UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE MINAS Y
ENERGÍA

COMPARATIVA DE MÉTODOS DE
DESCONTAMINACIÓN DE SUELOS
AFECTADOS POR HIDROCARBUROS.
APLICACIÓN A LA OBRA DEL AVE DE
MÁLAGA

TESIS DOCTORAL

María José Herrero Peña
Ingeniero de Minas

2016

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS ENERGÉTICOS

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE MINAS Y
ENERGÍA

COMPARATIVA DE MÉTODOS DE
DESCONTAMINACIÓN DE SUELOS
AFECTADOS POR HIDROCARBUROS.
APLICACIÓN A LA OBRA DEL AVE DE
MÁLAGA

Autor:

María José Herrero Peña, Ingeniero de Minas

Director

Juan Pous de la Flor, Dr. Ingeniero de Minas

2016

ÍNDICE

I Resumen.....	5
II Abstract	5
1. Introducción.....	6
2 Antecedentes.....	6
3 Real Decreto 9/2005.....	9
4 Análisis de alternativas. Precedentes del trabajo.....	10
4.1 Descripción del estado actual de la ciencia y tecnología.....	15
5 Biorremediación.....	18
5.1 Introducción.....	18
5.2 Antecedentes.....	19
5.3 Ámbito de aplicabilidad.....	21
5.4 Ventajas e inconvenientes de la biorremediación.....	22
5.5 Factores que determinan la eficacia de la biorremediación.....	23
5.6 Aproximaciones metodológicas.....	26
5.7 Técnicas “in situ” y “ex situ”.....	32
5.8 Otros aspectos de interés en relación con la biorremediación.....	33
5.9 Proceso de toma de decisiones e implantación de tecnologías.....	38
5.10 Conclusiones y perspectivas.....	41
6 Contenido del proceso objeto de estudio.....	41
6.1 Demostración en planta piloto de la funcionalidad de los desarrollos.....	46
7 Etapas posteriores al trabajo.....	48
8 Realizar calicatas y análisis para caracterizar el terreno y localizar los hidrocarburos existentes en el mismo.....	49
8.1 Planificación de catas y toma de muestra de suelo y agua.....	50
8.2 Toma de muestras de los suelos en calicatas.....	50
8.3 Localización de los puntos de muestreo.....	52
8.4 Densidad del muestreo.....	52
8.5 Toma de muestras de agua.....	52
8.6 Evaluación de los problemas medioambientales.....	53
8.7 Comparación de los resultados.....	57
9 Colocación de planta piloto, geotextil, arado y riego.....	59
10 Colocación de pilas de landfarming de investigación, una con abonos y nutrientes típicos, otra con hidróxido de magnesio y otra con mezcla de ambas. Definición de operaciones periódicas de mantenimiento y análisis.....	60
10.1 Diseño y ejecución de los tratamientos.....	60
10.2 Muestreos y metodologías analíticas.....	68
10.3 Resultados generales.....	72
10.4 Conclusiones y recomendaciones.....	85
11Bibliografía.....	89

I RESUMEN

El objetivo de esta tesis, va a ser la investigación y desarrollo de tratamientos de biorremediación para conseguir la recuperación de los terrenos contaminados situados en el tramo del tren de alta velocidad entre Córdoba y Málaga, reduciendo de esta forma los residuos enviados a vertederos.

Para ello, se va a investigar y a desarrollar una tecnología innovadora de descontaminación in situ de suelos con altas concentraciones de hidrocarburos, basándonos en el landfarming y como principal avance la coexistencia con hidróxido de magnesio, elemento no utilizado nunca y potencialmente muy útil.

Se va a pretender reducir la concentración final de hidrocarburos y el tiempo de tratamiento, sin transportar a vertedero los residuos.

Se desean conseguir las condiciones ambientales óptimas que permitan potenciar la degradación microbiana de los hidrocarburos y sus productos residuales en corto tiempo

Se va a investigar el empleo del hidróxido de magnesio como complemento al landfarming y a buscar las sinergias de este compuesto como gran fijador de metales pesados.

II ABSTRACT

The aim of this thesis will be the research and development of bioremediation treatments for the recovery of contaminated land in the stretch of the high speed train between Cordoba and Malaga, thereby reducing waste sent to landfills.

To do this, is to research and develop innovative technology for in situ remediation of soil with high concentrations of hydrocarbons, based on the main progress landfarming and coexistence with magnesium hydroxide, item never used and potentially very useful.

It will pretend to reduce the final hydrocarbon concentration and treatment time, without transporting waste landfill.

They want to get the optimum environmental conditions for enhancing microbial degradation of hydrocarbons and waste products in a short time

It will investigate the use of magnesium hydroxide as a complement to landfarming and seek synergies of this compound as a great fixer of heavy metals.

1. INTRODUCCIÓN

Las tecnologías de descontaminación de suelos derivan de la creciente presencia de contaminación edáfica y de sus desastrosos efectos ambientales.

Uno de los impactos ambientales más frecuentes es la contaminación de los suelos por vertido de hidrocarburos.

Existen actualmente variadas e importantes tecnologías de descontaminación de suelos (1) para dar solución a este problema edáfico tan importante, pero no todas satisfacen en cuanto a tiempos, condiciones de tratamiento y resultados finales se refiere.

En las actividades de recuperación de suelos se deben utilizar las mejores técnicas disponibles (4) para minimizar y eliminar riesgos.

En el trazado del nuevo acceso ferroviario a Málaga, entre los puntos kilométricos 1,550 y 1,950, se ha determinado la presencia de hidrocarburos petrolíferos en el suelo. El origen de estos hidrocarburos parece estar ligado a la actividad de la antigua terminal del oleoducto Málaga-Puertollano.

2. ANTECEDENTES

En un tramo del proyecto básico y constructivo de la plataforma y vía ferroviaria de alta velocidad Córdoba-Málaga, se ha determinado la presencia de hidrocarburos petrolíferos en el suelo; cuyo origen parece estar ligado a la actividad de la antigua terminal del oleoducto Málaga-Puertollano.

El 6 de octubre de 1965, se inaugura el oleoducto entre Málaga y Puertollano, con 2 estaciones de bombas, una en Málaga y otra en Montoro (Córdoba), en el margen derecho del río Guadalquivir. Fue la primera instalación de su clase puesta en España.

267kilómetros de longitud creados para abaratar los costes de transporte de productos petrolíferos ligeros en una cuarta o quinta parte respecto al transporte por ferrocarril o por carretera.

Para la construcción del oleoducto, se realizó:

1. Suministro de tubería para la línea
2. Colocación y tendido de dicha tubería
3. Estaciones de bombas
4. Instalaciones de descarga y almacenamiento en Málaga. Instalaciones auxiliares, telecomunicaciones y protección catódica

El trazado en planta de un oleoducto, puede ser notablemente más recto que el de un ferrocarril o una carretera y es, en cierto modo, parecido al de una línea eléctrica de alta tensión. Conviene evitar las medias laderas, que dificultan la construcción y pueden dar origen a deslizamientos del terreno, es decir, deben seguirse las máximas pendientes. Para la construcción hay que ejecutar una pista provisional por la que ha de avanzar la maquinaria de los tajos.

El trazado del oleoducto Málaga-Puertollano, fue difícil por discurrir en gran parte por terreno accidentado o montañoso; en cambio, cruzaba por zonas de poca densidad de población y comunicaciones y con cultivos no muy ricos.

En la figura 2 se observa el trazado del oleoducto Málaga-Puertollano.

Figura 2. Planta del oleoducto Málaga-Puertollano

El oleoducto Málaga-Puertollano, cumplió con sus funciones hasta el 31 de marzo de 2000 cuando dejó de funcionar después de treinta y cinco años de servicio.

El 16 de febrero de 2000 se pone en marcha el nuevo oleoducto Cartagena-Puertollano, sustituyendo de esta forma al que discurría entre Málaga y Puertollano.

Tras la construcción del nuevo oleoducto entre Cartagena y Puertollano, se procedió al desmantelamiento de las instalaciones de almacenamiento y vertido de petróleo en Málaga, clausurando instalaciones contaminantes.

El nacimiento del proyecto del oleoducto Cartagena-Puertollano, encontró su justificación en el desarrollo urbano de la ciudad de Málaga. Las instalaciones de Repsol YPF en el puerto de la ciudad y en sus inmediaciones, ubicadas inicialmente en la periferia de Málaga se vieron inmersas en el pujante desarrollo de su núcleo de población.

3. REAL DECRETO 9/2005

El Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, (90) establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.

De acuerdo con este Real Decreto, un suelo puede ser declarado como contaminado por las autoridades competentes cuando el análisis de riesgo indique que las concentraciones de compuestos orgánicos suponen un riesgo inaceptable para la salud humana. En aquellos casos en los que no se dispone de un análisis de riesgo, las autoridades competentes pueden declarar un suelo como contaminado cuando la concentración de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) excede los 50 mg/kg.

En el presente trabajo, el interés se centra en los suelos potencialmente contaminados en el tramo de integración del ferrocarril en Málaga, en la zona anexa a la antigua terminal del Oleoducto Málaga- Puertollano.

Interesa la ausencia de compuestos orgánicos volátiles como benceno, tolueno, etilbenceno o xileno y la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos en concentraciones inferiores a las determinadas como Niveles Genéricos de Referencia por el Real Decreto 9/2005.

Según el Real Decreto 9/2005 los criterios para la evaluación de la calidad del suelo son:

NIVEL	DESCRIPCIÓN
Concentración < NGR	Condiciones aceptables para el uso del suelo propuesto
Concentración > NGR TPH > 50 mg/kg	Condiciones inaceptables para el uso del suelo propuesto. Se requiere análisis de riesgos para evaluar el riesgo que entraña el uso del suelo propuesto. En el caso de que el análisis indique la existencia de un riesgo inaceptable, las autoridades competentes considerarán el emplazamiento como contaminado.
Concentración 100 > NGR	Condiciones inaceptables para el uso del suelo propuesto. El suelo puede ser considerado como contaminado por las autoridades competentes en caso de no disponer de una análisis de riesgo. Se requerirá un plan de saneamiento aprobado por las autoridades competentes

4. ANÁLISIS DE ALTERNATIVAS. PRECEDENTES DEL TRABAJO

Se va a tratar de valorar la elección de un tratamiento de biorremediación (3), (5), (6), (10) de los suelos contaminados afectados, en el tramo de integración del ferrocarril en Málaga a su paso por la antigua terminal del oleoducto Málaga-Puertollano.

Para la realización de este estudio preliminar se va a requerir información de diversa naturaleza:

- Estudio químico: se va a realizar sobre los contaminantes. Se va a valorar el estado del contaminante o contaminantes presentes y su evolución. Se va a pretender averiguar en qué medida hay presentes fracciones biodegradables y si ha existido o no anteriormente un proceso de atenuación natural.
- Estudio microbiológico: se va a realizar sobre los microorganismos. Se va a valorar en cantidad y cualidad a los microorganismos (bacterias básicamente) presentes en el medio afectado, de modo que se detecte su capacidad potencial para degradar los contaminantes.
- Estudio agronómico: se va a realizar sobre el suelo afectado. Se van a

valorar las texturas, presencia de nutrientes y otros parámetros necesarios para conocer si las condiciones para la biorremediación son adecuadas, dando especial importancia a la perfecta climatología del sur de España.

Una vez realizadas las pruebas correspondientes, se puede concluir que el terreno de ensayo a gestionar o tratar, se corresponde con la siguiente litología, de techo a muro:

- Balasto y relleno de la antigua línea ferroviaria. Capa muy permeable y de afección moderada.
- Arcilla rojiza arenosa. Se excavará hasta el nivel freático y es la más afectada.
- Arenas y gravas. Aparece un nivel de agua semiconfinado con presencia de producto libre.
- Arenas finas limosas.
- Arcillas de color marrón compactas.
- Arcillas de color gris verdoso.

La unidad de interés es la arcilla rojiza arenosa, la cual se deberá excavar en su mayoría y tiene un fuerte impacto de crudo. Tiene un contenido en finos entre el 37 y el 100%, una conductividad hidráulica de 10^{-4} cm/s y una humedad de un 18%. La densidad seca es de 1,8 y la húmeda de 2. Podemos considerar un contenido medio de finos mayor al 40%.

El tipo de producto presente tanto en los suelos como en el nivel freático corresponde con productos pesados, con una curva de destilación entre 50 y 600 °C, destilándose el 90% a los 500 °C.

La zona afectada tiene unas dimensiones de 40 x 140 x 4 m. Esto supone 22.400 m³ que considerando la densidad húmeda son 44.800 toneladas, de las que se considera necesario tratar unas 30.000 toneladas.

Dado que el material se debe excavar para ejecutar la prueba prototipo sobre los desarrollos, es completamente desaconsejable cualquier tratamiento del terreno que se realice previamente, ya que supondría un retraso en la ejecución

y no se puede controlar al 100% el proceso de descontaminación del suelo. Esto hace aconsejable analizar las posibilidades de actuación una vez excavado el material o durante el proceso de excavación y eliminar los procedimientos in situ.

Es necesaria una etapa de estudio previa al proyecto de las posibles alternativas a desarrollar:

a. Traslado a vertedero:

El Real Decreto 1481/2001, de 27 de diciembre, por el que se regula la eliminación de residuos mediante depósito en vertedero, indica que los vertederos deberán incluirse en alguna de las siguientes categorías: vertederos de residuos peligrosos, vertederos de residuos no peligrosos y vertederos de residuos inertes.

Según la DECISIÓN DEL CONSEJO (2003/33/CE) de 19 de diciembre de 2002 por la que se establecen los criterios y procedimientos de admisión de residuos en los vertederos con arreglo al artículo 16 y al anexo II de la Directiva 1999/31/CEE los residuos deberán cumplir, para el caso de los hidrocarburos:

- Vertederos de inertes: Concentración inferior a 500 ppm (mg/kg).
- Vertederos para residuos no peligrosos: Concentración entre 500 ppm y 30000 ppm.
- Vertederos para residuos peligrosos: Concentraciones superiores a 30000 ppm.

Según el análisis del terreno previo, se debería llevar el material a un vertedero de residuos No Peligrosos, pero son pocos los que actualmente hay en Andalucía.

Dado que el terreno se va a excavar para ejecutar los ensayos y que parte del volumen no podrá rellenarse de nuevo, el traslado de este material a vertedero autorizado se presenta como una alternativa viable. Esta opción es rápida, no necesita espacio de acopio de materiales y no sería preciso realizar estudios de impacto ambiental.

Aún así, presenta varios inconvenientes:

- Genera un gran movimiento de material fuera del terreno, por lo que es preciso ocupar un gran volumen en vertedero. Así mismo, se va a generar un gran movimiento de camiones sin compensación en la obra, que van a generar molestias a los vecinos.
- Se debería realizar un muestreo analítico de los suelos in situ con el fin de clasificarlo como residuo no peligroso o tóxico y peligroso. En este último caso, la opción de transporte a vertedero se debería realizar fuera de Andalucía, con el riesgo ambiental que supone el transporte de materias peligrosas por carretera.
- No se seguiría la filosofía en la que se basa la resolución de 14 de junio de 2001, por la que se aprueba el Plan Nacional de Residuos de la Construcción de Demolición 2001-2006, según la cual, se trata en la medida de lo posible de reutilizar lo que se pueda, reciclar lo que no se pueda reutilizar, quedando el depósito final en vertedero como la última opción, la menos satisfactoria. Además, se desaprovecha material que puede ser necesario en otro tramo de la obra, y el coste de transporte y vertido puede ser elevado.
- En definitiva, este método persigue la eliminación del suelo, lo que ambientalmente lo hace sólo recomendable en situaciones extremas.

b. Desorción térmica:

Este tratamiento conlleva los siguientes inconvenientes:

- Elevado gasto energético. Tanto para el mantenimiento de la maquinaria como para conseguir las temperaturas de tratamiento.
- Emisión de CO₂ y vapor de agua a la atmósfera en una zona urbana. Si se produjera algún fallo en el sistema de filtrado de los efluentes, se emitirían compuestos orgánicos volátiles a la atmósfera, por lo que el riesgo ambiental es aún mayor.
- Necesidad de autorizaciones administrativas, con alto plazo de tramitación.

- Riesgo de lixiviados en el emplazamiento
- Posibilidad de generar un alto rechazo vecinal.
- Técnica ex situ.

c. Lavado del suelo:

Este tratamiento conlleva los siguientes inconvenientes:

- No es aplicable en suelos de granulometría fina.
- Genera un nuevo problema, ya que la corriente de agua generada debe ser posteriormente tratada.
- Riesgo de lixiviados en el emplazamiento.

d. Biorremediación:

La biorrecuperación (12), (15), (16), (20), (23), (26), (30) es un método muy efectivo para tratar el suelo contaminado con TPH. Se basa en la metabolización de estos compuestos por las bacterias que existen naturalmente en el suelo, necesitando nutrientes, agua y oxígeno para favorecer esta degradación natural (34), (38), (40), (41), (43), (48). Pero en condiciones normales, este proceso natural tarda muchos meses o años en degradar la contaminación por TPH. Las tres razones principales que provocan estos largos plazos son:

- Cantidad de oxígeno biodisponible, insuficiente.
- Insuficiente cantidad o mala distribución en el suelo de nutrientes, humedad, etc.
- Los contaminantes no son biodisponibles por encontrarse adsorbidos en la superficie de las partículas del suelo
- A través de los nuevos desarrollos se va a tratar de reducir el tiempo de tratamiento de meses y años a días y semanas

Cabe destacar que se trata de un proceso “seco”, no en fase líquida, ya que la

humedad se mantiene siempre en una fracción de la capacidad de campo del suelo procesado.

