiento, 3-5, 9, 14, 25, 27, 72, 119, 142-154, 172, 180, 201, 230, 240
- American Creosote Works, 149, 150, 156-157

- Amianto, 177  
 6-amino-2-metil-4-nitrofenol, 228  
*Amoco Cádiz*, 32  
 Amoniaco, 13, 33, 67, 101, 180, 213-216, 257, 282, 283, 299, 300  
 Amonio, 175, 216, 232, 300  
   cloruro de, 181  
   sulfato de, 179  
 Ampicilina, 44  
 Análogos fluorinados, 44  
 Anilina, 10, 23  
 Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), 166  
 Anóxico, 94, 175, 251, 256, 257  
 Antibióticos, 43, 55  
 Arizona, 212, 213, 218  
 Arrastre por aire, 171, 179  
 Arsenio, 1, 237  
 Asociación de Biotratamiento Aplicado, 165, 166  
 ATP, 119, 131, 177, 178  
 Autolimitación, 122, 129  
*Azotobacter*, 6, 228
- Bacteria acetogénica, 71  
 Bacterias hidrocarbonoclasticas, 173  
 Bacterias que utilizan metano, 23  
 Balance de masas, 92, 117, 118, 125-126, 260  
 Barrow, 32  
 Base Aérea de Hill, 185  
 Base Aérea de Tyndall, 185  
 Benceno, 5, 13, 25, 28, 29, 31, 124, 175, 180, 181, 203, 260, 262  
 Benzoático, 46, 47, 50, 190  
 Benzoato dioxigenasas, 21, 22, 24, 161, 201, 213, 216, 222, 223  
 Bifenilos policlorados (PCBs), 2, 23, 60, 163, 177, 203  
 Bioaumentación, 21, 22, 24, 161, 201, 213, 216, 222, 223  
 Biodisco, 27  
 Biodiscos (RBCs), 100, 315  
 Biodisponibilidad, 11-12, 175, 314
- Bioestimulación, 161, 213, 242  
 Biología molecular, 6, 41, 56-58, 60, 62, 205, 207  
 Biomasa  
   biorreactores, 69-71, 75, 76, 88-90, 94-96, 98-108, 110, 263, 269  
   modelización, 117-128, 132, 133-139  
   tratamiento de aguas residuales, 250, 251, 262  
 Biopelícula, 27, 99-102, 124  
 Bioplume, 178, 180  
 biorreactor, 146, 258, 261-264, 320  
   aerobio, 26, 27, 69, 70, 78, 83, 89, 90, 225, 250, 251, 252, 257  
   anaerobio, 26, 69, 70-74, 188, 251, 252, 262  
   de fangos activados, 27, 69, 72, 88, 89, 250-252, 257-259  
   de filtro perculador, 27, 46, 69, 148, 159, 164, 165  
   de microbios inmovilizados, 69, 74, 76, 83, 148, 158, 164, 320  
   de película fija, 27, 67, 69, 74  
   de película suspendida, 69, 73-74, 75, 189  
   no aerobio, 27, 69, 74, 81, 256  
   superficial, 69, 74, 75-76, 83, 171, 172, 179, 189  
 Biorrecuperación *in situ*, 11, 12, 23, 143, 170, 172, 183, 177, 187, 188, 190, 191, 226  
 Biorrecuperación, 29, 226  
 Biotratabilidad, 180, 212, 216, 218, 219  
 Bioventilación, 171, 185-187, 202, 203  
 Bioventilación *in situ*, 186  
 Boise, 242  
 Bombear y tratar, 31, 176, 179, 190, 267  
 5-Bromouracilo, 43  
 Bromuro de etileno, 174  
 BTEX, 180, 181, 186  
 BTX, 25, 27, 175, 178, 186