La tierra tratada se deposita en unas pilas, en las que el proceso de biorrecuperación continuará hasta que se alcance la concentración objetivo (50), (52), (55), (56), (58), (60), (63).

Esta tecnología con los nuevos desarrollos presenta las siguientes ventajas:

- Permite procesar decenas de toneladas por hora.
- Las concentraciones objetivo se alcanzan en pocas semanas, normalmente en menos de un mes.
- El proceso es controlable y, por tanto, los resultados son garantizables.
- Garantiza la destrucción del contaminante en vez de su transferencia a otro medio (70), (75), (78), (80), (85).
- Emplea productos biodegradables y no genera residuos tóxicos.

4.1 Descripción del estado actual de la ciencia y tecnología

La disyuntiva que se presenta frente a un suelo contaminado es recuperarlo o destruirlo. En un principio prevaleció la última opción, mientras que en los últimos años se ha prestado una especial atención a las técnicas de recuperación que posibilitan su reutilización (87).

La problemática de la descontaminación de los suelos se puede tratar bajo dos perspectivas: técnicas de aislamiento de la contaminación y técnicas de descontaminación.

TÉCNICAS DE AISLAMIENTO

Para evitar que la contaminación se propague desde los suelos contaminados estos pueden ser almacenados en vertederos apropiados o sellados in situ o destruidos totalmente.

La técnica del sellado trata al suelo con un agente que lo encapsula y lo aísla. El suelo es excavado, la zona se sella con un impermeabilizante y se redeposita el

suelo. Para desarrollar las barreras de aislamiento se han utilizado diversas sustancias, como el cemento, cal, plásticos, arcilla, etc. (92), (93), (94), (96) El procedimiento tiene el inconveniente que se pueden producir grietas por las que los contaminantes pueden fugarse.

Sometiendo al suelo a altas temperaturas (1600-2300°C) se consigue su vitrificación con lo que se llegarían a fundir los materiales del suelo, produciéndose una masa vítrea similar a la obsidiana. Durante el proceso hay que controlar la volatilización de numerosos compuestos.

La propia filosofía de estas técnicas (persigue la eliminación del suelo) las hace **sólo recomendable en situaciones extremas**.

En otras ocasiones se realiza el aislamiento directamente sobre los niveles de aguas freáticas. Mediante bombeos exhaustivos se consigue deprimir los niveles freáticos para alejarlos del suelo y subsuelo contaminados. El agua bombeada es tratada para eliminar su contaminación.

TÉCNICAS DE DESCONTAMINACIÓN

En función de cómo se apliquen las técnicas depuradoras se habla de:

- Tratamientos in situ.
- Tratamientos on site.
- Tratamientos ex situ (off site).

El procedimiento in situ es el que requiere menos manejo, pero su aplicación resulta frecuentemente difícil de llevar a la práctica, dada la dificultad que representa el poner en íntimo contacto a los agentes limpiadores con la masa del suelo. En el tratamiento on site el suelo se excava y se trata en el propio terreno. El método ex site requiere las etapas de excavación, transporte, tratamiento en las plantas depuradoras, devolución y enterramiento.

Básicamente se utilizan cinco métodos para la recuperación de los suelos contaminados.

- **Extracción por fluidos (aireación o arrastre) y lavado.** Consiste en separar los contaminantes mediante la acción de un fluido. Una vez arrastrado el contaminante, se depura el efluente con técnicas apropiadas. Se trata de procedimientos muy sencillos, pero para que sean efectivos requieren que los suelos sean permeables y que las sustancias contaminantes tengan suficiente movilidad. Son métodos típicamente desarrollados in situ.
- **Tratamiento químico.** Consiste en depurar el suelo mediante la degradación de los contaminantes por reacciones químicas, generalmente de oxidación de los compuestos orgánicos. Son métodos útiles para aldehídos, ácidos orgánicos, fenoles, cianuros y plaguicidas organoclorados, por lo que no sería de aplicación en nuestro caso.
- **Tratamiento electroquímico.** Consiste en desplazar los contaminantes mediante la creación de campos eléctricos. Práctica in situ, son útiles para contaminantes con comportamiento iónico, por lo que es desaconsejable en nuestro caso.
- **Tratamiento térmico (desorción térmica).** La descontaminación se realiza destruyendo los contaminantes mediante el suministro de calor. Se somete el suelo a temperaturas entre 250 y 550 °C, para conseguir la desorción de los contaminantes. Se trata de un tratamiento ex situ, útil para eliminar la contaminación producida por compuestos orgánicos volátiles, como los lubricantes, aceites minerales, gasolinas, y determinados metales pesados volátiles.
- **Tratamiento microbiológico (biorremediación).** Consiste en potenciar el desarrollo de microorganismos con capacidad de degradación de contaminantes. Para ello se pueden favorecer las acciones bióticas mediante la mejora de determinadas condiciones edáficas, añadiendo nutrientes, agua, oxígeno, modificación del pH, etc. Es un método útil para la mayoría de los contaminantes orgánicos y se puede desarrollar tanto in situ, on site o ex situ.

5. BIORREMEDIACIÓN

El desarrollo del trabajo va a ir enfocado al desarrollo de técnicas de biorremediación (96), (97), (103). Por ello, a continuación se va a ampliar la información sobre el estado actual de esta tecnología.

5.1 Introducción

La relativa simplicidad estructural de los microorganismos motiva su extraordinaria capacidad de adaptación a los múltiples microambientes en los distintos hábitats, una propiedad utilizada a lo largo del tiempo por el hombre para gestionar residuos biodegradables y tratar aguas de uso doméstico e industrial en plantas depuradoras (105), (108). En este sentido la biorremediación se puede definir como una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos, específicamente su capacidad para biodegradar total o parcialmente una amplia gama de compuestos, con el objetivo de limpiar terrenos o aguas contaminadas. Desde un punto de vista oficial, la Academia Americana de Microbiología la define como “la utilización de organismos vivos para reducir o eliminar riesgos medioambientales resultantes de la acumulación de compuestos químicos tóxicos y otros residuos peligrosos”. Esta tecnología está aprobada y recomendada por varias agencias reguladoras en todo el mundo, como por ejemplo la EPA (United States Environmental Protection Agency), se aplica con frecuencia en multitud de emplazamientos en Europa y en concreto en España.

De toda la amplia gama de técnicas dirigidas a la limpieza de emplazamientos contaminados, la biorremediación (110), por su interés potencial y carácter multidisciplinar, ha recibido una atención preferente en los últimos años por parte de profesionales de muy diversos campos. La complejidad intrínseca de esta tecnología hace necesaria una aproximación con enfoques diferentes y complementarios, en donde microbiólogos, químicos e ingenieros tienen un papel relevante y necesitan beneficiarse de los conocimientos y experiencia de cada uno de los integrantes del equipo. En lo que respecta a la microbiología del proceso, uno de los resultados más evidentes del esfuerzo investigador en los últimos años, ha sido la descripción de las rutas biodegradativas

microbianas, aeróbicas y anaeróbicas, de una amplia variedad de compuestos relevantes desde el punto de vista medioambiental. Hay que precisar, sin embargo, que no siempre los estudios de laboratorio se han acompañado de una transferencia efectiva de los resultados a las empresas dedicadas a la remediación ambiental, algo que será necesario potenciar en el futuro.

5.2 Antecedentes

La biorremediación (112) es sin duda una rama cercana a la biogeoquímica (también a la geomicrobiología) ya que, en el fondo, se trata simplemente de utilizar el reverso de las ideas aplicadas en la prospección de hidrocarburos, la obtención de metales por biolixiviación, o incluso la desulfuración microbiana de carbones y petróleo. De hecho, esta metodología surgió como una respuesta a la pregunta de los primeros investigadores sobre la posible utilidad de los microorganismos asociados a las acumulaciones naturales de hidrocarburos, para llevar a cabo la degradación de esos compuestos en entornos diferentes. A mediados del siglo XX se desarrollaron las primeras investigaciones sobre el potencial de los microorganismos para biodegradar contaminantes y este “uso” intencionado recibió entonces el nombre de biorremediación. Las primeras técnicas que se aplicaron fueron similares al laboreo o labranza de suelos actual (landfarming) y sus promotores, lógicamente, compañías petrolíferas. Las primeras patentes de biorremediación “in situ”, fundamentalmente para gasolina y gasoil, aparecieron en los años 70. En los años 80 se generalizó el uso del aire y peróxidos para suministrar oxígeno a las zonas contaminadas, con el objeto de mejorar la eficiencia de los procesos degradativos. Durante los años 90 el desarrollo de las técnicas de burbujeo de oxígeno (air sparging), hizo posible la biorremediación (115) (116) en zonas por debajo del nivel freático. Al mismo tiempo, la implantación de aproximaciones experimentales ensayadas previamente en el laboratorio, permitió el tratamiento de hidrocarburos clorados, los primeros intentos con metales pesados, la extensión de las prácticas a ambientes anaerobios, y otras aplicaciones. Paralelamente se desarrollaron los métodos de ingeniería que permitieron mejorar los rendimientos de la otra gran familia de técnicas (“ex situ”), como fueron el landfarming, compostaje (composting) y otras.

En los últimos treinta años, los importantes accidentes de petroleros producidos periódicamente, han dado un impulso adicional a las investigaciones sobre biorremediación como una tecnología de limpieza de gran potencial, al mismo nivel que otras ya disponibles para paliar el efecto de estos desastres sobre el medio ambiente. El vertido del petrolero Exxon Valdez el 24 de Marzo de 1989, con un millón y medio de barriles de crudo, en la bahía de Prince William en Alaska, motivó una respuesta rápida de la administración norteamericana y de la compañía implicada, y en ella el protagonismo principal lo tuvo el uso de un fertilizante oleofílico (Inipol EAP22), que estimuló la degradación de los hidrocarburos. La idea de que la biodegradación del petróleo vertido en un accidente se podía mejorar con la adición de nutrientes como nitrógeno y fósforo, constituyó entonces el fundamento de una biorremediación a gran escala mediante bioestimulación. Las arenas de la zona eran deficitarias en nitrógeno y fósforo por lo que, después de una fase de limpieza por medios físicos, la biodegradación propiciada por los microorganismos indígenas hizo el resto y varios meses después gran parte del crudo había desaparecido. No obstante, no resultó fácil demostrar que los microorganismos habían sido los responsables del proceso y que la adición del fertilizante había sido un éxito, algo que solo se consiguió mediante un estudio detallado con biomarcadores químicos.

La investigación de métodos de remediación para vertidos marinos ha impulsado paralelamente la aplicación de estas técnicas en vertidos y contaminación terrestre. Estos últimos episodios no producen el impacto público de las mareas negras, pero son mucho más abundantes, debido a la conjunción de muchos factores causales: instalaciones obsoletas, depósitos deteriorados, accidentes en el transporte, roturas de oleoductos, etc. Si a esto se añade la gran cantidad de residuos producidos a diario, desde una refinería hasta un pequeño taller, la necesidad de técnicas que puedan abaratar las soluciones es obvia. La biorremediación (118), (119) compite ventajosamente, en cuanto al coste se refiere, con otros métodos alternativos de limpieza. De un total aproximado de 213 billones de dólares anuales que mueve la industria medioambiental en Estados Unidos, entre 7 y 8 corresponden a servicios específicos de remediación, con gran potencial de crecimiento. En la misma línea, para calcular el mercado de la biorremediación en Europa, basta con

imaginar el número de emplazamientos susceptibles de tratamiento, teniendo en cuenta además la reciente implantación en países como España de una legislación sobre suelos contaminados.

5.3 Ámbito de aplicabilidad

El ámbito actual de aplicabilidad de la biorremediación (35) es amplio, pudiendo considerarse como objeto de la misma cada uno de los estados de la materia:

- Sólido: aplicaciones sobre medios contaminados como suelos o sedimentos, o bien directamente en lodos, residuos, etc.
- Líquido: aguas superficiales y subterráneas, aguas residuales.
- Gases: emisiones industriales, así como productos derivados del tratamiento de aguas o suelos.

También se puede realizar una clasificación en función de los contaminantes con los que se puede trabajar:

Hidrocarburos de todo tipo: alifáticos, aromáticos como los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos), aromáticos policíclicos (PAH – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-) y todos los productos compuestos por mezclas de aquellos (gasolina, keroseno, gasoil, fuel oil, crudo, etc.).

- Hidrocarburos clorados: pesticidas, herbicidas, bifenilos policlorados (PCBs), tricloroetileno (TCE), percloroetileno (PCE) y otros.
- Compuestos nitroaromáticos: trinitrotolueno (TNT) y otros.
- Metales pesados.
- Otros contaminantes : compuestos organofosforados, dioxinas, cianuros, fenoles, etc.

5.4 Ventajas e inconvenientes de la biorremediación

Dejando aparte la amplia gama de compuestos objeto de su aplicación (44), varios aspectos positivos de esta técnica son destacables:

- Los tratamientos físicos y buena parte de los químicos están basados en transferir la contaminación entre medios sólidos, líquidos y gaseosos, un fenómeno que se atenúa notablemente en la biorremediación.
- La biorremediación es una tecnología poco intrusiva en el medio y generalmente no requiere componentes estructurales o mecánicos complejos.
- Como ya se ha apuntado, es una aproximación comparativamente económica y, al tratarse de un proceso “natural” (en el sentido de utilizar los recursos microbiológicos del medio), es más susceptible de ser aceptada por parte de la opinión pública.

La biorremediación (83) tiene también algunos inconvenientes y limitaciones. Por ejemplo, la biodegradación incompleta (aspecto sobre el que volveremos), puede generar intermediarios metabólicos inaceptables, con un poder contaminante similar o incluso superior al producto de partida. Ejemplos clásicos de este fenómeno son la degradación microbiana del 1,1,1-tricloro-2,2-bis-(p-clorofenil) etano (DDT), en la que se elimina un átomo de cloro para dar 1,1-dicloro-2,2-bis-(p-clorofenil) etileno (DDE), altamente tóxico, o la degradación anaeróbica del solvente tricloroetileno (TCE) que puede originar un compuesto carcinogénico, el cloruro de vinilo. Además, algunos contaminantes son resistentes o inhiben la biorremediación. Por otra parte, el tiempo requerido para un tratamiento adecuado es difícil de predecir y finalmente el seguimiento y control de la velocidad y/o extensión del proceso es laborioso.

En este último aspecto la biorremediación no ofrece ventajas ya que, al menos sobre el papel, es más lenta que otras alternativas. Aunque no siempre es así en la práctica, este es uno de los inconvenientes que será necesario superar en el futuro, mediante investigaciones dirigidas a optimizar la cinética de este proceso, lo cual supone, en realidad, conocer mejor las bases físico-químicas y

biológicas de la biorremediación.

5.5 Factores que determinan la eficacia de la biorremediación

Existen una serie de factores que pueden ayudar a prever el grado de consecución de los objetivos planteados en un proceso de biorremediación para cada situación concreta:

5.5.1 Propiedades del contaminante (biodegradabilidad).

Si nos referimos a los componentes del petróleo, algunos hidrocarburos alifáticos como los alcanos lineales se degradan rápidamente. Las estructuras ramificadas son más difíciles de degradar que las cadenas lineales, al producirse impedimentos estéricos, también los dobles enlaces hacen la molécula más resistente, así como un incremento del número de anillos bencénicos en el caso de compuestos aromáticos. Las sustituciones químicas (ácidos dicarboxílicos, nitrilos, metilaciones, halogenaciones), suelen hacer la molécula más resistente. Así por ejemplo, aditivos de la gasolina, como el metil, ter-butil éter (MTBE), y los disolventes organoclorados presentan mayor resistencia a la biodegradación. Por otra parte, la biodegradación de compuestos que contienen nitrógeno o azufre está ligada frecuentemente a su utilización como fuente de nutrientes.

5.5.2 Presencia de comunidades microbianas adecuadas

Los microorganismos pueden ser autóctonos (en cuyo caso estaríamos refiriéndonos a biorremediación intrínseca o atenuación natural), o añadidos al sistema para mejorar la degradación (correspondiéndose en este caso con el término bioaumentación). Estos matices van a determinar a su vez la capacidad de los microorganismos para colonizar el ambiente contaminado, algo directamente relacionado con su adaptación al hábitat.

5.5.3 Disponibilidad del contaminante.

Es un factor crítico, más importante que la propia presencia de comunidades

microbianas. En un terreno contaminado, el contaminante puede localizarse en la fase acuosa del suelo, en una fase líquida orgánica (en el caso de hidrocarburos) y/o en fase de vapor. Además, puede estar sujeto a modificaciones químicas como la hidrólisis, oxidación o polimerización, que influyen en su disponibilidad.

Para que pueda producirse la degradación de un contaminante, es necesario que interactúe con la célula en medio acuoso. Inicialmente lo hará con la parte exterior de su pared para posteriormente ser transportado al interior de la misma. Las moléculas con una densidad importante de cargas negativas (como sucede en presencia de muchos grupos ácidos sulfónicos), tienen dificultades para penetrar a través de las membranas celulares. Sin embargo, a medida que aumenta la hidrofobicidad de los contaminantes (por ejemplo, desde compuestos relativamente simples como el indol, hasta hidrocarburos de tipo alcano y aromáticos), estos tienden a ser transportados pasivamente al interior, sin aporte de energía.

Muchos contaminantes orgánicos, como la mayoría de los componentes del petróleo, PCBs, PAHs (naftaleno, pireno, fluoreno,...), etc., son hidrofóbicos y tienden además a adsorberse en el suelo, concretamente a la fracción orgánica (ácidos húmicos, fúlvicos y humina). Esta es una de las causas, por ejemplo, de la persistencia de muchos pesticidas. Por lo tanto un aspecto crítico para la disponibilidad de los contaminantes es la composición del suelo, que determinará, tanto la cinética de adsorción y desorción de los contaminantes como la propia capacidad de movilizarse por parte de los microorganismos y contactar con ellos. Otros factores determinantes que influirán en la disponibilidad de los contaminantes y facilitarán en su caso la degradación de los mismos, son la presencia o ausencia en el suelo de fases líquidas no acuosas y la capacidad de producción de surfactantes por los microorganismos.

5.5.4 Naturaleza y condiciones del medio contaminado

Otro aspecto importante que determina la eficiencia de la biorremediación, son las propiedades del medio que permiten o limitan el crecimiento microbiano y el metabolismo del compuesto. Entre ellas se

pueden citar la permeabilidad, que obstaculiza o permite la existencia de gradientes y la transferencia del contaminante a las poblaciones microbianas; la temperatura, que determina tanto las tasas metabólicas como el estado físico del contaminante; la presencia o ausencia de nutrientes orgánicos, oxígeno u otros aceptores potenciales de electrones; la capacidad de retención de agua y las características hidráulicas en el caso de suelos; el pH y características del flujo en el caso de aguas subterráneas; el grado de contaminación, etc. A veces será necesario modificar alguno de estos parámetros, por ejemplo añadiendo nutrientes o aireando (práctica que se corresponde con el término bioestimulación).

Un resumen de los factores mencionados en este apartado, que determinan la posible eficacia de las técnicas de biorremediación, se muestra en la Tabla.

	Factores favorables	Factores desfavorables
Características químicas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Número pequeño de contaminantes, o gran número pero de similar naturaleza (componentes del petróleo). ▪ Concentraciones medias a bajas de los contaminantes. ▪ Presencia de poblaciones microbianas diversas. ▪ Existencia de aceptores de electrones adecuados (oxígeno, nitratos, sulfatos, Mn^{4+}, Fe^{3+}) ▪ pH, generalmente entre 6 y 8. ▪ Temperaturas superiores a 15°C. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Gran número y variedad de contaminantes (por ejemplo mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos) ▪ Concentraciones tóxicas. ▪ Escasa actividad microbiana inicial. ▪ Ausencia de aceptores de electrones apropiados. ▪ pH extremos (<4 ó >9) ▪ Temperaturas bajas.
Características hidrogeológicas (proyectos 'in situ')	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Porosidad media. ▪ Elevada permeabilidad. ▪ Mineralogía uniforme. ▪ Homogeneidad. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Rocas fracturadas (porosidad secundaria elevada). ▪ Presencia de producto libre. ▪ Baja permeabilidad. ▪ Mineralogía compleja. ▪ Heterogeneidad.

Tabla 5.5.4. Factores favorables y desfavorables que determinan la eficacia de un proceso de biorremediación.

5.6 Aproximaciones metodológicas

Ya se han citado anteriormente, en relación con los factores que determinan la eficacia de la biorremediación (96), los tres conceptos importantes, desde un punto de vista metodológico (atenuación, bioestimulación, bioaumentación (84)), que delimitan precisamente las aproximaciones principales a esta técnica. Se van a describir con más detalle a continuación.

5.6.1 Atenuación natural.

Se denomina biorremediación intrínseca, biorremediación natural o atenuación natural a la que se lleva a cabo sobre muchos compuestos por los microorganismos autóctonos, principalmente bacterias, del medio afectado. Estos utilizan su potencial enzimático para mineralizar los contaminantes (es decir, biodegradarlos completamente hasta CO_2), o bien simplemente degradarlos hasta productos intermedios, ya sea en un ambiente aerobio o anaerobio. En ocasiones, las transformaciones cometabólicas son las responsables de la biodegradación. En cualquier caso, los procesos suelen tener lugar mediante una gran variedad de interacciones biogeoquímicas entre los componentes del

suelo, el agua, los microorganismos y los contaminantes. Esto puede observarse en la Figura.

Figura. 5.6.1 Actividades microbianas durante la biorremediación de compuestos orgánicos

La capacidad intrínseca para la atenuación natural de un medio, depende por tanto de las “habilidades metabólicas” de los microorganismos nativos, del tipo de contaminante y de la geoquímica y la hidrogeología en la zona afectada. En lo que respecta al oxígeno, y en un modelo simplificado, el proceso tiene dos variantes:

a) En presencia de oxígeno, la conversión de los contaminantes a dióxido de carbono y agua se lleva a cabo con alto rendimiento en cuanto a la producción de energía y masa celular microbiana. Las bacterias responsables pueden obtenerse con relativa facilidad en cultivos puros en el laboratorio, muestran tasas de crecimiento aceptables y no tienen una excesiva interdependencia metabólica con otras. El proceso se define entonces como biodegradación aeróbica o bien biorremediación aeróbica y ha sido estudiado con detalle en relación con el metabolismo de los hidrocarburos.

b) En ausencia de oxígeno, los microorganismos utilizan rutas diferentes para degradar el contaminante, y, a menudo, lo hacen en forma de

consorcios (que se podrían definir como asociaciones cooperativas entre bacterias que pueden incluso establecer una relación física). El cultivo y análisis de estos microorganismos es más complejo, debido a sus requerimientos y lento crecimiento. La oxidación de las moléculas aromáticas se lleva a cabo mediante el oxígeno del agua, y los electrones derivados del proceso se desvían a los aceptores disponibles (nitrato, sulfato, formas oxidadas de Fe ó Mn, etc). Se hablaría de biodegradación anaeróbica o bien de biorremediación anaeróbica, proceso generalmente más lento que el aerobio, asociado, por ejemplo al metabolismo de compuestos organoclorados.

En condiciones óptimas para la atenuación natural, los contaminantes se degradarían totalmente, o se transformarían en compuestos menos nocivos o inocuos, siendo entonces este método la estrategia más apropiada de biorremediación. A pesar de la ventaja evidente de su menor coste, la biorremediación natural requiere no obstante actuaciones previas, como son una evaluación de los riesgos sobre los seres vivos y ecosistemas, la eliminación del origen de la contaminación para suprimir el aporte de los contaminantes, el aislamiento de la zona contaminada (especialmente en acuíferos), y un programa riguroso de seguimiento del proceso para confirmar la biodegradación de los contaminantes. Este incluye el análisis de los niveles de los mismos a lo largo del tiempo y la aparición de sus productos de degradación, la demostración de la existencia de actividad microbiana y, si es posible, una descripción de los mecanismos degradativos, aeróbicos o anaeróbicos.

Desafortunadamente, hay bastantes factores que pueden limitar o impedir la atenuación natural en cualquier medio, algunos de los cuales están lógicamente relacionados con los ya apuntados en relación a la eficacia de la biorremediación:

- Carencia de nutrientes esenciales para los microorganismos (por ejemplo, nitrógeno y/o fósforo).
- Ausencia de aceptores adecuados de electrones (mencionados anteriormente) y/o de condiciones medioambientales apropiadas (pH,

potencial redox, humedad).

- Ausencia de poblaciones microbianas con el potencial enzimático adecuado necesario para degradar los contaminantes.
- Baja solubilidad del contaminante en agua, concentraciones excesivas del mismo y/o presencia de componentes tóxicos en la mezcla contaminante.

Un ejemplo ilustrativo de la existencia de poblaciones con capacidad degradadora en relación con el fenómeno de la atenuación natural, es el caso del vertido del Prestige en Noviembre del 2002 en las playas gallegas. Estudios posteriores de fraccionamiento isotópico de muestras de hidrocarburos, junto con el análisis de poblaciones bacterianas con capacidad para metabolizar componentes del petróleo, mostraron la existencia de procesos de biorremediación intrínseca en esas muestras. Sin embargo, la degradación estaba condicionada por la disponibilidad de nutrientes esenciales, como nitrógeno y fósforo. Parece evidente, por lo tanto, que el aporte de los elementos de los que carece el medio o bien la potenciación de los existentes, favorecerá la eliminación del contaminante. En esto se basan las otras dos aproximaciones biotecnológicas que se van a comentar a continuación: introducción de modificaciones en el medio mediante el aporte de nutrientes, aireación y otros procesos (bioestimulación) y la adición de microorganismos (bioaumentación).

5.6.2 Bioestimulación.

Existen muchas variantes para aplicar la bioestimulación (denominada a veces en inglés enhanced bioremediation). En muchos casos será suficiente añadir aceptores de electrones (oxígeno, nitratos, etc.) aunque en otros podría requerirse la adición de nutrientes, como nitrógeno y fósforo, o ajustes de pH, o incluso aportar cometabolitos. El oxígeno puede incorporarse al suelo mediante inyección directa de aire o en forma líquida (peróxido de hidrógeno) o sólida (peróxido de magnesio) a través de pozos, tuberías y difusores en la zona contaminada. En todo caso, estas aproximaciones se sostienen en la premisa, de

que los microorganismos indígenas son capaces de degradar el contaminante tras un proceso más o menos largo de adaptación.

Una vez añadidos los nutrientes, la biorremediación requiere que estos entren en contacto con el área impregnada y que su concentración sea suficiente para soportar el crecimiento máximo previsto de la población degradadora en el transcurso de las operaciones de remediación. En esta línea, los sistemas de bombeo y tratamiento (pump & treat) para aguas subterráneas, que combinan las técnicas "in situ" y "ex situ", se están imponiendo en los últimos tiempos, porque permiten utilizar un tanque mezclador como un verdadero biorreactor, con el fin de controlar adecuadamente todos los parámetros importantes.

Los nutrientes o aditivos en los métodos de bioestimulación (89), (94), pueden añadirse en forma de briquetas o gránulos de liberación lenta, fertilizantes oleofílicos líquidos (el más conocido es el Inipol EAP22, aplicado durante la biorremediación del vertido del Exxon Valdez en Alaska), productos naturales con propiedades nutritivas y capacidad surfactante (por ejemplo, extractos de algas), biosurfactantes de origen bacteriano (Emulsan, etc.), surfactantes de origen químico biodegradables, combinados con sales minerales, etc. La degradación de los hidrocarburos tiene lugar fundamentalmente en la interfase hidrocarburo-agua, donde los fertilizantes oleofílicos tienen la capacidad de adherirse y proporcionar nutrientes esenciales. Por ello, este tipo de aditivos está especialmente recomendado para vertidos en zonas costeras, en lugares donde la naturaleza rocosa del sustrato y/o la acción del agua amortigua la efectividad de otros compuestos como los de liberación lenta, o los solubles en agua. El Inipol EAP 22 estaba constituido por lauril fosfato, urea, ácido oleico, 2-butoxi-1-etanol y agua (C:N:P = 62:5:1) y fue diseñado por la compañía Elf Aquitaine después del vertido del Amoco Cadiz en Francia en 1978. Con una eficacia mayor a la de otros fertilizantes más convencionales, el producto ha suscitado sin embargo algunas dudas con respecto a la toxicidad de alguno de sus componentes y a la solubilidad de la urea utilizada como fuente de nitrógeno, entre otros aspectos, lo que ha motivado la aparición de otros similares, como el F1, Inipol plus o S200. Este último está compuesto por urea, éster fosfórico, ácido oleico, éter glicólico y agua, presenta menor toxicidad y mayor poder de emulsificación y ha sido empleado en el caso del Prestige.

5.6.3 Bioaumentación

Consiste en la adición de microorganismos especializados al medio, con el fin de facilitar la eliminación de los contaminantes y potenciar y optimizar la remediación. Parece haber cierto consenso en reconocer que la utilidad de esta técnica es mayor, en general, en aproximaciones “ex situ”, con consorcios especializados. Se han señalado, por otra parte, una serie de razones que dificultan la aplicabilidad de la misma en procesos “in situ”.

- a) El tamaño de la población de microorganismos degradadores crece rápidamente como respuesta a la contaminación del medio y es muy difícil, sino imposible, incrementar la población microbiana más allá de esos valores mediante un inóculo externo.
- b) La supervivencia de los microorganismos añadidos está determinada por múltiples factores difícilmente controlables, tales como las poblaciones indígenas que ocupan los nichos potenciales, la presencia de depredadores, la superficie disponible “libre” de contaminantes y la presencia/ausencia de materia orgánica.

Sin embargo, antes de obtener conclusiones definitivas sobre la efectividad de la bioaumentación (84), (89) cuando se desarrolla “in situ” (especialmente si se utilizan bacterias), sería necesario tener en cuenta en el futuro, aspectos como la caracterización químico-física previa del ambiente contaminado donde se va a llevar a cabo la bioaumentación, el número óptimo de bacterias, la conveniencia de realizar estudios previos de su capacidad de supervivencia en el suelo o medio afectado, el análisis riguroso de la interacción de las bacterias añadidas con las comunidades microbianas indígenas y otros parámetros que se definirán mejor, sin duda, a medida que se desarrolle esta interesante metodología. Por ejemplo, una alternativa, sería la posibilidad de añadir las bacterias encapsuladas en diversos soportes físicos, para protegerlas de las actividades microbianas hostiles del medio receptor, un inconveniente que parece menos crítico si los microorganismos utilizados en bioaumentación se aíslan del propio medio contaminado. En este sentido, la caracterización previa detallada de las bacterias del medio contaminado ayudaría a seleccionar aquellas más

adecuadas para realizar la bioaumentación, y evaluar la densidad apropiada para conseguir los mejores resultados. También se ha llegado a plantear la posibilidad de llevar a cabo una “aclimatación” previa de las bacterias en el mismo ambiente en el que se van a encontrar durante la bioaumentación, mediante su desarrollo en microcosmos preparados en el laboratorio.

Estas y otras imaginativas aproximaciones han mostrado ya resultados efectivos en algunos ejemplos bien documentados. La utilización de muestras de suelo enriquecido con los contaminantes (a partir, por ejemplo, de microcosmos) como inóculo, atenúa el problema, familiar para los microbiólogos, de la incapacidad de cultivar en el laboratorio todos los microorganismos relevantes en cuanto a sus capacidades biodegradativas. Aunque este método pueda parecer una aproximación demasiado empírica, tiene la ventaja potencial, combinada con estudios físico-químicos del propio suelo, de ser sencilla, práctica, y no agresiva desde el punto de vista medioambiental. Todos estos recursos han creado unas expectativas esperanzadoras para esta metodología de biorremediación, que se traducirán, sin duda, en futuras aplicaciones prácticas.

Es evidente, por otra parte, que frente a una mezcla compleja de compuestos, o bien en el caso de productos recalcitrantes, las capacidades de los microorganismos a veces no son suficientes. En estos casos el “diseño” de microorganismos mediante ingeniería genética sería la estrategia más eficaz para aportar esas capacidades al medio contaminado y sustituir a los microorganismos autóctonos con ventaja en cuanto a tasas de degradación o variedad de compuestos degradados. Esto, al menos en el laboratorio y/o biorreactores, donde los distintos parámetros son controlables, constituye ya una realidad esperanzadora. Sin embargo, existen aún barreras prácticas que impiden aplicar de inmediato estos microorganismos en los medios externos, referidas, fundamentalmente, a los riesgos asociados con su crecimiento y proliferación incontrolados y a la posibilidad de transferencia de los genes introducidos a los microorganismos autóctonos, con el riesgo de alterar la reserva (pool) de genes de la comunidad y la diversidad/estabilidad a largo plazo de esas poblaciones. Pese a todo, la investigación en este terreno avanza a gran velocidad y la creación de microorganismos desarrollados por ingeniería

genética puede con el tiempo ser uno de los factores desencadenantes de cambios decisivos en el panorama actual de la biorremediación.