- Butilbencil ftalato, 212, 213  
 Butoxietanol, 283
- Cadmio, 177  
 California, 149, 180, 190, 211  
 Características climatológicas, 12  
 Carbono, 3, 12, 22, 29, 32, 46, 87, 105, 107, 170, 213, 217, 229, 238, 267  
 Carbono, fuentes de, 213, 217, 218, 229  
 Carga orgánica, 90, 98, 99, 100, 103, 106, 107, 109, 117  
 Catecol, 49  
 Celgene, 319  
 Centrifugado, 43, 105, 106  
 Cianógenos, 315  
 Cianuro, 1, 314, 315  
 Cianuro, residuos de, 319  
 Ciclo de azufre, 5, 53, 97, 98, 200, 203, 235, 236, 279, 282  
 Cicloserina, 44  
 Cimeno, 44  
 Cinética, 102, 104, 117-122, 127-132, 174, 175, 214, 217, 225, 238, 242, 320  
 4-Cloroanilina, 51  
 3-Clorobenzoato, 50  
 4-Clorobenzoato, 50, 51, 56  
 3-Clorocatecol, 176  
 4-Clorocatecol, 50  
 4-Cloro-2-metilfenol, 190  
 Cloramfenicol, 55, 61, 189, 267, 268  
 Clorobenceno, 13, 51, 61, 189, 267, 268  
 Clorobenzoato, 50-51, 56  
 Cloroorgánicos, 46  
 Cloruro de metileno, 81, 102, 103, 187, 263, 268, 289  
 Cloruro de vinilo, 5, 205  
*Clostridium*, 6  
 Cobalto, 315  
 Cobre, 1, 315  
 Cofactor, 119, 123
- Columna de burbujas, 95  
 Combustible de reactores, 319, 320  
   JP-4, 31, 180, 184, 185  
   JP-5, 29, 157  
 Cometabolismo, 7, 10, 22-24, 121, 131, 132, 189, 202  
 Cometabolito, 121, 122  
 Competencia biológica, 222, 223, 231  
 Compostaje, 9, 10, 26, 27, 72, 199, 202, 203, 224, 225, 241, 320  
 Compuestos alifáticos clorinados, 5, 14, 21, 26, 29, 30, 44, 60, 177, 179, 180, 181-186, 191, 212  
 Compuestos aromáticos clorinados, 111  
 Compuestos fenólicos, 188  
 Compuestos heterocíclicos, 24, 188, 201, 226, 319  
 Compuestos nitro-aromáticos, 225-231  
 Compuestos orgánicos volátiles, 260, 268  
 Conductividad, 172, 180  
 Conroe, 174  
 Consideraciones reglamentarias  
   factores biológicos, 46, 51, 52, 54-57, 176, 177, 186, 200-202, 204, 207  
   legales, 211, 273, 275, 303, 313, 314, 315, 320  
   rutas biológicas, 46, 50, 52, 54-57, 61, 200-202, 204  
   sistemas biológicos, 47, 54-57, 61, 176, 177, 187, 188, 200-202, 204  
 Consorcio, 5, 6, 10, 11, 23, 24, 71, 159, 176-178, 202, 204, 228, 312-314  
 Consorcios, 6, 10, 70, 89, 103, 109, 178, 188, 229, 261, 269, 315, 316  
 Constante de Newton, 77  
 Contaminantes de prioridad, 68, 71  
 Cooxidación, 10, 22  
 Corbett, 99  
 Corporación Nacional de Aplicación de Tecnologías Ambientales, 157

- Coste, 9, 23, 27, 314, 315  
   comparaciones, 2, 3, 11, 143, 239-242  
   estimaciones, 212, 219  
   investigación y desarrollo, 43, 59, 207-208  
   tratamiento convencional, 110, 249, 256, 318  
 Cotransformación, 22  
 Creosota, 5, 25, 174, 186-188, 191  
 Cresol, 2, 62, 174, 228  
 Criseno, 297  
 Cromo, 177, 257  
 Cromatografía de gas, 163, 164, 289, 290  
 CSTR, 92  
 Cultivo, 26  
 Customblen, 33  
 Chakrabarty, 201  
 Choque tóxico, 203
- DCE, 5, 23, 189, 190  
 DDT, 23, 24  
 Decantador, 75, 89, 90, 91, 92-94, 96-98, 100, 101, 104, 105, 250, 258, 262  
 Degradación cometabólica, 23, 24, 131, 132, 204, 205  
 Demanda biológica de oxígeno (DBO), 27, 68, 250  
 Demanda química de oxígeno (DQO), 68  
 Depósitos de almacenamiento subterráneos, 25, 142, 144, 153, 159, 201  
 Descomposición de petróleo, 201, 207, 276, 280, 283, 298, 300, 303, 304, 305  
 Desenzador, 134, 135  
 Desgasificación al vacío, 105  
 Deshalogenación reductora, 24, 122, 190  
 Desnitrificación, 71, 94, 181, 183, 257  
 Destino ambiental, 289
- 3, 4-Dicloroanilina, 10, 23, 320  
 Diclorobenceno, 62  
 Diclorobifenilos, 62  
 Dicloroetileno, 5, 23, 189  
 Diclorometano, 23, 260  
 Difusor de aire, 28, 83  
 Difusores, 83, 86, 87, 90  
 Digestión  
   aerobia, 3-5, 97, 101, 102, 110, 261, 262  
   anaerobia, 3-5, 102, 104, 108, 110, 261, 262  
 Digestores  
   aerobios, 3, 4, 101  
   anaerobios, 3, 4  
 Dimetianilina, 188  
 2, 4-dinitrofenol, 228  
 2, 4-dinitrotolueno, 228  
 Dinoseb, 7, 203, 221, 227-232, 236-240, 242  
 Dióxido de carbono, 70, 89, 95, 101, 102, 105, 110, 227, 250  
 Dioxina, 3, 149, 150  
 Disk Island, 275, 299, 303  
 Diurea isobutiraldehído, 33  
 DNOC, 228  
 Donante de electrones 120, 124, 125, 128  
 DQO, 68, 105-107  
 Duplicaciones, 51-52  
 dUTPasa, 59
- East Bay, 180  
 Edificio de contención, 153  
 Efluente, calidad de, 250  
 Electrodiálisis, 68  
 Elf Aquitaine, 285  
 Ellensberg, 230, 231, 238  
 Emisiones ambientales, 55, 56  
 Emparejamiento, 48, 51, 53  
 Endrin, 259, 260  
 Enriquecimiento, 44, 177, 202, 203, 229, 231, 276, 278, 303, 304, 305  
 Ensayos geotécnicos, 172