5.7 Técnicas “in situ” y “ex situ”

Como ya se ha apuntado, las técnicas de biorremediación se pueden aplicar de dos formas, que pueden combinarse en los sistemas de bombeo y tratamiento (pump & treat) para aguas subterráneas:

- *Biorremediación “in situ”*. Consiste en tratar las aguas, suelos o arenas contaminadas sin moverlas del lugar en el que se encuentran. Para ello, tanto en métodos de bioestimulación como en bioaumentación, se puede disponer de una red de bombeo de nutrientes o un sistema de inoculación, o bien llevar a cabo una simple aireación del terreno (bioventing y air sparging) o con arado (landfarming). Alternativamente, pueden añadirse aceptores de electrones que permitan la biorremediación en condiciones anóxicas, tales como nitratos, sulfatos, Fe (III), Mn (IV) ó CO₂.
- *Biorremediación “ex situ”*. Los procesos de tratamiento (bioestimulación y bioaumentación) se aplican tras la excavación del medio contaminado, bien en forma de lodos en simples biorreactores (técnicas de bioslurry para suelos), o en fase sólida, en plantas de tratamiento mediante técnicas de laboreo (labranza o landfarming sobre láminas impermeables con revestimiento adecuado), o compostaje, mezclando el residuo con otros materiales de tipo celulósico (por ejemplo, en biopilas con inyección de aire). En todos los casos es necesario proteger el suelo que circunda las operaciones. Las ventajas de estos procedimientos frente a los primeros radican en su mayor rapidez, una mayor variedad de contaminantes susceptibles de ser tratados, la posibilidad de optimizar mejor los parámetros microbiológicos y un mejor control del proceso, a cambio, lógicamente, de un mayor coste. Algunas prácticas, como la de landfarming, pueden requerir un control extenso, ya que la transferencia de los contaminantes volátiles a la atmósfera no es aceptable desde el

punto de vista medioambiental y deben recogerse y eliminarse, siendo el tratamiento biológico una posibilidad también a considerar. La introducción de ambientes contenidos (biorreactores) para el tratamiento atenúa estos inconvenientes.

5.8 Otros aspectos de interés en relación con la biorremediación

5.8.1 Interacciones microbianas con los contaminantes.

Los microorganismos de los ambientes naturales poseen una notable capacidad de adaptación y degradación de los compuestos xenobióticos, lo que se favorece por su integración en poblaciones dentro de una comunidad microbiana. La base de este fenómeno se encuentra, por una parte, en la adquisición de las capacidades metabólicas mediante mecanismos de variación genética (esencialmente por mutación y selección) y/o intercambio de genes mediante conjugación, transducción y transformación, y por otra en la posesión de enzimas degradativos, con especificidad amplia, unido a la posibilidad de complementar las actividades metabólicas. La presencia de enzimas capaces de degradar una amplia variedad de sustratos y la posibilidad de complementar sus actividades metabólicas, son mecanismos notables que permiten además a los microorganismos hacer frente, en muchos casos, a la toxicidad de los contaminantes y sus productos. Estas peculiaridades están en la base de dos de las capacidades metabólicas más remarcables en cuanto a la degradación de compuestos contaminantes, como son las de cometabolismo y sintrofía.

El *cometabolismo* es una actividad importante desde el punto de vista medioambiental, con matices complejos. Implica, esencialmente, el metabolismo “gratuito” (es decir, no útil para el crecimiento u obtención de energía) de un sustrato secundario (compuesto contaminante) por enzimas que requieren otro sustrato primario diferente, el cual proporciona la energía y/o los cofactores reductores necesarios. El producto del cometabolismo puede acumularse y persistir en el medio, pudiendo a veces ser tóxico, o bien ser utilizado por un segundo microorganismo en una relación de comensalismo. Se pueden dar dos situaciones: en una, el compuesto cometabolizado se transforma sólo en

presencia de un segundo sustrato, que es el que permite el crecimiento. En otros casos, el compuesto es metabolizado (pero no utilizado para el crecimiento) incluso en ausencia de un segundo sustrato. Ambas actividades enzimáticas pueden ser diferentes y el resultado es, en teoría, la acumulación de productos a partir del contaminante. En la práctica, la existencia de otros microorganismos hace factible su degradación posterior (siempre que no sean tóxicos para estos microorganismos), mediante reacciones sintróficas y, en última instancia, su mineralización.

El fundamento del cometabolismo consiste en que los enzimas del inicio de una ruta metabólica (por ejemplo las oxigenasas implicadas en el metabolismo aerobio de los hidrocarburos), no tienen una especificidad demasiado estricta, es decir, un mismo enzima, puede degradar distintos compuestos. Sin embargo las enzimas posteriores de la ruta ya no reconocen los intermediarios y estos no son degradados por la misma bacteria, aunque pueden ser degradados por otras, como ya hemos mencionado. El cometabolismo es importante para la degradación de compuestos aromáticos o alicíclicos, frecuentemente con sustituyentes halogenados, que motivan la recalcitrancia parcial a los microorganismos degradadores iniciales. Las bacterias cometabolizantes (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium* y otras), no crecen, en presencia del sustrato que modifican, pero si lo hacen en presencia de otros análogos completamente metabolizables de estos compuestos. Este es el fundamento de las técnicas de bioestimulación en las que se enriquece el ambiente contaminado con compuestos análogos de los contaminantes (cometabolitos). La necesidad de análogos metabolizables explica que en los ambientes naturales, como el suelo, la degradación total de los compuestos cometabolizados sea lenta. Si los residuos contaminantes contienen, por otra parte, una variedad amplia de estructuras, es más probable que se introduzcan relaciones cometabólicas: unos compuestos se utilizan totalmente, otros con estructura similar se degradan parcialmente.

El término *sintrofía* implica la acción concertada de diferentes microorganismos sobre un sustrato, mediante la combinación de sus actividades metabólicas, lo que permite su degradación. Un requisito importante de este fenómeno es la proximidad física, que minimiza la distancia a la que los compuestos difunden

entre las células que establecen una relación sintrófica, las cuales, por otra parte, se benefician mutuamente de dicha relación. Se comprende así la importancia de las poblaciones mixtas (que a veces, de una forma amplia se denominan consorcios), para la degradación más efectiva de los contaminantes orgánicos.

5.8.2 Producción de biosurfactantes

Un aspecto no menos importante que los ya descritos, en cuanto a facilitar la degradación de los compuestos orgánicos, lo constituye la capacidad de los microorganismos para producir biosurfactantes y bioemulsionantes. En un medio tan heterogéneo como por ejemplo un suelo contaminado, las fronteras entre las diferentes fases presentes son un factor fundamental en la biorremediación. Los surfactantes, en general, independientemente de su origen natural o sintético, se definen como agentes que disminuyen la tensión superficial del agua (tensioactivos) y alteran las condiciones. Los emulsificantes a su vez son compuestos que estabilizan la dispersión de un líquido en otro, aumentando por ejemplo, la superficie disponible en las múltiples gotículas que forman los hidrocarburos. En el caso de los surfactantes, su actividad se debe a su naturaleza mixta (hidrofílica e hidrofóbica simultáneamente, es decir, anfipática), que se plasma en la formación de micelas, micelas inversas, agregados filamentosos, vesículas, capas, etc. Las propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas dependen de la carga del grupo polar (aniónico, catiónico o neutro). La efectividad de un surfactante se determina por su capacidad para disminuir la tensión superficial, la cual a su vez se correlaciona con la concentración requerida para alcanzar la concentración crítica de micelas.

Los microorganismos se localizan frecuentemente en los contaminante orgánicoagua, lo que suele ir unido a su capacidad para producir biosurfactantes y bioemulsificadores en presencia de esos contaminantes. La gran variedad de microorganismos productores de estos compuestos se refleja a su vez en la heterogeneidad de las propiedades y estructura química de los mismos. De entre ellos, los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* se han caracterizado con detalle, aunque se conoce muy poco la cinética de producción por los microorganismos en presencia de los diferentes contaminantes o su papel

en los procesos de atenuación natural.

Figura 5.8.2 A) Bacterias creciendo alrededor de gotas de crudo de petróleo en un cultivo de enriquecimiento con este producto como única fuente de carbono, a partir de muestras de suelo. B) Bacterias creciendo alrededor de masas de aceite lubricante pesado, en un cultivo de enriquecimiento con este compuesto como única fuente de carbono, a partir de muestras de un acuífero contaminado.

Es habitual la utilización de surfactantes sintéticos (a veces verdaderos detergentes), con el fin de “desprender” los compuestos orgánicos de las partículas del suelo, por ejemplo en procesos de remediación de terrenos y aguas contaminadas por hidrocarburos. Sin embargo, los biosurfactantes de origen microbiano, además de una notable variedad, presentan las siguientes ventajas que hacen de estos compuestos una alternativa sólida a las moléculas de origen químico:

- Baja toxicidad, alta biodegradabilidad, especificidad y biocompatibilidad con los medios naturales.
- Gran capacidad espumante en algunos casos y actividad sostenible

incluso en condiciones extremas de temperatura, salinidad y pH.

- Relativa facilidad de producción en biorreactores.

Biosurfactantes de naturaleza aniónica, se han utilizado en procesos de biorremediación de hidrocarburos y metales pesados, y como dispersantes de manchas de petróleo en mareas negras. Aunque muchos de estos experimentos han producido resultados muy prometedores (por ejemplo, mejorando la biodegradación de los contaminantes mediante su influencia en la biodisponibilidad de los mismos), es necesario profundizar en el conocimiento de los parámetros de los sustratos contaminados que influyen en la eficacia de estas moléculas, con el fin de predecir y modelizar su comportamiento en las diferentes situaciones.

5.9 Proceso de toma de decisiones e implantación de tecnologías: técnicas de apoyo y seguimiento

Llegados al punto en que se implementa una estrategia de biorremediación, demostrar que es efectiva sobre el terreno no es una tarea fácil. La biorremediación no es una solución infalible, y su aplicación con éxito requiere un estudio de “bioviabilidad”, que contaría, si se hace exhaustivamente, con las siguientes fases:

1. Revisión bibliográfica para obtener datos sobre la biodegradabilidad potencial de los contaminantes del emplazamiento y sobre la existencia de casos similares.
2. Toma de muestras para analizar las poblaciones microbianas, la presencia de microorganismos con capacidad biodegradadora y su potencial enzimático, si es posible. El rápido desarrollo de las técnicas moleculares y de fluorescencia y su aplicación al campo de la microbiología ambiental, ha motivado que, además de las técnicas convencionales de numeración y cultivo, se disponga en la actualidad de métodos relativamente sencillos y muy incisivos que nos permiten visualizar la actividad y disposición de los microorganismos en los sustratos

contaminados. Por ejemplo, el uso de colorantes fluorescentes como naranja de acridina, DAPI, Hoechst; la utilización de indicadores fluorescentes de viabilidad, como rodamina 123 o yoduro de propidio combinado con derivados de fluoresceína; de sales de tetrazolio (INT, CTC) indicadoras de actividad respiratoria, etc., todo ello apoyado por técnicas de observación no invasivas como la microscopía de fluorescencia confocal de barrido por láser. La presencia de grupos específicos microbianos puede a su vez analizarse mediante técnicas de hibridación “in situ” con sondas moleculares apropiadas, técnicas de amplificación (por ejemplo, para determinar la presencia de genes que codifican enzimas degradativos, si se conoce su secuencia o está conservada en varios de ellos), inmunofluorescencia, etc. Por último, las actividades degradativas pueden evaluarse mediante la medida de alguno de los enzimas intermediarios en la ruta de degradación.

3. Ensayos de laboratorio que permitan predecir las posibilidades de biorremediación, diseñar las distintas condiciones experimentales mencionadas en las aproximaciones metodológicas y evaluar la posibilidad de aplicar tecnologías “ex situ”, con las ventajas ya mencionadas. Estos estudios, que pueden realizarse en microcosmos, permitirán desarrollar las técnicas químicas más convenientes para el análisis de los contaminantes y sus productos de degradación, distinguir los procesos biológicos de los meramente químicos, como adsorción, precipitación, disolución o volatilización, analizar la existencia de posibles interacciones microbianas, cometabólicas o sintróficas, y ensayar los métodos convencionales y/o moleculares más adecuados para la cuantificación y seguimiento de las poblaciones microbianas. Las técnicas respirométricas (medida de la producción de CO_2), de fraccionamiento isotópico, o los ensayos con contaminantes marcados radiactivamente (que pueden combinarse con análisis de hibridación “in situ” en técnicas de microautorradiografía, o MAR-FISH), pueden ser útiles en este punto para evaluar la degradación biológica del contaminante.

4. Uno de los factores que hacen difícil la obtención de resultados óptimos “in situ” es, precisamente, que las condiciones experimentales no pueden

controlarse tan rigurosamente como en el laboratorio. Por ello es muy importante llevar a cabo un estudio previo de campo que incluya a todos los posibles parámetros ambientales de importancia: nutrientes, presencia de posibles aceptores de electrones, potencial redox, pH, temperatura, etc. En este apartado se contemplaría también el diseño e implantación posterior de métodos de muestreo adecuados que permitan realizar evaluaciones estadísticas fiables, así como una evaluación lo más precisa posible de los riesgos de la metodología a implantar para el medio receptor.

5. Durante el desarrollo del programa de biorremediación en el campo, el seguimiento y análisis cuantitativo de este proceso jugará un papel clave para evaluar la efectividad de la técnica escogida, por lo que deberán aplicarse los métodos previamente seleccionados para evaluar la desaparición del contaminante y/o la aparición de sus productos a lo largo del tiempo, es decir, para determinar en última instancia, el fundamento químico o biológico de dicha desaparición. La aplicación de métodos moleculares facilitará el estudio de la evolución de las poblaciones microbianas totales, tanto cultivables como no cultivables. El análisis de poliformismos de fragmentos de restricción de genes como los que codifican el ARN ribosomal, de fragmentos de restricción terminales, o de fragmentos de los genes ARN ribosomales en cadena sencilla, y la separación de fragmentos de los genes ARN ribosomales mediante geles desnaturizantes en gradiente, son técnicas ya contrastadas que permiten obtener una información muy valiosa sobre la evolución de las poblaciones bacterianas durante los procesos de biorremediación. La utilización de métodos estandarizados de análisis multivariantes mediante instrumentos moleculares, como microchips de ADN, además de proporcionar un apoyo adicional en la obtención de información sobre la estructura de las poblaciones microbianas, permitirá determinar los parámetros optimizables para mejorar el proceso. Por ejemplo, sería posible relacionar la expresión de genes microbianos de interés que codifiquen actividades degradativas, con las distintas condiciones ambientales del medio contaminado y con la eficiencia de degradación de los contaminantes en distintas condiciones

experimentales.

5.10 Conclusiones y perspectivas

La biorremediación es una herramienta que puede ser utilizada con eficacia en ciertos ambientes contaminados. Sus ventajas principales residen en su escasa agresividad con el medio cuando se aplica “in situ”, y en la destrucción de los contaminantes, en lugar de un mero traslado como se dispone en otros métodos. Es un proceso relativamente lento que requiere meses o incluso años en la mayoría de las ocasiones, pero si se efectúa adecuadamente puede resultar muy económico. Evidentemente aún quedan muchos emplazamientos contaminados (y otros que sin duda surgirán en el futuro), donde la atenuación natural no es lo suficientemente efectiva, por lo que los métodos de bioestimulación y bioaumentación serán de obligada elección. En cuanto a esta última, su efectividad futura dependerá de una mejor comprensión de los mecanismos que actúan en el proceso a escala microbiológica y biogeoquímica, así como de los fenómenos de transporte en el medio a descontaminar.

6. CONTENIDO DEL PROCESO OBJETO DE ESTUDIO

Con este estudio, se va a investigar la funcionalidad de la técnica de Landfarming (108), (111), (112) en el tramo contaminado por hidrocarburos en Málaga, en la zona por la que circulará el tren de alta velocidad Córdoba-Málaga.

En la Figura 6, se puede observar el terreno contaminado en su estado inicial.

Figura 6. Terreno contaminado original

Los precedentes, indican que la técnica elegida, presenta limitaciones debidas a la necesidad de elevados tiempos de tratamiento que dificultan la aplicabilidad de la misma. Por ello, en este trabajo, se va a investigar y desarrollar tecnologías que mejoren este proceso mediante efectos sinérgicos, que entre otras ventajas acorten ostensiblemente los tiempos de residencia precisados.

Una vez desarrollado en el apartado anterior, las diferentes técnicas que se pueden utilizar para recuperar este terreno, se va a elegir la de Landfarming. De forma resumida, podemos decir de este proceso que se basa en la biodegradación de los contaminantes orgánicos presentes en el suelo a tratar. Consiste en extender el terreno extraído en capa delgada y estimular la actividad de los microbios existentes en el suelo a tratar para aumentar la degradación de los contaminantes, por medio de la aireación del mismo y la adición de nutrientes, minerales y agua.

Esto se realiza en celdas de terreno preparadas con un sistema de impermeabilización, sobre el que se instala una red de drenaje, cubierta por

una capa de suelo drenante (arena y grava). Sobre esta última se extiende el suelo contaminado, el cual es periódicamente arado y volcado para su aireación y homogeneización.