- Envirogen, 41, 319  
 Environmental Technology Applications, 170, 188  
 Envirosafe, 240  
 Enzimas inductoras, 10  
 Escala piloto, 260  
*Escherichia coli*, 47, 55  
 Especies de plantas verdes, 315  
 Especificidad, 23, 42, 46, 50, 55, 57, 59, 316  
 Especificidad de sustrato, 46, 50, 57, 59, 60, 316  
 Espectrometría iónica de masas, 296  
 Espesante, 96  
 Esponjamiento, 26, 72, 90, 93, 96, 98, 99, 225  
 Estabilización, 86, 87, 221, 256, 262  
 Estabilizante, 28, 261, 283, 284  
 Estación Aérea de Guardacostas de Traverse, 180  
 Estado provisional, 147-149, 154  
 Estudio de factibilidad, 155, 188  
 Estudios de tratabilidad, 154, 155, 171, 176-178, 187, 188, 222  
 Etano, 189  
 Etanos, 201  
 Etenos, 201  
 4-etilbenzoato, 47-57  
 Etil benceno, 12-13, 28, 180, 184  
 Evacuación terrestre, normas de, 149  
 Exenciones, 150, 152, 303  
 Exenciones nacionales, 151, 152, 167  
 Exxon, 2, 14, 33, 211, 273, 274, 282, 283, 285, 286, 299  
*Exxon Valdez*, 2, 13, 33, 211, 273, 274  
 Fago, 57, 59, 61
- Fangos activados  
   climatización de, 27, 71-73, 76, 83, 88-90, 92, 101, 104, 110, 203, 259  
   proceso de, 27, 71-74, 76, 83, 88-90, 92-101, 104, 108, 110, 127, 133, 253, 257, 259, 262
- Fangos de aguas residuales, 223, 227, 278  
 Fenol, 9, 46, 54, 62, 124, 174, 190, 206, 265, 267  
 Fenotipo, 201  
 Fenoxi, 319  
 Fertilizante, 30, 31, 32, 108, 280-284, 297-300  
 Fertilizante oleofilico, 31, 32, 273, 274-285, 287  
 Fijación, 205, 219  
 Filtración de arena, 68  
 Filtro percolador, 4  
 Fitano, 290, 292, 293-297, 302  
 Flotación, 68  
 5-fluorosalicilato, 44  
 Fluoranteno, 5  
 Formamido, 315  
 Fosfato, 31-33, 103, 175, 180, 222, 229-232, 282-284, 300, 301  
 Fósforo, 7, 13, 21, 29, 30, 32, 70, 276, 280-285, 297  
 Fósforo total, 285  
 Francia, 32, 284  
 Ftalato, 211-216, 218, 263  
 Fuel, 30  
 Fuerzas aéreas, 185, 319  
 Fusiones, 51
- GAC, 9, 262-264, 268  
 Gasóleo, 28, 283, 317  
 Gasolina, 5, 10, 28-30, 173, 179, 180, 184, 185, 242  
 Genes suicidas, 206  
 Geoquímica, 172, 173, 175, 177  
 Glucosa, 70, 229  
 Guardacostas, 29, 180, 181, 183
- Halobenzoatos, 50  
 Herbicidas, 5, 6, 227, 230  
 Hidratasa de cianuro, 315  
 Hidrocarburos  
   alifáticos, 5, 14, 22, 29, 30, 186, 319  
   aromáticos, 5, 14, 22, 24-26, 29, 30, 44, 177, 186, 318, 319

- Hidrocarburos (*cont.*)  
   de petróleo, 5, 14, 22, 24, 30, 174, 179-185, 202, 212, 273-300, 303  
   no petrolíferos, 4, 14, 22  
 Hidrocarburos aromáticos policíclicos, 26, 296  
 Hidrocarburos clorinados, 22, 24  
 Hidrocarburos halogenados, 23, 24, 31, 44, 48, 50, 189, 201, 226, 319  
 Hidrocarburos poliaromáticos, 5, 14, 177, 186  
 Hidrocarburos ramificados, 287, 289, 296  
 Hidrología del lugar, 12  
 Hidroxibenzoatos, 44  
 Hidroxilamina, 43  
 Hierro oleofílico, 31, 32  
 Historias de casos, 211  
 Holanda, 184, 268  
 Homestake Chemical Company, 315  
 Homogeneización, 68  
 Hongo «carne de gallina», 184, 229  
 Hopano, 295, 299  
 HPAs cancerígenas, 186-188  
 Humedad, 7, 9, 12-13, 21, 26, 171, 184-186, 214, 223, 225, 268  
 Húmicos, 186  
*Hyphomicrobium*, 102  
  
 Imperial Chemical Industries, 315  
 Implantación en el campo, 206, 214, 217  
 Inactivación insercional, 54  
 Incineración, 15, 67, 143, 149-152, 164, 179, 201, 221, 227, 239, 242, 262  
 Inductor, 10, 46, 47, 61, 123, 189  
 Inductores de dioxigenasa, 189  
 Informe de decisión (IDD), 156  
 Ingeniería genética, 15, 47, 48, 50, 52, 56, 162, 201, 204-207, 316, 317  
 Inhibición de sulfato, 215  
 Inhibidores, 122, 129, 131, 132, 175  
  
 Inipol, 32, 33, 284-287, 290, 294, 296, 298, 310  
 Inoculación microbiana, 2, 5, 7, 9, 12, 32, 75, 92, 207, 309, 310  
 Inquietud del público, 3, 315, 316  
 Insecticidas, 190  
 Instalación de tratamiento completamente cerrada, 147  
 Instalación de tratamiento móvil, 241  
 Intergenérico, 161  
 Introducción secuencial, 313  
 Inventario de sustancias químicas, 160  
 Inversiones, 51  
 Investigación de recuperación, 156, 212  
  
 Kanamicina, 55  
 Karlsruhe, Alemania, 186  
 Keystone, 12, 13, 15  
  
*LacZ*, 55  
 Laguna  
   aireada, 27, 87, 110  
   facultativa, 27, 88, 109  
   sistemas de, 27, 88, 102, 103, 110  
 Lagunas  
   aerobias, 33, 87  
   anaerobias, 70, 102, 103  
   de estabilización, 70, 87  
   facultativas, 70, 103, 109  
 Larvas de insectos, 99  
 Laurilfosfato, 32, 284  
 Lecitina de soja, 32, 283, 284  
 Lechos bacterianos, 99  
 Ligninas, 186  
 Lista de Prioridades Nacionales (NPL), 142  
 Lixiviación, 3, 4, 148, 179, 289, 296  
 Long Island, 180  
  
 M13, 57, 59  
 Magnesio, 9, 25, 31, 68, 92, 103, 105, 110, 134, 135, 181-185, 203, 231, 262, 315