El suelo se riega periódicamente con una solución conteniendo nutrientes y sales minerales. El sistema de drenaje se conecta a una planta de tratamiento de efluentes. En ocasiones el lixiviado puede ser recirculado hasta la total destrucción de todos los contaminantes.

El sistema es adecuado para los combustibles líquidos y en general los orgánicos con tiempos de degradación medios.

En las Figuras 6.1 y 6.2, se pueden observar sendos esquema de realización de este método.

Figura 6.1 Esquema Landfarming

Figura 6.2 Esquema Landfarming

Como conclusiones a este método se obtiene:

- El sistema es más adecuado en suelos con una concentración de bacterias heterotróficas alta.
- La humedad del suelo debe estar en un rango adecuado, lo ideal es: Porcentaje de capacidad de campo entre 40 y 85%
- La temperatura del suelo debe ser adecuada para el crecimiento bacteriano: Temperatura del suelo entre 10 y 45°C.
- El pH del suelo debe ser adecuado para el crecimiento bacteriano: pH del suelo entre 6 y 8.
- Los macronutrientes deben encontrarse en una proporción adecuada.
- Las altas concentraciones de hidrocarburos de cadena larga inhiben el crecimiento de los microorganismos. Concentración de HTP menor a 50.000 mg/kg.
- No es aplicable en terrenos de muy baja permeabilidad. En ese caso se pueden adicionar sustancias que aumenten la porosidad y laboriabilidad del suelo, tales como, serrín, restos de jardinería, paja, cáscaras de nuez, cáscaras de arroz o trigo, etc.

- No es fácilmente aplicable en zonas con precipitaciones anuales superiores a 800 mm.

En el caso estudio de este trabajo, suponiendo que se puedan mantener unas condiciones adecuadas en el terreno a tratar, y que se produjera una biodegradación totalmente aeróbica (que habitualmente sigue un proceso de reacción de grado 1) el tiempo de tratamiento sería de unos 30 meses aproximadamente; lo que resulta excesivo e inviable. Por ello, se va a necesitar realizar una importante labor de investigación para poder acortar en gran medida estos plazos.

Se deberán estudiar, investigar y desarrollar métodos de mejora de la tecnología a través de:

- Una labor de estudio e investigación en materiales y métodos de adición que aumente su **permeabilidad** (dado el alto contenido de finos del mismo).
- Se introducirán, como método de mejora complementario, concentraciones de **hidróxido de magnesio** también a investigar.
- Por otro lado será necesario trabajar sobre los métodos adecuados para mantener el ratio de **nutrientes**, para lo que se estudiarán, investigarán y desarrollarán los materiales y métodos de adición adecuados.
- Se valorarán soluciones tecnológicas con base similar a las **biopilas**, lo cual tendría un coste algo superior, debido a que se requiere un sistema de aire forzado, y la mezcla es más compleja por la altura de las mismas (no se puede emplear tractor). Sin embargo estos desarrollos podrían reducir los tiempos de tratamiento y el espacio necesario a aproximadamente la tercera parte.

La aplicación del Landfarming (64), (71), (78), (79), (86) con las técnicas complementarias mejorará previsiblemente las condiciones del tratamiento:

- Aumentará la cantidad de oxígeno disponible en el suelo.

- Mejorará la cantidad y distribución de nutrientes.
- Aumentará la biodisponibilidad de los hidrocarburos a eliminar.

6.1 Demostración en planta piloto de la funcionalidad de los desarrollos.

Tanto la aplicabilidad de la técnica de Landfarming (78) como la validación de los desarrollos derivados de este trabajo se intentó probar posteriormente a través de ensayos en planta piloto sobre los terrenos contaminados. Para ello, se espera tratar la siguiente cantidad de terreno:

- El 85 % se tratará mediante Landfarming clásico y con esta técnica asociada con los desarrollos complementarios.
- En el 7,5 % mediante combinación de Landfarming con los desarrollos complementarios y adición controlada de diferentes proporciones de Hidróxido de Magnesio.
- El 7,5 % restante se tratará sólo con diferentes proporciones de Hidróxido de Magnesio.

El proceso de supervisión de la excavación incluirá el siguiente esquema genérico de actuaciones:

- a) Excavación, carga y acopio selectivo de tierras limpias y afectadas por hidrocarburos.
- b) Bombeo y recuperación de hidrocarburo en fase libre acumulado en las celdas de excavación, en caso de detectarse.
- c) Muestreo de comprobación y/o certificación de zonas excavadas.

La recuperación, tratamiento y gestión de la mezcla agua-hidrocarburo y/o producto en fase libre en los huecos de excavación se llevará a cabo mediante la siguiente secuencia de operaciones:

- a) Recuperación de agua hidrocarburada y/o hidrocarburo en fase libre en las zonas excavadas.
- b) Acumulación en depósito de almacenamiento.
- c) Separación física de las fracciones agua-hidrocarburo.
- d) Gestión como residuo peligroso del hidrocarburo almacenado.

El empleo de los terrenos tratados on-site como relleno de la excavación estará condicionado por el cumplimiento de las concentraciones residuales máximas admisibles de los compuestos contaminantes de interés una vez finalizada la prueba con planta piloto, en función del uso futuro del emplazamiento.

En caso de ser realizada la opción de la gestión en vertedero posteriormente al tratamiento en ensayo, el diseño del Plan de Muestreo deberá incorporar los procedimientos generales de prueba y admisión de residuos, incluidos en el Anexo II del Real Decreto 1481/2001, de 27 de diciembre, por la que se regula la eliminación de residuos mediante depósito en vertedero. Así mismo, la caracterización y destino final se realizará de conformidad con la Decisión del Consejo 2003/33/CE, de 19 de diciembre de 2002, por la que se establecen los criterios y procedimientos de admisión de residuos en los vertederos con arreglo al artículo 16 y al Anexo II de la Directiva 1999/31/CEE. Los trabajos de muestreo incluirán una fase de muestreo y determinación in-situ que permita el avance de los trabajos de excavación, y un muestreo para su análisis en laboratorio acreditado, al objeto de confirmar los resultados in-situ, ampliar el espectro de análisis y garantizar los resultados obtenidos.

Los desarrollos asociados a este trabajo son:

- Adaptación tecnológica y validación funcional del sistema de Landfarming a este tipo de suelos contaminados.
- Desarrollo de medidas complementarias de efecto sinérgico con la técnica de Landfarming que permitirán:

- Aceleración de proceso de tratamiento biológico.
- Reducción de las necesidades espaciales para la realización del tratamiento.
- Eliminación total de los contaminantes.

7. ETAPAS POSTERIORES AL TRABAJO

Tras los estudios previos realizados, se llevarán a cabo una serie de fases a partir de las cuales se realizará este proyecto.

- 1º. Fase: realizar calicatas y análisis para caracterizar el terreno y localizar los hidrocarburos existentes en el mismo. Planificación de la planta piloto.
- 2º. Fase: Colocación de planta piloto, geotextil, equipos de bombeo y decantación, arado y riego.
- 3º. Fase: Colocación de tres pilas de landfarming de investigación, una con abonos y nutrientes típicos, otra con hidróxido de magnesio y otra con mezcla de ambas. Definición de operaciones periódicas de mantenimiento y análisis
- 4º. Fase: Estudio de resultados y recolocación de las tierras resultantes, investigando acciones pasivas y atemporales

Se realizarán análisis exhaustivos al inicio de los tratamientos y una vez finalizados los mismos. Esta comparación de la disminución de la carga en hidrocarburos y la conformidad con lo exigido es lo que marcará el control ejercido sobre la evolución del proyecto.

8 REALIZAR CALICATAS Y ANÁLISIS PARA CARACTERIZAR EL TERRENO Y LOCALIZAR LOS HIDROCARBUROS EXISTENTES EN EL MISMO.

Se realizó un control efectuado sobre la calidad del suelo y las aguas subterráneas, tomado en 33 puntos, del tramo final de “Integración del ferrocarril en Málaga” que se ubica en la dirección: PP.KK. 1+700 y1+950 del Proyecto

Básico y Constructivo de la Plataforma y vía de la Línea Ferroviaria de Alta Velocidad Córdoba-Málaga, en el término municipal de Málaga.

Como se ha dicho, en la zona inspeccionada se encontraba la antigua terminal del oleoducto Málaga – Puertollano y de los depósitos y conducciones de combustible se sospecha hubo fugas que vertieron hidrocarburos del petróleo al suelo.

Con el fin de evaluar cuál ha sido el grado de afección de ese fenómeno se realizó el siguiente control.

El objeto de este control es una caracterización completa del suelo. Para ello, se tomaron un total de 84 muestras de suelo y agua mediante calicatas y sondeos (según plan de muestreo establecido) y su posterior análisis en el laboratorio de TPH (121) por cromatografía, TPH en cadenas y alifáticos – aromáticos y TPH por FTIR.

El tramo estudiado para su caracterización corresponde a las márgenes del tramo final de la línea ferroviaria de alta velocidad Córdoba – Málaga. Con una longitud de unos 300 m, condicionando el muestreo a ambos márgenes de la vía proyectada. Presentando una topografía suave, que desciende en cota según la dirección suroeste – noreste.

Desde el punto de vista geológico la zona se sitúa sobre materiales cuaternarios, aluviales asociados a la desembocadura del río Guadalhorce. Se trata de sedimentos post-manto en las Zonas Internas de las Cordilleras Béticas.

En detalle, la zona muestreada, supone un conjunto detrítico donde alternan gravas, arenas, limos y arcillas, en proporciones variables. Aparecen algunos niveles más cementados, conglomeráticos, hacia el muro de la formación. Hacia techo se recubre con rellenos antrópicos.

Con respecto a la hidrogeología cabe decir que el conjunto aluvial resulta un sistema acuífero libre. El nivel freático aparece en torno a los 5 metros de profundidad y la dirección del flujo es noreste – suroeste.

Desde el PP. KK. 1+700 y 1+950 del Proyecto Básico y Constructivo de la Plataforma y vía de la Línea Ferroviaria de Alta Velocidad Córdoba-Málaga, en el término municipal de Málaga, se toman las muestras.

Para el planteamiento del muestreo de la zona se dispuso de cierta información previa como la localización del posible foco de contaminación y el área potencialmente más afectada. Basándose en esto y en las características de los trabajos en ejecución, se diseñó una estrategia de muestreo según una malla al tresbolillo con nudos cada 25 metros cubriendo los dos flancos de la proyectada vía del tren.

La localización de maquinaria activa forzó a modificar el espaciamiento de algunos nudos de la red de muestreo.

Por cada punto de muestreo se tomó como mínimo una muestra y según el caso se tomaron varias a distinta profundidad en la misma vertical.

Se tuvieron en consideración a la hora de llevar a cabo el diseño del plan de muestreo:

- La localización de los puntos de muestreo.
- El número de puntos de muestreo.
- El número de muestras en cada punto de muestreo.

8.1 Planificación de catas y toma de muestra de suelo y agua.

Se planificó la realización de una serie de catas para la toma de muestras de suelo y la toma de muestras de agua en diferentes sondeos para su posterior análisis químico en la búsqueda de posibles elementos contaminantes, concretamente hidrocarburos del petróleo.

8.2 Toma de muestras de los suelos en calicatas

De las observaciones en las catas y en las muestras de los sondeos se describe una litología que de forma general en el terreno estudiado se corresponde con lo siguiente, de techo a muro:

- Balasto y relleno de la antigua línea ferroviaria. Capa muy permeable y de afección moderada.
- Arcilla rojiza arenosa.
- Arenas y gravas. Aparece un nivel de agua semiconfinado con presencia de producto libre.
- Arenas finas limosas.
- Arcillas de color marrón compactas. Arcillas de color gris verdoso.

A continuación se presentan descripciones litológicas detalladas de varios puntos, con una distribución representativa de toda la zona estudiada:

REGISTRO DEL SONDEO				
Cliente	A			Nº DE SONDEO C 1
Localidad	Málaga			
Fecha	17/05/06	Método de perforación		
Profundidad	5.75 m	Zona		Norte
Profundidad m	Nº de muestra	Tipo litología	Piezómetro	Descripción de la litología
0.25				Relleno antrópico variado
0.5				
0.75				
1				
1.25				Limos arenosos de tonalidad anaranjada y rojiza, hacia la base un tramo más arcilloso con algo de gravas
1.5				
1.75				
2	C1/M1			
2.25				
2.5				
2.75				
3				
3.25				
3.5				
3.75				
4				Nivel de limos arenosos marrón – amarillentos con algo de grava
4.25				
4.5				
4.75				
5				
5.25				
5.5	C1/M2			
5.75				
6				

8.3. Localización de los puntos de muestreo

Los puntos de muestreo se realizaron sobre una malla al tresbolillo de 25 metros entre nudos cubriendo una longitud total de 400 metros. Estos puntos, en algún caso concreto, tuvieron que desplazarse para evitar la maquinaria existente en

obra. En ningún momento se sobrepasaron los 40 metros de distancia entre un punto y otro. Las calicatas señaladas durante el replanteo de los trabajos en campo con las denominaciones C6, C9, C11 y C15 no pudieron ser realizadas debido a la evolución de la obra civil y con objeto de no interferir con aquella.

8.4. Densidad del muestreo

Se llevó a cabo la toma de 84 muestras de suelo y agua, atendiendo a la hipótesis de la distribución espacial del contaminante, el tamaño del emplazamiento y la calidad de la información previa disponible. En algún caso más de una muestra corresponde al mismo punto de muestreo, tomadas en la misma vertical a diferentes profundidades, para delimitar verticalmente la contaminación.

8.5. Toma de muestras de agua

Se tomaron una serie de muestras de aguas en piezómetros de control, bajo las identificaciones: AS1, AS2, AS3, AS4, AS5, AS6, AS7 y AS8. Aparejado a este muestreo y en alguna de las catas, se establece un control del nivel freático, las medidas fueron las siguientes

Con estos datos se puede crear una cartografía de isopiezas que muestra una aproximación a la geometría del nivel freático en la zona y el sentido del flujo subterráneo.

En la figura se observa la isopieza correspondiente a la cota 2 m (en azul) y la dirección principal del flujo subterráneo en la zona muestreada.

Conservación de muestras de campo

Se tomaron un total de 76 muestras de suelo que se almacenaron en botes de vidrio de ¼ litro, colocadas en neveras, a una temperatura aproximada de 4 °C. Enviándose, mediante transporte urgente y debidamente selladas, al laboratorio, formalizando una Cadena de Custodia para garantizar el correcto transporte y transmisión de éstas.

Las muestras de agua se almacenaron en envases de vidrio ámbar con cierre de teflón, llenándose completamente y conservadas en neveras a unos 4° C aproximadamente. Selladas y enviadas con carácter urgente al laboratorio, formalizando una Cadena de Custodia para garantizar el correcto transporte y transmisión de éstas.

8.6 Evaluación de los problemas medioambientales

8.6.1. Resultados obtenidos de los análisis de los suelos

Resultados por debajo de los niveles genéricos de referencia

Un total de 60 muestras dio resultados de concentraciones de hidrocarburos por debajo del nivel genérico de referencia (50 mg / kg). Se consideran por tanto fuera del rango de la contaminación.

Resultados de las muestras tomadas en acopios

Cuatro de las muestras se tomaron en acopios de material, dos en el acopio norte y otras dos en el acopio sur. Dicho material muestreado procede de la excavación para la colocación de muros pantalla. Los resultados de los análisis están por debajo de los valores genéricos de referencia (NGR), según la norma, por lo que no se encontró en éstos ningún indicio de contaminación.

8.6.2 Resultado de las muestras analizadas mediante la técnica de FTIR

Algunas de las muestras de suelo se analizaron también mediante la técnica de FTIR. Los resultados en valor absoluto presentan ciertas diferencias pero no llegan a ser significativas y aparecen en el mismo rango con respecto a los valores genéricos de referencia que establece la norma a la que referimos todos los resultados.

Representamos de cada muestra el valor de la concentración en hidrocarburos totales en función a la profundidad en que se tomaron.

Muestras Profundidad	C12/M2	C13/M1- M2	C14/M1- M2	C27/M1- M2	C28/M1- M2	C29/M1- M2-M3	C30/M1- M2	S6/M1- M2-M3	S7/M1- M2
1,5									
1,75									
2									
2,25									
2,5									
2,75									807
3							5000		
3,25					4600			1400	
3,5		1100				59			
3,75									
4			5000						
4,25		2300							6230
4,5									
4,75						1400			
5	630		5000						
5,25				2700			1900		
5,5				320		1000		2000	
5,75					83				
6									
6,25									
6,5								69

En una primera lectura de la representación de los datos, se advierte una restricción de la contaminación en la franja que va de los 3 a los 5.5 metros de profundidad. Siendo el nivel freático quien marca el límite inferior, no superándose éste por la menor densidad de los hidrocarburos con respecto a la del agua.