- Mancha contaminada, 31, 173, 181, 185, 186, 188-190  
 Marco Coordinado para la Regulación de la Biotecnología, 161  
 Marina, 25, 26, 29, 31, 33, 174, 258, 283, 314, 315, 316  
 Material de relleno, 74, 75, 80, 106  
 Mecanismos de destino, 258  
 Mercurio, 152, 177, 257  
 Metabolismo endógeno, 127  
 Metales pesados, 53, 54, 258, 260, 315  
 Metano, 14, 23, 29, 70, 71, 103-110, 122, 181-190, 206, 256, 262, 263  
 Metano monooxigenasa, 23, 122, 189, 190  
 Metanogénicos, 23, 24, 71, 188, 190, 256, 262, 315  
 Metanógenos, 24, 71, 103, 108, 229  
 Metanosulfonato de etilo, 43  
*Methylococcus capsulatus*, 23  
 3-metilsalicilato, 50  
 Metil metanosulfonato, 43  
 Mezclas de materiales tóxicos, 316  
 Microbios autóctonos, 10  
 Microcosmos, 287, 304-308  
 Microorganismos  
   naturales, 3, 10, 21-33, 41-46, 48-56, 59, 60, 62, 87, 119, 120, 159-174, 200, 305-306  
   psicrofílicos, 3, 87, 317  
   psicrotolerantes, 3, 87, 317  
   termofílicos, 3, 87, 89, 317  
   termotolerantes, 3, 87, 317  
 Microorganismos nuevos, 161, 162-163  
 Michigan, 29, 180, 181  
 Minerales, 12, 13, 160  
 Mineralización, 11, 13-15, 24, 42, 87, 174, 176, 177, 200-202, 227, 268, 278, 279, 303, 314, 316  
 MMGs (Microorganismos Modificados Genéticamente), 2, 56, 223, 315, 316, 318, 319  
 Modelos, 117, 119, 259, 260, 318, 319  
 Modificación microbiana, 2, 5, 7, 9-13, 31, 32, 48, 75, 76, 201, 207  
 Modulador, 121, 123  
 Moffit Field (base aérea), 190  
 Monod, 92, 128, 129, 130, 131  
 Monofluoroacetato, 316  
 Monooxigenasa, 23, 61, 121, 122, 123, 190  
 Morrison Knudsen Company, 242  
 Movilización  
   metales, 48, 177  
 MTDD, 151, 152, 156, 167  
 Municiones, 27, 204, 205  
 Mutagénesis, 6, 42-44, 46, 47, 51, 56, 57, 60, 200, 201, 204  
 Mutágenos, 41-44, 46, 54, 204  
  
 N-C18/fitano, relaciones de, 290, 295-297  
 Naftaleno, 25, 51, 61, 62, 188, 201, 317  
 NET (Normas de Evacuación Terrestre), 151, 153  
 Neutralización, 68  
 Níquel, 315  
 Nitrato, 24-31, 71, 103, 175, 178, 181, 183, 188, 216, 226-232, 242, 256, 257, 282, 283, 300  
 Nitrato de sodio, 103, 181, 183  
 Nitrificación, 94, 257  
 Nitrobenzeno, 260  
 4-nitrofenol, 228  
 Nitrógeno  
   ambiente limitador de nitrógeno, 7, 29, 33, 103, 213-216, 222, 276  
   como nutriente, 13, 24, 20, 276-285  
   en reactores, 68-71, 175  
   receptor de electrones, 181, 183  
 Nitrógeno oleofílico, 31, 32, 283-285  
 4-nitroquinoleína, 43  
*Nocardia* sp. HB 10, 315, 316  
 Norhopano, 296,

- Normas, 9, 12, 13, 57, 144, 149-156, 167, 241, 242, 295  
   estatales, 241, 242, 314, 315, 320  
   federales, 11, 12, 142, 144, 146-150, 152, 153, 154, 163-167, 223, 227, 241, 242, 268, 314, 315, 320  
 Normas de mezcla, 145  
 Notificación de comienzo, 160  
 Nucleación de hielo, 205  
 Nueva York, 180, 283  
 Nuevas sustancias químicas, 159-161  
 Números microbianos, 2, 12, 21, 33, 71, 75, 92, 98, 109, 119, 203, 298, 309  
 Nutrición de acuífero, 30  
 Nutriente  
   aumento de, 14, 21, 33, 280-283  
   control de niveles de, 9, 68, 88, 172  
   disponibilidad de, 177-190, 222-226  
   tratamiento terrestre con, 7
- Octano, 201  
 Octil fosfato, 31, 32  
 Oficina de Evaluación Tecnológica, 33, 158  
 Oficina de Investigación y Desarrollo, 158, 274, 275, 304  
 Operón, 52  
 Organismos autotróficos, 87  
 Organismos modificados, 6, 202  
 Organismos modificados genéticamente (véase OMGs)  
 Ósmosis inversa, 68  
 Oxidado, 22, 101, 102, 127, 132, 172, 173, 175, 216, 228  
 Oxigenasa, 25, 298  
 Oxígeno  
   solubilidad de, 7, 12-14, 25, 28, 69, 70, 79, 80, 85-88, 93-95, 226, 229, 280  
   líquido, 7, 12-14, 28, 71, 99, 226  
   transferencia de, 7, 26, 27, 33, 69, 70, 77-88, 93-95, 121, 122, 177-183, 229, 251, 252, 280  
 Oxígeno complementario, 24, 215
- PCBs, 14, 62, 163, 164, 165, 177  
 Penicilina, 43, 44  
 Pensacola (Florida), 188  
 Pensilvania, 1, 169, 179, 199, 313  
 Pentaclorofenol (PCP), 5, 187, 188, 200, 225, 320  
 Período evolutivo unitario (PEU), 205  
 Permiso de Investigación, Desarrollo y Demostración (ID&D), 153  
 Permisos I&D, 164-165  
 Peróxido de hidrógeno, 13, 28, 29, 178, 180, 181, 183, 226  
 Pesticidas, 22, 24, 60, 145, 158, 159, 201, 205, 227  
 Petróleo, 2, 5, 21, 25-33, 61, 68, 142, 153, 157, 163, 164, 174, 179-185, 191, 202, 211, 212, 213, 219, 223, 273-310  
 Petróleo crudo, 26, 29, 32, 61, 200, 211, 276, 283, 284, 287, 296, 297  
 pH, 7, 9, 12, 30, 68, 70, 178, 214, 222, 231, 236-238, 242, 316  
*Phanerochaete chrysosporium*, 190, 228, 320  
 Plantas de coque, 186, 187, 188  
 Plantas resistentes a herbicidas, 205  
 Plásmido, 6, 46, 59, 61, 62, 123, 124, 201  
 Plásmido «ayudante», 47  
 Plásmido pUC, 61  
 Plásmidos catabólicos, 174, 211  
 Playas, 5, 33, 273, 274, 276, 280-283, 286, 288, 291, 294, 299, 300, 310  
 Polietileno, 242  
 Polietileno de alta densidad, 242  
 Polimerización, 14, 229, 232  
 Polímeros, 14  
 Poliuretanos, 227  
 Porosidad de lecho, 82

- Potasio, 1, 175  
 Potencia, 77-78, 83, 84, 88, 90, 94, 95, 102, 103, 109, 127  
 Prall's Island, 283  
 Prevención de contaminación, 141, 143, 157  
 Pristano, 290  
 Proceso de contacto, 104  
 Proceso semi-continuo, 74  
 Programa de aplicación *in situ*, 158  
 Programa de investigación de los derrames de petróleo, 306  
 Promotor Pm, 47  
 Promotores, 54, 61  
 Propano, 190  
 Proteína GEF, 315, 316, 318  
 Protocolos  
   de biorrecuperación, 157, 303, 305, 306  
   de seguridad, 204, 205, 206, 276, 303, 305, 306  
*Protonoforos*, 131  
 Prudhoe Bay, 32, 277, 285, 288, 291, 296, 297  
*Pseudomonad*, 6, 53, 190, 229  
*Pseudomonas*  
   *B13*, 6, 50-51, 56, 201  
   *cepacia*, 6, 9  
   *fluorescens*, 6, 9, 10  
   G4, 6  
   LB400, 6, 9  
   *P. cepacia* G4, 189  
   p51, 6  
   *putida*, 6, 9, 44, 50, 51, 62  
   sp., 6, 10, 53, 201, 205, 228, 316  
   *stutzeri*, 188  
 Rabia, 205  
 Radiación, 42, 43, 46, 107  
 Reacción en cadena polimerasa (RCP), 59, 316  
 Reactores, 76-109, 270, 319  
   aerobios, 26, 82-86, 93, 102, 254  
   agitados, 77, 82-86  
   aireados en superficie, 9, 75-76, 86, 87  
   anaerobios, 82-86, 108, 251, 252, 256, 265  
   anaerobios/aerobios, 111-112  
   Bayer tower, 24, 83-86  
   BIOHCOH, 83-86, 95  
   continuos, 83-86, 232-238  
   de aire ascendente, 83-86  
   de biodiscos, 9, 69-74, 76, 85  
   de chorro, 83-86, 157  
   de chorro zambullidor, 83-86  
   de fangos activos, 83-86, 93, 251, 252, 256  
   de flujo pistón, 74, 83-86  
   de lechada, 9, 97, 111, 112, 225, 232-238  
   de lecho bacteriano, 9, 76  
   de lecho fluidizado, 76, 83-86  
   de lecho relleno, 83-86  
   de mezcla completa, 9, 74, 88, 90, 97, 98, 232-242  
   de pozo profundo, 83-86  
   encerrado, 83-86  
   secuenciales discontinuos, 9, 74, 97, 98  
 Recalcitrante, 21, 23, 50, 62, 71, 90, 177, 186, 201-205, 221-228, 231, 242  
 Receptor de electrones, 13, 29, 71, 120, 128, 171, 175, 178, 181, 183, 229, 230  
 Recirculación, 74, 75, 92, 94  
 Redox, 21, 25, 176-178, 188, 222, 229, 231, 232, 235-238, 242  
 Reilly, William, 2, 143, 158  
 Relaciones alcanos, 289  
 Rendimiento, 27, 33, 156-158, 164, 165, 166, 200, 201, 278, 286-289, 295, 303, 308, 317  
 Residuos, 2-7, 9, 15, 21, 170, 261  
   de pesticidas, 227-229, 239  
   lista de California, 149  
   normas, 144-147, 149-153, 161, 164  
   organismos modificados, 205, 206  
   tratamiento convencional, 170, 177, 201, 249-253, 256, 264-268