Por otro lado el que el tramo contaminado comience a cierta profundidad (unos tres metros) puede ser debido a la existencia de un relleno antrópico posterior al evento de contaminación, habiéndose retirado probablemente parte del suelo contaminado. También, es lógico pensar que los contenedores de hidrocarburos estuvieran instalados, al menos en parte, en el subsuelo, por lo que el vertido comenzaría a la base de los mismos.

Si se observa en planta la distribución de las muestras que presentan contaminación, podemos inferir el posible progreso del vertido, que tendría una componente principal N-S, quedando muy restringido en la zona de actuación que nos afecta.

Además del nivel freático existen otros condicionantes que pueden influir en la distribución del vertido como las diferentes intervenciones antrópicas, rellenos, movimiento de tierras y las características litológicas de la zona. Así, por ejemplo,

los niveles arcillosos funcionarían como barrera al avance del vertido por sus características organolépticas y los niveles arenosos favorecerían su continuidad.

Si representamos de la misma forma los resultados obtenidos mediante la técnica de análisis FTIR, obtenemos lo siguiente:

Muestras Profundidad	C13/M1-M2	C27/M1-M2	C28/M1-M2	C30/M1-M2	S6/M1-M2-M3
1,5					
1,75					
2					
2,25					
2,5					
2,75					
3					
3,25			2200		
3,5					
3,75					
4					
4,25	2600				
4,5					
4,75					
5					
5,25		1600		1100	
5,5					1400
5,75					
6					
6,25					
6,5

En este caso los datos describen una situación equivalente a la de la anterior representación, con ligeras diferencias en el valor absoluto de los resultados de la analítica pero la interpretación es la misma.

8.7 Comparación de los resultados

Las principales características analíticas de las muestras de suelo son las siguientes:

Las muestras C12/M2; C13/M1-M2; C14/M1-M2; C27/M1-M2; C28/M1-M2; C29/M1-M2-M3; C30/M1-M2; S6/ M1-M2-M3 presentan concentraciones en TPHs muy superiores a NGR(como se observa en las tablas), en el caso RD 9/2005 establece el NGR de 50 mg/kg para suelos de uso industrial.

Las muestras C13/M2; C27/M1; C28/M1; C30/M2; S6/M2; C1/M2; C16/M2; C4/M2, analizadas por FTRI de nuevo revelan una concentración en TPHs muy superiores a los NGR establecidos.

Las muestras de agua analizadas devuelven un valor inferior a 200 µg/l para la concentración de TPH. Estamos por tanto por debajo del valor de intervención según la normativa Holandesa. Se haría necesario el análisis del riesgo para

evaluar la incidencia (asumible o no) de estas concentraciones.

En el caso de la muestra AS7, se distinguen alifáticos de aromáticos. Presentándose los alifáticos en una concentración inferior al valor de intervención y los aromáticos en una concentración inferior al valor de base.

9 COLOCACIÓN DE PLANTA PILOTO, GEOTEXTIL, ARADO Y RIEGO.

En el estudio preliminar se obtuvo información de diversa naturaleza:

- Sobre los contaminantes (estudio químico): Estado del contaminante o contaminantes presentes y su evolución. Se averiguó en qué medida había presentes fracciones biodegradables y si había existido o no anteriormente un proceso de atenuación natural.
- Sobre los microorganismos (estudio microbiológico): Se valoró en cantidad y cualidad a los microorganismos (bacterias básicamente) presentes en el medio afectado, de modo que se detectó su capacidad potencial para degradar los contaminantes.
- Sobre el suelo afectado (estudio agronómico): Se evaluó la textura del suelo, la presencia de nutrientes y otros parámetros necesarios para conocer si las condiciones para la biorremediación (113), (114), (115), (122) eran adecuadas.

Las valoraciones más importantes que se realizaron entonces, fueron las siguientes:

- ✓ La conclusión más reseñable fue que un tratamiento de Biorremediación mediante landfarming, biopilas (51), (66), (80) o técnica similar era posible, aunque las condiciones del contaminante no parecían las más adecuadas.
- ✓ Efectivamente, la ausencia casi total de hidrocarburos lineales, y en general el gran envejecimiento del producto que afectaba al suelo, impedía que se pudieran esperar resultados importantes de reducción de TPH en poco tiempo, por muy adecuado que pudiera ser el tratamiento.

- ✓ No obstante, desde el punto de vista microbiológico la situación era más optimista debido a la cantidad de microorganismos detectados y a su especialización. También se añadía que la textura arenosa del terreno iba a favorecer indudablemente el tratamiento y que, aunque los niveles nutricionales eran bajos, una adecuada bioestimulación subsanaría este problema.
- ✓ Como otro punto positivo se puede señalar que la ausencia de BTEX o de naftaleno, unido a las, en general, bajas concentraciones totales, hacía que el tratamiento que se escogiera no supusiera en principio de sistemas de captación de vapores o similares.

Basándose en estas consideraciones, y teniendo en cuenta además el interés en la realización de experiencias con hidróxido de magnesio $Mg(OH)_2$ como aditivo, se decidieron realizar los tratamientos correspondientes. Para ello, el suelo excavado en Málaga se trasladó hasta la planta de tratamiento de Los Barrios en Cádiz, donde se disponía de unos terrenos autorizados para la realización de un tratamiento biológico.

10 COLOCACIÓN DE PILAS DE LANDFARMING DE INVESTIGACIÓN, UNA CON ABONOS Y NUTRIENTES TÍPICOS, OTRA CON HIDRÓXIDO DE MAGNESIO Y OTRA CON MEZCLA DE AMBAS. DEFINICIÓN DE OPERACIONES PERIÓDICAS DE MANTENIMIENTO Y ANÁLISIS

10.1 Diseño y ejecución de los tratamientos.

10.1.1 Objetivos del proyecto.

- ✓ Reducir al máximo la concentración de hidrocarburos presente en los terrenos a tratar en un período de unos 5 a 6 meses.
- ✓ Comprobar la efectividad de varios tratamientos alternativos, con especial atención a lo referido al uso del hidróxido de magnesio.

- ✓ Como objetivo adicional y complementario al primero, se consideró de gran interés el trabajo con el suelo seleccionado dado el envejecimiento (“weathering”) que presentaban sus hidrocarburos.

10.1.2 Descripción general y diseño constructivo.

Se trató un volumen de tierras aproximado de unos 500-600 m³, contaminados con una media de 3.000-3.500 ppm de hidrocarburos.

La zona destinada al landfarming fue un terreno llano de unos 6.000 metros cuadrados, según datos proporcionados por los gestores de la Planta de Residuos Industriales de Los Barrios (Cádiz). En ella se dispusieron un total de nueve parcelas rectangulares o cuadradas de aproximadamente 200 m², en las que se “amontonaron” pequeñas pilas de unos 30-40 cm de profundidad del suelo a tratar. En total se tendrían aproximadamente unos 60 m³ de suelo en cada parcela (9) de los 500-600 totales a tratar.

Todas las parcelas se dispusieron sobre el terreno impermeable utilizado y autorizado como zona de tratamiento biológico. Al conjunto de la construcción se le dio una pendiente aproximada de un 1% que conducía a una arqueta de recogida de lixiviados. El subsuelo del terreno se protegió colocando una lámina de PEAD de 1-1,5 mm de grosor, recubriendo ésta con un geotextil, y a continuación depositando por tongadas el suelo a tratar hasta disponer el total previsto en cada pila. Para separar áreas se usaron viales suficientemente anchos que ayudaron también a evitar la contaminación cruzada.

En la siguiente figura se presenta el modelo constructivo con algunas dimensiones también orientativas.

Figura 10.1.2: Dimensiones de las áreas de tratamiento y perfil aproximado de una de ellas (Nota: las dimensiones finales de las parcelas fueron de 20 x 9 m).

10.1.3 Parcelas, productos y dosificaciones.

Dado que uno de los objetivos del proyecto consistía en comprobar la eficacia del $\text{Mg}(\text{OH})_2$ en un tratamiento de biorremediación se decidió comparar el funcionamiento de este producto, y de combinaciones del mismo, con el de otros tres habitualmente empleados en landfarming. Así sobre las nueve parcelas (según figura anterior) se aplicaron los siguientes tratamientos:

- P1: Parcela control, el suelo tal cual sin riego, volteo ni ningún tipo de aditamento.
- P2-P9: Parcelas de tratamiento, todas llevan un régimen común de riego y volteo que se describe más adelante:
- P2: Solo riego y volteo.
- P3: Mezcla del suelo con $\text{Mg}(\text{OH})_2$
- P4: Aplicación de S-200
- P5: Aplicación de FLL.
- P6: Aplicación de FLL + Surfactante Ivey-Sol
- P7: $\text{Mg}(\text{OH})_2$ + S-200
- P8: $\text{Mg}(\text{OH})_2$ + FLL
- P9: $\text{Mg}(\text{OH})_2$ + FLL + Surf. Ivey-Sol

10.1.3.1 *Productos utilizados.*

a) S200.

Fertilizante oleofílico diseñado exclusivamente para biorremediación; consistente en una emulsión que contiene urea, ésteres fosfóricos, ácido oleico, agua y otros aditivos. Utilizado habitualmente en España, donde se ha empleado con mayor o menor éxito en aguas subterráneas, y con buenos resultados en suelos y en las costas afectadas por el Prestige; a día de hoy es un producto de referencia. Se utilizó en su formulación diluida.

b) Surfactante Ivey-Sol.

Surfactante utilizado en la remediación de hidrocarburos; los surfactantes “liberan”

los contaminantes de la matriz del suelo y los hacen más accesibles a los microorganismos, algo muy necesario para aumentar la biodisponibilidad (baja en nuestro caso por el tipo de hidrocarburos presentes). Su utilización en combinación con fertilizantes de liberación lenta es una estrategia alternativa al fertilizante en solitario. El producto concreto que se empleó es el IveySol 106, específico para hidrocarburos pesados.

c) Fertilizante de liberación lenta granulado.

Fertilizante en gránulos, típico para landfarming, la dosis adecuada para biorremediación la proporciona el denominado Sierrablen, con un N:P:K de 31:5:7 que tiene liberación completa en 2-3 meses.

d) Hidróxido de Magnesio.

El hidróxido de magnesio, se genera en el proceso de calcinación de la magnesita. Debido a la estructura macrocristalina de la magnesita extraída en yacimiento y a la moderada temperatura de calcinación (inferior a 900 °C), se obtiene una magnesita cáustica con alta biodisponibilidad.

El proceso de fabricación de óxido de Magnesio (MgO) consiste en la calcinación del carbonato de magnesio o magnesita (MgCO₃) extraído en la mina en hornos rotativos, de acuerdo con la siguiente reacción:

Cada horno de calcinación de la magnesita, dispone de un sistema independiente de depuración de los humos, compuesto por cámaras gravimétricas, ciclones, enfriadores y filtros de mangas.

El polvo recogido en los filtros de gases se comercializa directamente bajo la denominación de Magal T y el excedente se deposita en fosos, donde es regado con agua para facilitar su transporte al acopia. Este material (hidróxido de magnesio) es lo que se conoce como TBH.

El hidróxido de magnesio es un producto alcalino que presenta un pH de equilibrio en contacto con el agua próximo a 9,5, por lo que la utilización del hidróxido de magnesio como estabilizante será adecuada, dado que tampona el pH en el intervalo deseado.

Es un producto en polvo, utilizado habitualmente en estabilización de suelos por sus propiedades para la inmovilización de metales, o incluso como barrera geoquímica.

10.1.3.2 *Aplicación inicial de productos en cada parcela.*

Como datos de partida se consideraron parcelas de aproximadamente 80 t (unos 50-60 m³ en 20 x 9 x 0.3). Humedad inicial del 8,5%; niveles de contaminación iniciales del orden de 3.200 ppm de TPH de una mezcla de hidrocarburos envejecida. Suelo de textura muy arenosa.

- Parcela 1: Control (atenuación natural).

Una vez dispuesta la cantidad de suelo correspondiente sobre esta parcela, no se efectuó en ella ninguna manipulación durante todo el proceso, únicamente las labores de muestreo periódico.

- Parcela 2: Riego y volteo (RyV)

Una vez determinada la humedad inicial del suelo (aprox. 8,5%) se completó esta hasta algo más de un 20% mediante la aplicación de 10.000 litros de agua mediante riego con 5.000 litros, para a continuación removerse la tierra, aplicarse los 5.000 litros restantes y finalmente removerse de nuevo.

- Parcela 3: Fertilizante de liberación lenta (FLL)

Se esparció sobre la parcela una dosis aproximada de 55 g/m² de la siguiente forma: Medio saco de Sierrablen (10 kg) en una primera pasada, para regarse a continuación con 5.000 litros de agua y removerse antes de hacer la aplicación de otro medio saco (otros 10 kg) con riego de 5.000 litros y volteo adicional.

- Parcela 4: Magnesita.

Se vertieron sobre la parcela 3,125 toneladas aproximadamente de magnesita, se regó con 5.000 litros y se volteó. Después se aplicó otra dosis igual a la anterior de magnesita, se regó con otros 5.000 litros de agua y se volteó.

- Parcela 5: Magnesita + FLL

Exactamente igual que la Parcela 4 pero añadiendo después de cada aplicación de magnesita una dosis de 10 kg (medio saco) de Sierrablen.

- Parcela 6: Magnesita + S-200.

Como la Parcela 4 pero con la siguiente modificación en los riegos: Los 10.000 l de agua incorporaron 250 litros de S-200. Por tanto, en cada depósito de 1.000 l de los utilizados se añadieron 25 litros de S-200 agitando bien el producto puro y luego agitando también para que se dispersara en el agua en lo posible.

- Parcela 7: Magnesita + FLL + Ivey Sol.

Como la Parcela 5 pero con la siguiente modificación en los riegos: Los 10.000 litros de agua incorporaron 500 litros de IveySol. Por tanto, en cada depósito de 1.000 l se debían añadir 50 l de IveySol agitando bien el producto puro y luego agitando también para que se dispersara en el agua en lo posible.

- Parcela 8: FLL + IveySol

Medio saco de Sierrablen (10 kg) en una primera pasada, para regar a continuación con 5.000 litros de agua y remover antes de hacer la aplicación de otro medio saco (otros 10 kg) con riego de 5.000 litros y volteo adicional. El agua llevaba el surfactante IveySol diluido tal y como se hizo en la parcela 7.

- Parcela 9: S-200

Primero se regó con 5.000 litros, a continuación se removió la tierra, se aplicaron los 5.000 litros restantes y finalmente se removió de nuevo. Los 10.000 litros de agua incorporaban 250 litros de S-200. Por tanto, en cada depósito de 1.000 litros se debían añadir 25 litros de S-200 agitando bien el producto puro y luego agitando también para que se dispersara en el agua en lo posible.

Parcela	Riego y volteo	FLL	Mg(OH) ₂	S-200	IveySol
1: Control	No	-	-	-	-
2: RyV	Sí	-	-	-	-
3: FLL	Sí	20 kg (10 +10)	-	-	-
4: Mg(OH) ₂	Sí	-	6,25 t (3,125 + 3,125)	-	-
5: Mg(OH) ₂ + FLL	Sí	20 kg (10 +10)	6,25 t (3,125 + 3,125)	-	-
6: Mg(OH) ₂ + S-200	Sí	-	6,25 t (3,125 + 3,125)	250 l (125 + 125)	-
7: Mg(OH) ₂ + FLL + IveySol	Sí	20 kg (10 +10)	6,25 t (3,125 + 3,125)	-	500 l (250 + 250)
8: FLL + IveySol	Sí	20 kg (10 +10)	-	-	500 l (250 + 250)
9: S-200	Sí	-	-	250 l (125 + 125)	-

Tabla 10.1.3: Resumen de aplicaciones iniciales.

10.1.3.3 Mantenimiento de las parcelas.

Al margen de los muestreos (ver punto siguiente), las tareas que periódicamente se efectuaron para el mantenimiento de las parcelas fueron las siguientes:

- Arado: Mediante mula mecánica una vez a la semana y siempre que se fuera a realizar un muestreo a continuación (excepto la parcela 1 que nunca se aró).
- Riego: Una vez a la semana se tomaban muestras de varias parcelas y se determinaba la humedad. Si el valor medio no bajaba del 15-17% no era necesario efectuar riego, si bajaba de ese nivel se regaba con el volumen de agua necesario hasta colocar las parcelas (excepto la 1) por encima del 20% de humedad.
- Finalmente, hay que añadir que en las parcelas que se aplicó FLL esto se introdujo una dosis de “recuerdo” de otros 20 kg. de fertilizante transcurridos

tres meses desde el inicio de los trabajos.

10.2 Muestreos y metodologías analíticas.

10.2.1 Procedimiento y frecuencia de los muestreos.

En un primer momento todo el suelo disponible se apiló en conjunto y se tomaron cuatro muestras representativas para evaluar el nivel de concentraciones de partida.

En el resto de los muestreos, y una vez distribuidas las parcelas, en cada una de ellas se escogían seis puntos distribuidos más o menos proporcionalmente en su superficie (evitando los bordes), en cada uno de ellos se recogieron tres incrementos de unos 400-500 g en puntos muy próximos. El total de los 18 incrementos se desagregaba y luego se tamizaba (luz de malla de 2 cm); después se hacía una homogenización y se cuarteaba hasta rellenar dos tarteras de 1 kg y un bote ámbar de 0,5 kg.