- Residuos costeros contaminados con petróleo, 10, 26
- Residuos listados, 144-146
- Residuos sólidos, 72, 144-146, 148, 149, 152, 153, 164, 251, 252
- Respiración de nitrato, 188
- Respuesta a dosis, 299, 303, 304
- Rhizobium*, 205
- Riesgo no razonable, 159, 162
- Ruta clorocatecol, 50
- S-triazinas, 320
- Salicilato, 44, 201
- SARA, 156
- Secuencias de inserción, 55
- Sedimentación, 68, 96, 97-98, 103, 105, 250
- Segundo Tercio, 149, 150
- Seguridad, 4, 7, 11, 206, 233, 241, 242, 274, 275, 314, 215, 316
- Selección, 4, 7, 13, 42, 50, 53-55, 59, 174, 180, 181, 200-206, 239, 261
- Selección genética, 4, 204
- Selenio, 257
- Sembra, 21
- Separador de fangos, 89
- Sierra Chemical Company, 223, 227, 281, 282
- Simulación, 205, 259, 279
- Síntesis letal, 44
- Sistema Nacional de Permisos para el Vertido y Eliminación (NPDES), 144
- Sistemas discontinuos, 72
- Sistemas mezclados, 90, 108, 109
- Sistemas microbianos, evolución de, 2-12, 21-32, 49, 87-90, 98, 99, 109, 201, 203, 207, 213, 308
- Snug Harbor, 275, 281, 287
- Sobrecarga hidráulica, 71
- Sólidos  
 en suspensión, 67, 83, 102, 103, 107, 124, 250  
 flotación, 67, 103, 107  
 sedimentación, 68, 75, 88, 89, 93, 96, 103, 107, 250
- St. Louis, 188
- Streptomyces*, 43
- Subsuperficie, 12, 24, 33, 171, 172-180, 190, 191, 387, 299, 319
- Subtilisina, 57, 59, 319
- Succinato, 46
- Suelo  
 composición, 1-3, 170-172, 179, 180, 181-188, 221-223, 225-233, 315-317  
 fertilización, 1-3, 24-33, 72, 170-172, 212-216, 235-242  
 lechada, 1-3, 10, 27, 30, 170-172, 181-188, 221-223, 225-233, 235-242  
 normativas de limpieza, 143, 146, 151, 152, 153, 155, 156, 161, 164, 167  
 tipo, 1-3, 10, 12, 31, 72, 170-172, 181-188, 212-216, 221-223  
 tratamiento, 1-12, 24, 33, 72, 156, 161, 164, 170-172, 183-188, 212-216, 221-223  
 ventilación, 1-3, 170-172, 181-188
- Suelo y escombros contaminados, 151, 152, 156, 167
- Sulfuro de hierro, 233
- Superfondo, 1, 142, 149-166, 188, 257, 263, 265
- Supervisión, 7, 13, 29, 30, 148, 153, 172, 173, 180, 181, 185, 186, 226, 237, 241, 242, 316-319
- Sustrato primario, 120-122, 129, 132-136
- Sustrato secundario, 117, 120-121, 125, 126, 129, 131, 132-137
- Sustratos secundarios de baja concentración, 121
- Tasa de oxigenación, 86
- Tasa de respiración, 92

- Técnicas convencionales, 68, 97, 98,  
100, 142, 151, 201, 202, 239, 250,  
256-261
- Tecnología de reactores, 9
- Tecnologías innovadoras, 150, 156,  
157, 159
- Tecnologías nuevas, 158
- Tejas, 174, 239
- Temperatura, 7, 12, 27, 53, 70, 72, 87-  
90, 100-104, 108, 109, 177, 180,  
181, 213-218, 222-226, 232, 306,  
308, 315-317
- Tendencias, 276, 313
- Tetracloroetileno, 5, 24, 190
- Tetracloruro de carbono, 13, 24, 190
- Tiempo, 87, 95, 104, 108, 128, 134-  
137, 176
- Tiempo de contacto, 7
- Tiempo de mezcla, 69
- Tiempo de retención, 70, 71, 75, 92, 94,  
98, 102, 103, 259, 262, 263, 265, 268
- TNT, 27, 190, 225, 227-229, 241, 242,  
320
- TOL
- genes, 50
  - plásmido, 6, 47, 51, 54, 56
  - ruta, 47, 50
  - sistema, 46, 47, 49, 50, 56
- Toluato 1, 2-dioxigenasa, 56
- Tolueno, 5, 6, 28, 54, 61, 62, 175,  
181, 213-218, 222-226, 307, 310,  
315-317
- TPH, 186
- Transferencia de genes, 60, 316
- Transformación, 6, 22, 110, 118, 121-  
124, 126, 128, 131-133, 176, 177,  
202, 222, 228, 233
- Transporte, 3, 7, 12, 124, 131, 132,  
165, 166, 167, 180, 181, 202, 226,  
239, 269, 300, 303, 317
- Transposasa, 55
- Transposón, 43, 51
- Tn5, 51, 56
  - tn501, 51, 56
  - tn1721, 51-56
  - tn4655, 51-56
  - tn5271, 51, 56
  - tn5280, 51, 56
- Tratamiento, 2, 4, 9, 13, 15, 22-33, 43,  
44, 54, 67-77, 80-82, 85-89, 95-  
103, 107-111, 118, 127, 142-159,  
163-166
- Tratamiento acuoso, 226
- Tratamiento alternativo, 149, 150,  
156-157
- Tratamiento biológico, 3, 4, 67, 68,  
70, 87, 200, 221, 225, 250-253,  
258, 260, 265, 269
- Tratamiento de aguas residuales, 27,  
68-74, 76, 80-82, 85-88, 96, 98,  
103, 107, 108, 109, 148, 163, 164,  
200, 203, 225, 249-252, 261-268
- Tratamiento del terreno, 30, 148
- Tratamiento *in situ*, 10, 15, 164, 172,  
188, 226, 242
- Tratamiento primario, 68, 101, 102,  
108, 109, 250, 251
- Tratamiento secundario, 68, 151, 250,  
256, 261, 267
- Tratamiento terciario, 68
- Tratamiento terrestre, 4, 7, 15, 199,  
203, 223, 225, 238, 242, 320
- Triclorobenceno, 203
- Tricloroetileno, 5, 23, 54, 151, 190,  
205, 259, 319
- 2, 4, 6-Trinitrotolueno, 190, 225
- Trinitrotolueno (*véase* TNT)
- Turbinas de discos, 77
- Tyvek, 234
- Unidad de gestión de residuos sólidos,  
149
- Uracil glicosidasa, 59
- Urea, 32, 212-216, 283, 284
- Urea parafinizada, 32, 285
- UV, 46
- Vaccinia, 205
- Valle del Rhin, 13, 181, 183

- Vanadio, 257  
Velocidad de fluidización, 82  
Vertedero de residuos, 1  
*Vibrio harveyii*, 319  
Victawet, 285  
VISITT, 157  
Visqueen, 236  
Vitrificación, 152, 201, 221  
Volatilización, 258-260, 267, 268, 289
- Waste Stream Technologies, 316  
  
Xileno, 28, 62, 181  
XylE, 55  
XylS, 47, 56  
  
Zona vadosa, 171, 172, 184-186