Se realizaron un total de cinco muestreos en los aproximadamente 5 meses que duró la experiencia (tiempos aproximadamente respecto al arranque de las parcelas: 5 días, 20, 40, 90 y 150; secuencias completas en Tabla 10.2).

FECHA	OPERACIÓN REALIZADA
16-20/07	Preparación de parcelas
23-27/07	Aplicación de productos
30/07	Muestreo 1
01-06/07	Medida de humedad diaria
13/08	Muestreo 2, medida de humedad
20/08	Medida de humedad
27/08	Muestreo 3, medida de humedad
03/09	Medida de humedad
10/09	Medida de humedad
24/09	Medida de humedad
01/10	Medida de humedad
08/10	Medida de humedad
15/10	Medida de humedad
17/10	Muestreo 4
18/10	Aplicación de productos, recordatorio.
22/10	Medida de humedad
29/10	Medida de humedad
07/11	Medida de humedad
12/11	Medida de humedad
21/12	Muestreo 5

Tabla 10.2: Secuencia con las operaciones más importantes realizadas en las parcelas.

10.2.2 Analítica química de los contaminantes.

10.2.2.1 *Cuantitativa.*

El parámetro más importante a la hora de hacer un seguimiento de la evolución de un landfarming es lógicamente el contenido contaminante. En el caso de suelos afectados por hidrocarburos se emplea el denominado TPH ('Total petroleum hydrocarbons'). Es importante entender que los TPH son una mezcla compleja que típicamente contiene cientos de compuestos, entre los que como ya vimos existen hidrocarburos alifáticos (de cadena simple, ramificados, cicloalcanos y alcanos) y compuestos aromáticos (benceno, alquilbencenos, HAPs, etc.). Debido a su gran variedad tanto en el petróleo crudo como en los derivados, sería demasiado laborioso analizar por separado todas las fracciones y en su lugar es más útil medir la cantidad total de TPH.

La analítica de los TPH se realiza en la actualidad, en el 99% de los casos mediante GC-FID (cromatografía de gases – detección por ionización de llama). Este método exige una extracción previa de los hidrocarburos a partir de la matriz (suelo).

Con estas premisas, el análisis cuantitativo de TPH y el reparto de los componentes por cadenas de hidrocarburos, se preparaba una submuestra representativa desde el laboratorio.

10.2.2.2 *Cualitativa.*

Mientras que la analítica cuantitativa nos permite calcular “cantidad” de contaminación, la cualitativa permite investigar la evolución de diversas fracciones. En este caso el interés en un trabajo de landfarming está relacionado con la evolución de fracciones más o menos biodegradables. La combinación de las técnicas de cromatografía de gases y espectrometría de masas ha sido la escogida para efectuar este trabajo analítico.

La cromatografía de gases (GC) es el método ideal para el análisis de fracciones ligeras y medias del crudo de petróleo y sus derivados, y por lo tanto para cualquier estudio de biodegradación que se lleve a cabo. Solo algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) de muy elevado peso molecular, las resinas y la fracción de los asfaltenos (ninguno de ellos presentes en el keroseno) pueden quedar fuera de la caracterización si ésta se realiza correctamente en todas sus etapas, desde el muestreo hasta el análisis propiamente dicho, pasando por la extracción.

La aportación del espectrómetro de masas (MS) permite identificar los compuestos que contienen las muestras, trabajándose con los iones característicos de cada familia de compuestos o de compuestos individuales en particular, siendo de esta forma más sencilla su localización. Con la actuación conjunta de los dos equipos se consigue que, mientras el cromatógrafo lleva a cabo la separación de los compuestos, el espectrómetro acumule los espectros de fragmentación de los eluidos y facilite la identificación de estos.

El método seguido para la extracción de los hidrocarburos ha sido el EPA Method 3540C: Soxhlet Extraction (extracción de los compuestos de la muestra mediante Soxhlet).

10.2.3 Analítica microbiológica.

En el laboratorio, al tratarse de muestras de suelo se realiza una extracción de microorganismos mediante una solución al 0,1% de pirofosfato sódico y unas posteriores diluciones de los extractos. Estas diluciones se sembraban por duplicado en dos tipos de placas diferentes con los siguientes medios de cultivo:

- ✓ Medio GAE que contiene glucosa como principal componente; permite el recuento de los microorganismos heterótrofos totales.
- ✓ Medio Bushnell-Haas (BH) con crudo de petróleo que permite el recuento de los microorganismos tolerantes (degradadores algunos) ya que este producto se utiliza como única fuente de carbono.

Las placas, indistintamente del medio que contenían, se cultivaron a 30°C durante tres días para el medio GAE y durante al menos una semana para el otro. Transcurrido este tiempo se realizan los recuentos y se midió la variedad microbiana existente en las placas con GAE.

10.2.4 Analítica química de nutrientes y otros parámetros.

Se realizaron una batería de análisis agronómicos del suelo que son de gran utilidad para los estudios de biorremediación puesto que en ellos se determinan parámetros clave tales como la textura, contenido en nutrientes esenciales, etc. Concretamente en nuestro caso se han realizado análisis de Materia Orgánica (M.O., oxidación con dicromato y volumetría) y el ratio C:N basado en el cálculo del nitrógeno total por el método Kjeldahl.

De forma complementaria, en la misma planta de tratamiento donde se realizaron los experimentos de landfarming se han controlado los siguientes parámetros (se indica también la metodología):

- Amonio: Determinación de amonio mediante colorimetría a través de fotómetros. ISO 7150/1.
- pH: Determinación de pH en lixiviados. Equipo utilizado: pH-metro
- Conductividad: Determinación de la conductividad en lixiviados mediante un

conductivímetro.

- Aniones (fluoruros, cloruros, nitritos, nitratos y sulfatos) mediante Cromatógrafo iónico.

Todas estas determinaciones se han realizado sobre el lixiviado de las muestras de Landfarming. Este proceso consiste en lixiviar durante 24 horas una muestra al 10 % en agua Mili-Q.

10.3.- Resultados generales.

10.3.1 Reducción de hidrocarburos (análisis cuantitativo).

Una vez que todo el suelo estuvo en Los Barrios, y antes de efectuar el reparto en parcelas, se tomaron cuatro muestras (M1 a M4) del ‘todo uno’ inicial. Se decidió que estos valores iniciales servirían como referencia para el resto de los muestreos. Los resultados en bruto de estos aparecen en las siguientes tablas.

INICIALES (T0)	M1	M2	M3	M4	Medias
C10-16	1200	1100	1200	1200	1175
C16-22	1100	990	1100	1100	1073
C22-30	5	4	5	4	49
C30-40	3	3	3	3	32
TOTAL TPH	3200	2800	3100	3000	3025

Tabla 10.3: Media inicial del “todo uno” llegado a Los Barrios

Ya disponibles los valores iniciales, y dimensionada la dosificación de productos en función de estos, a lo largo del proceso se fueron obteniendo los resultados de TPH que indicaron la evolución de las parcelas. Estos resultados “en bruto” aparecen en la tabla de la página siguiente:

Tabla 10.3.1: Resultados de TPH y reparto por cadenas medidos a lo largo del proceso en todas las parcelas.

LB1 CONTROL	30/07/2	13/08/2	27/08/2	17/10/2	18/12/2
C10-16	680	570	610	400	440
C16-22	1	1	1	960	1
C22-30	1	1	1	910	930
C30-40	870	800	580	490	490
TOTAL	4	4	3	2	2
LB2	30/07/20	13/08/20	27/08/20	17/10/20	18/12/20
C10-16	580	440	380	240	250
C16-22	1	920	830	680	650
C22-30	560	510	450	390	390
C30-40	390	320	230	270	270
TOTAL	2	2	1	1	1
LB3 FLL	30/07/20	13/08/20	27/08/20	17/10/20	18/12/20
C10-16	490	220	150	77	69
C16-22	880	710	520	430	370
C22-30	640	550	380	360	320
C30-40	470	420	270	260	220
TOTAL	2	1	1	1	980
LB4 MG	30/07/20	13/08/20	27/08/20	17/10/20	18/12/20
C10-16	560	250	280	210	150
C16-22	630	690	550	640	520
C22-30	490	590	370	520	430
C30-40	300	370	190	290	250
TOTAL	1	1	1	1	1
LB5 MG + FLL	30/07/20	13/08/20	27/08/20	17/10/20	18/12/20
C10-16	170	200	190	95	81
C16-22	370	540	630	320	330
C22-30	320	480	620	280	320
C30-40	210	340	420	200	190
TOTAL	1	1	1	900	930
LB6 MG + S200	30/07/	13/08/	27/08/	17/10/	18/12/
C10-16	320	200	260	150	100
C16-22	540	540	600	410	430
C22-30	330	320	380	260	340
C30-40	250	220	250	190	220
TOTAL	1	1	1	1	1
LB7 MG + FLL +	30/07/	13/08/	27/08/	17/10/	18/12/
C10-16	430	480	350	160	100
C16-22	820	800	560	470	420
C22-30	470	500	290	300	390
C30-40	360	390	190	240	260
TOTAL	2	2	1	1	1
LB8 FLL +	30/07/	13/08/	27/08/	17/10/	18/12/
C10-16	380	380	290	140	99
C16-22	830	860	830	650	490
C22-30	460	530	500	530	370
C30-40	360	410	390	430	290
TOTAL	2	2	2	1	1
LB9 S-200	30/07/	13/08/	27/08/	17/10/	18/12/
C10-16	570	360	280	150	130
C16-22	1	890	730	610	620
C22-30	1	520	410	390	410
C30-40	800	390	300	290	280
TOTAL	4	2	1	1	1

Como se puede observar, en el primer muestreo y en menor medida en los siguientes aparecen algunos valores anómalos con respecto a los iniciales (por

ejemplo 4500 en la parcela 1, o bien 1100 en la parcela 3 para el primer muestreo no son valores lógicos). Este es un efecto de la heterogeneidad de las parcelas, que se corrige en el tiempo a medida que el número de arados va creciendo; por ello es habitual en estos trabajos efectuar una corrección de los valores:

- En nuestro caso se ha optado por considerar para el primer muestreo (30/07) una media ponderada con peso dos para la media de todas las parcelas y peso uno para el valor medido en la parcela en concreto (para los sucesivos muestreos la ponderación se ha ido reduciendo a un tercio, un cuarto, un quinto y un sexto respectivamente). Esto suaviza los datos y permite interpretar con más fiabilidad lo ocurrido en el proceso (ver tablas 5.3). El procedimiento utilizado es una sistemática sensata y lógica que ya ha sido aplicada en otros trabajos; además se puede comprobar en la última columna que si se hace una clasificación final por parcelas en función de su éxito no cambian los resultados de usar una tabla a otra, por lo que insistimos en que se trata de una suavización para reducir errores de muestreo.

Valores en bruto	25/07/2007	30/07/20	13/08/20	27/08/20	17/10/20	18/12/20
LB1 CONTROL	3025	4500	4100	3700	2800	2900
LB2 RIEGO+VOLTEO	3025	2600	2200	1900	1600	1600
LB3 FLL	3025	2500	1900	1300	1100	980
LB4 Mg	3025	1700	1900	1400	1700	1300
LB5 Mg + FLL	3025	1100	1600	1900	900	930
LB6 Mg + S-200	3025	1400	1300	1500	1000	1100
LB7 Mg + FLL +	3025	2100	2200	1400	1200	1200
LB8 FLL + IVEYSOL	3025	2000	2200	2000	1700	1300
LB9 S-200	3025	4100	2200	1700	1400	1400
Medias	3025	2444	2178	1867	1489	1412

Valores corregidos	25/07/2007	30/07/2007	13/08/2007	27/08/2007	17/10/2007	18/12/2007
LB1 CONTROL	3025	3130	3459	3242	2538	2652
LB2 RIEGO+VOLTEO	3025	2496	2193	1892	1578	1569
LB3 FLL	3025	2463	1993	1442	1178	1052
LB4 Mg	3025	2196	1993	1517	1658	1319
LB5 Mg + FLL	3025	1996	1793	1892	1018	1010
LB6 Mg + S-200	3025	2096	1593	1592	1098	1152
LB7 Mg + FLL + IVEYSOL	3025	2330	2193	1517	1258	1235
LB8 FLL + IVEYSOL	3025	2296	2193	1967	1658	1319
LB9 S-200	3025	2996	2193	1742	1418	1402
Medias	3025	2444	2178	1867	1489	1412

Tablas 10.3.1.1: Resumen de concentraciones totales de TPH, arriba en bruto; abajo con correcciones.

Utilizando los datos de la segunda tabla se tiene el siguiente gráfico de evolución:

Figura 10.3: Evolución del TPH total en todas las parcelas en los 5 meses de duración del tratamiento.

Según la figura anterior parece evidente que el comportamiento de cualquiera de las parcelas P2 a P7 ha mejorado mucho la utilizada como referencia de atenuación natural P1. Entre P2 y P7 los resultados ya se asemejan bastante entre sí, por lo que se requiere un análisis más fino. Vemos en primer lugar una tabla de rendimientos:

Valores corregidos	% reducción
LB1 CONTROL	12.33
LB2 RIEGO+VOLTEO	48.14
LB3 FLL	65.22
LB4 Mg	56.41
LB5 Mg + FLL	66.60
LB6 Mg + S-200	61.92
LB7 Mg + FLL +	59.16
LB8 FLL + IVEYSOL	56.41
LB9 S-200	53.65
Media	53.31

Tabla 10.3.1.2: Reducción total de TPH después de 5 meses de estudio

Observaciones:

- Con estos valores ya es posible afirmar también que cualquiera de los tratamientos usados mejora significativamente (al menos un 5,5%) no solo al control sino también al simple arado y riego de los suelos (P2).
- El surfactante IVEYSOL no mejora el rendimiento de las combinaciones FLL y especialmente Mg + FLL por lo que es un producto que no ha proporcionado un buen comportamiento.
- Algo similar ocurre con el fertilizante S-200 cuyo rendimiento en solitario es

menor que el de FLL aunque parece que mejora combinado con el $\text{Mg}(\text{OH})_2$.

- En cuanto al funcionamiento del $\text{Mg}(\text{OH})_2$ su rendimiento es menor que el del FLL pero aún así parece una buena opción.

Figura 10.3.1: Evolución del TPH total en las parcelas 3,4 y 5

Según la figura, sorprende que un único compuesto que contiene magnesio (nutriente esencial pero minoritario) tenga un efecto parecido al de un fertilizante con N y P. Sin embargo se observa también cómo la reducción lograda por el $\text{Mg}(\text{OH})_2$ es menos gradual que la lograda por el FLL (este fenómeno tendrá su explicación posterior). El efecto combinado de los dos productos es más caótico pero el resultado final no es aditivo. Aclaremos un poco más la situación con la siguiente figura:

Figura 10.3.1.1: Evolución de TPH en las parcelas 3,4 y 9

Observando esta figura se puede afirmar que la evolución con FLL y con S-200 se corresponde con un modelo exponencial sin dientes de sierra, sin embargo en el caso del $\text{Mg}(\text{OH})_2$ se produce una bajada inicial muy abrupta (más aún si consideráramos los datos en bruto) y dientes de sierra a medio/largo plazo. Se puede concluir, por tanto, que el comportamiento del $\text{Mg}(\text{OH})_2$ no es el de un nutriente y que algún tipo de efecto físico- químico es el que se produce por su adición.

10.3.2 Reducción de hidrocarburos (análisis cualitativo).

Como transición entre análisis cualitativo y cuantitativo, se puede investigar brevemente cómo ha cambiado el reparto que por cadenas (tamaños de molécula) se ha producido en el proceso. Para ello tomaremos como ejemplo la parcela en la que se aplicó FLL como paradigma de la biorremediación.

	Inicial	30/07	13/08	27/08	17/10	18/12
% C10-16	38.8	19.6	11.6	11.5	7.0	7.0
% C16-22	35.5	35.2	37.4	40.0	39.1	37.8
% C22-30	16.2	25.6	28.9	29.2	32.7	32.7
% C30-40	10.8	18.8	22.1	20.8	23.6	22.4

Figura 10.3.2: Evolución del reparto por cadenas del TPH total en la parcela 3 (FLL)

Se aprecia claramente un enriquecimiento relativo en las cadenas más largas, comportamiento lógico en proceso de biodegradación dado que en general (ver matices en el apartado siguiente) las moléculas más pesadas son menos

biodegradables. Este fenómeno, como se puede comprobar en la siguiente tabla, es más acusado en las parcelas donde mejores niveles de degradación se han conseguido y mucho menor en P2 y especialmente en P1.

En cuanto al análisis cualitativo realizado por GC-MS, sintetizamos en la siguiente tabla lo observado comparando la situación inicial de los contaminantes con la final en la parcela 1 (atenuación natural) y en la parcela 3 (FLL) que es la que se ha conseguido una mayor biodegradación familia a familia. El resto de parcelas presentan resultados intermedios entre estos dos extremos.

COMPUESTO/S			Inicial Julio	Parcela 1 18-12	Parcela 3 18-12
ALIFÁTICOS	Alcanos lineales	H. lineales C8-C15	0	0	0
		H. lineales C15-C20	0	0	0
		H. lineales C20-C25	0	0	0
		Ceras C26-C35	1	1	0
	Alcanos ramificados	Iso – Anteiso	1	1	0
		Isoprenoides (Pristano, Fitano y otros)	3	3	2
	Cicloalcanos	Ciclohexanos	1	0	0
		Hopanos, esteranos *	2	2	3
AROMÁTICOS	Monoaromáticos	BTEX	0	0	0
		Alquilbencenos	1	0	0
	Poliaromáticos	Naftaleno	0	0	0
		Alquil-Naftalenos	1	0	0
		Antraceno-Fenantreno	0	0	0
		Alquil Antraceno-Fenantreno	2	2	0
		Fluoreno	0	0	0
		Alquil-Fluorenos	0	0	0
		Otros (pireno, criseno y derivados)	1	1	1
		Otros (venzo-pirenos, etc.)	1	1	1
	Heterocíclicos con azufre	Benzotiofenos	1	1	0
		Dibenzotiofenos	2	2	1

Tabla 10.3.2: Resultados por compuestos y familias. (Ab* → 0: No detectado; 1: Trazas; 2: Identificado y abundante; 3: Identificado y muy abundante)

* El aumento en la calificación de hopanos y estranos no significa que haya aumentado su concentración sino que, dado que son los compuestos más resistentes a la degradación su proporción relativa ha aumentado.

Para ilustrar un poco más los resultados, en la siguiente figura se presenta una

composición de algunos de los cromatogramas obtenidos:

Figura 10.3.2.1: Cromatogramas correspondientes a los iones 57 y 191 del suelo inicial (a), el suelo de la parcela de control tras los cinco meses de tratamiento (b), y el suelo de la parcela tratada con FLL tras cinco meses (c). Los dos cromatogramas de arriba (a y b) muestran aspectos muy similares, mientras que en (c) se ha producido un enriquecimiento relativo en hopanos, lo que demuestra que ha existido una biodegradación ya que los hopanos son mucho más resistentes al

ataque bacteriano que los isoprenoides (también marcados en las figuras) y cualquier otros proceso no biológico les afectaría tanto a unos como a otros de forma similar. Adicionalmente el área de UCM (mezcla compleja sin resolver) es bastante menor en el cromatograma c lo que abunda en el mismo argumento ya expuesto.

10.3.3 Evolución microbiológica.

Se verificó la presencia de cantidad y especialización suficiente de microorganismos adaptados para comenzar el proceso. Este hecho se ha ido verificando en el transcurso del proyecto, como se muestra en los resultados de los recuentos efectuados:

	Control	RyV	FLL	Mg	FLL +	Mg + S-	Mg + Fil	Fil +	S-200
	LB1	LB2	LB3	LB4	LB5	LB6	LB7	LB8	LB9
Inicial	5.5E+06	5.5E+06	5.5E+06	5.5E+06	5.5E+06	5.5E+06	5.5E+06	5.5E+06	5.5E+06
30/07	3.4E+06	1.2E+07	1.2E+08	4.2E+06	5.7E+06	3.6E+07	4.9E+05	6.0E+07	6.0E+07
13/08	2.0E+04	1.4E+05	5.8E+04	4.4E+05	2.4E+05	4.6E+05	1.8E+06	2.8E+04	6.4E+04
27/08	8.4E+05	1.0E+07	1.2E+05	3.2E+06	2.2E+05	1.2E+05	1.3E+07	8.0E+07	6.0E+07
17/10	2.2E+06	5.0E+04	4.8E+06	8.2E+03	7.4E+03	3.8E+03	4.0E+03	1.4E+05	1.3E+04
21/12	3.2E+05	1.1E+06	6.2E+06	3.9E+05	3.1E+05	1.8E+06	7.4E+05	7.0E+06	6.0E+06
Media	1.4E+06	4.7E+06	2.6E+07	1.6E+06	1.3E+06	7.7E+06	3.1E+06	2.9E+07	2.5E+07

Tabla 10.3.3: Recuentos microbianos en medio GAE. El valor inicial común corresponde a las medias de las cuatro muestras del “todo uno” previo al reparto en parcelas.

Las fluctuaciones que se observan tienen que ver con la mayor o menor humedad de las muestras al recogerse o con otros parámetros más o menos aleatorios. Por ello es el dato del promedio (última fila) el más fiable para conocer cómo ha evolucionado el proceso en cada parcela. En este sentido se aprecia cómo, en las únicas parcelas en las que se alcanzan valores por encima de 10^7 microorganismos se aplicó algún fertilizante y no se aplicó $\text{Mg}(\text{OH})_2$. Comentaremos en las conclusiones qué significado puede tener esto.

Figura 10.3.3: Ejemplo de crecimiento bacteriano en placas de sucesivas diluciones (muestra parcela LB2, a 13/08).

10.3.4 Nutrientes y otros parámetros.

Como ya se describió en el apartado de metodología, se realizaron diversas determinaciones que comentamos a continuación.

10.3.4.1 Evolución del pH.

Las determinaciones que sobre el suelo empleado en Los Barrios se habían realizado con anterioridad mostraban un suelo más o menos alcalino con importante contenido en carbonatos y un pH de 8-8,5. En el seguimiento efectuado se midieron los siguientes valores por parcela:

pH	30/07	13/08	27/08	17/10	21/12	Medias
LB1 CONTROL	8.01	8.91	8.63	7.67	7.96	8.24
LB2 RIEGO+VOLTEO	7.95	8.86	8.54	8.06	8.36	8.35
LB3 FLL	7.85	8.38	8.25	7.76	7.87	8.02
LB4 Mg	9.93	10.12	10.14	9.81	9.86	9.97
LB5 Mg + FLL	9.81	10.2	9.88	9.91	9.64	9.89
LB6 Mg + S-200	9.88	10.22	10.03	9.90	10.04	10.01
LB7 Mg + FLL +	9.56	10.01	10.05	9.68	9.91	9.84
LB8 FLL + IVEYSOL	7.86	8.22	8.42	8.01	8.66	8.23
LB9 S-200	8.12	8.46	8.4	8.49	8.57	8.41

Tabla 10.3.4.1: Evolución de los valores de pH.

En general el pH se mantuvo en valores adecuados en todas las parcelas, a excepción de las que tuvieron adición de $Mg(OH)_2$, en éstas se superó en ocasiones el pH 10, valor fuera ya de los recomendados habitualmente para biorremediación (entre 6 y 9).

Figura 10.3.4.1: Evolución del pH total en todas las parcelas en los 5 meses de duración del tratamiento.

10.3.4.2 Evolución de la conductividad.

Conductividad (S/m)	30/07	13/08	27/08	17/10	21/12	Media
LB1 CONTROL	0.33	0.36	0.41	0.23	0.16	0.30
LB2 RIEGO+VOLTEO	0.21	0.22	0.20	0.16	0.10	0.18
LB3 FLL	0.29	0.29	0.24	0.16	0.15	0.22
LB4 Mg	0.47	0.40	0.48	0.41	0.17	0.38
LB5 Mg + FLL	0.64	0.46	0.53	0.42	0.18	0.45
LB6 Mg + S-200	0.52	0.50	0.55	0.41	0.13	0.42
LB7 Mg + FLL + IVEYSOL	0.48	0.39	0.48	0.41	0.14	0.38
LB8 FLL + IVEYSOL	0.30	0.33	0.31	0.19	0.12	0.25
LB9 S-200	0.24	0.26	0.26	0.18	0.11	0.21

Tabla 10.3.4.2: Evolución de los valores de conductividad.

En general los valores se han mantenido en parámetros normales, con una subida marcada no obstante para las parcelas con $\text{Mg}(\text{OH})_2$ por la puesta en disolución de importantes cantidades del ión Mg^{2+} .

10.3.4.3 *Materia orgánica.*

M.O. (%)	30/07	13/08	27/08	17/10	21/12	Medias
LB1 CONTROL	0.95	1.43	1.52	1.36	1.43	1.34
LB2 RIEGO+VOLTEO	0.98	0.9	1	0.97	0.86	0.94
LB3 FLL	1.51	0.95	0.79	0.9	0.87	1.00
LB4 Mg	1.27	1.28	1.1	1.23	1.05	1.19
LB5 Mg + FLL	1.23	1.27	1	0.97	0.89	1.07
LB6 Mg + S-200	0.99	1.22	0.93	1.06	0.87	1.01
LB7 Mg + FLL +	1.19	1.15	1.26	0.93	0.92	1.09
LB8 FLL + IVEYSOL	0.85	0.99	0.84	0.93	0.86	0.89
LB9 S-200	0.93	1.01	0.9	0.87	0.9	0.92

Tabla 10.3.4.3: Evolución de los contenidos en Materia Orgánica.

Tanto los valores finales alcanzados en las parcelas como las medias, son muy similares en todos los experimentos. La excepción es la parcela de control, en la que la bajada ha sido mucho menor (recordemos que en el cálculo de M.O entraría la natural del suelo y la que aportan los contaminantes).

10.3.4.4 *Ratio C:N*

Los ratios carbono:nitrógeno descritos como idóneos en la literatura son del orden de 10:1 a 15:1. Según la tabla que figura a continuación estos valores se han alcanzado plenamente o se ha conseguido aproximarlos, básicamente en las parcelas que contenían FLL, y en menor medida en las que han incorporado S-200.

Ratio C:N	30-07	13-08	27-08	17-10	21-12	Medias
LB1 CONTROL	18.8	36.8	32.8	34.7	29	30.42
LB2 RIEGO+VOLTEO	24.6	24.4	26.5	25.6	23.7	24.96
LB3 FLL	13.1	11.6	11.8	14.3	12.3	12.62
LB4 Mg	37.3	36.7	30.7	33	27.1	32.96
LB5 Mg + FLL	11.1	30.4	18.6	20.2	12.7	18.60
LB6 Mg + S-200	25	29.6	20.1	23.7	19.4	23.56
LB7 Mg + FLL +	24.5	23.6	19.9	16.7	15.1	19.96
LB8 FLL + IVEYSOL	11.3	16.7	12.9	17.1	14.6	14.52
LB9 S-200	21.1	22.4	16.4	16.8	18	18.94

Tabla 10.3.4.4: Evolución de los ratios C:N.

10.3.4.5 *Especiación del Nitrógeno.*

El nitrógeno medido para el cálculo del ratio del apartado anterior es el denominado N Kjeldahl o nitrógeno total. En la siguiente tabla se presenta otra aproximación

(más inexacta) mediante el cálculo de la presencia de nitratos, amonio y nitritos (las tres formas químicas más habituales del N).

	Nitratos (NO_3^-)	Nitritos (NO_2^-)	Amonio (NH_4^+)
	mg/l	mg/l	mg/l
LB1 CONTROL	0.0	0.0	0.0
LB2 RIEGO+VOLTEO	0.8	0.0	0.2
LB3 FLL	28.0	1.2	0.2
LB4 Mg	2.0	0.0	0.1
LB5 Mg + FLL	13.8	7.8	0.1
LB6 Mg + S-200	9.1	0.0	0.1
LB7 Mg + FLL +	13.2	2.0	0.4
LB8 FLL + IVEYSOL	13.5	4.7	0.1
LB9 S-200	0.0	0.0	0.1

Tabla 10.3.4.5: Medias de los cinco muestreos con la abundancia de las distintas especies químicas del nitrógeno (medido sobre lixiviado).

Aunque estos valores son mucho más inestables y dependiente de las condiciones de muestreo y análisis (poco reproducibles), y además las medidas se hacen sobre lixiviado no sobre suelo, las medias indican hechos coherentes: Las parcelas con FLL presentan valores altos en los tres tipos de iones, mientras que en el resto no hay cantidades reseñables.

10.3.4.6 Evolución del contenido en fósforo.

Después del N, el P es el segundo nutriente más importante para los procesos microbianos, por ello su control resulta también significativo en la biorremediación.

P asimilable (mg/kg)	30/07	13/08	27/08	17/10	21/12	Media
LB1 CONTROL	6	6	1.7	0.5	1.2	3.08
LB2	5	8	0.5	0.4	0.2	2.82
LB3 FLL	51	15	1.8	2	1	14.16
LB4 Mg	6	8	1.1	0.9	0.6	3.32
LB5 Mg + FLL	14	12	0.9	0.5	2.9	6.06
LB6 Mg + S-200	7	7	0.8	0.4	1.1	3.26
LB7 Mg + FLL + IV.	19	17	0.9	0.5	2.7	8.02
LB8 FLL + IVEYSOL	23	17	1.1	0.8	0.8	8.54
LB9 S-200	4	3	0.5	0.2	0.7	1.68

Tabla 10.3.4.6: Evolución del contenido en P.

En buena lógica de nuevo las parcelas con FLL son las que han presentado mayor contenido en P, coincidiendo un segundo repunte con la aplicación de la dosis de

“recuerdo”.

10.3.4.7 Evolución de la concentración de aniones principales.

	Cloruros (Cl^-)	Sulfatos (SO_4^{2-})	Fluoruros (F^-)
LB1 CONTROL	30.4	104.9	16.2
LB2 RIEGO + VOLTEO	12.4	34.0	2.4
LB3 FLL	14.1	48.1	4.1
LB4 Mg	35.4	124.2	4.9
LB5 Mg + FLL	55.0	140.3	14.0
LB6 Mg + S-200	39.1	124.7	4.3
LB7 Mg + FLL + IVEYSOL	48.6	94.3	14.0
LB8 FLL + IVEYSOL	15.2	60.3	3.5
LB9 S-200	20.3	59.7	2.5

Tabla 10.3.4.7: Medias de los cinco muestreos con la abundancia de aniones principales (datos en mg/l).

Destacan dos hechos principales:

- En la parcela 1, se han mantenido valores altos ya que ha habido menores opciones al lavado del suelo dado que no se ha efectuado arado ni riego.
- En las parcelas con $\text{Mg}(\text{OH})_2$ la elevada presencia de cloruros y sobretodo de sulfatos en los lixiviados se debe indudablemente al desequilibrio inducido por la introducción del hidróxido (subida de pH y presencia masiva de Mg^{2+}).

10.4.- Conclusiones y recomendaciones.

Los valores obtenidos en las muestras de suelo revelan la existencia de una zona en la que la concentración en hidrocarburos supera los límites marcados por la legislación vigente. (Anexo V del Real Decreto 9/2005 de 14 de Enero (BOE 18.01.05), que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios estándares para la declaración de suelos contaminados), por lo que se considera que existe afección al subsuelo para los parámetros legislados, provocada por un episodio de fuga de hidrocarburos del petróleo.

Tenemos así un total de 19 muestras localizadas dentro de una misma área, cuyo

análisis da como resultado una concentración de Hidrocarburos totales del petróleo superior a los 50 mg/kg de suelo seco. Atendiendo a los criterios para la evaluación de la calidad del suelo, tenemos que cuatro de estas muestras están por encima del nivel de detección del laboratorio analítico (>5000 mg/kg), superando el rango de 100 veces el NGR, el suelo puede ser considerado como contaminado. Las 15 muestras restantes están por encima del NGR vigente y en este caso se considera el suelo afectado por hidrocarburo.

La afección descrita aparece en una franja comprendida entre 3 m y 5,50 m de profundidad. Aunque dicha afección solo aparece en el área adyacente al actual trazado ferroviario, presenta el riesgo de extenderse según una pluma contaminante de componente direccional principal norte – sur, por el arrastre que ejercería el flujo subterráneo sobre estos hidrocarburos acumulados en el suelo y la geología de la zona.

De los resultados obtenidos, si extrapolamos un valor medio para toda el área afectada, unos 3.760 m², y dado que la potencia media es de 3 metros, podemos estimar en 11.280 m³ el volumen de suelo afectado por presencia de hidrocarburos.

Los valores obtenidos de las muestras de agua, ponen de manifiesto que el nivel freático actuaría también como barrera geoquímica evitando la contaminación en cotas inferiores. Esto se debe a que los derivados del petróleo quedarían como sobrenadantes al tener un peso específico inferior al del agua. Del análisis de componentes se deduce una concentración de TPH por debajo del valor de intervención que establece la normativa holandesa, y a la expectativa de que un análisis de riesgo revele lo contrario, en principio sería un valor asumible.

En líneas generales los resultados del trabajo han sido positivos. Se ha conseguido rebajar considerablemente, incluso por debajo de 1.000 ppm en algunas parcelas, el nivel de contaminación inicial en un plazo bastante corto. Todo ello en unas condiciones de partida nada favorables en lo que se refiere al tipo de hidrocarburos presentes por lo que el proyecto es bastante novedoso en este aspecto. Es indudable, por otra parte, que con unos contaminantes más “frescos” (vertido más reciente y menos degradado) se hubiera podido bajar de 500 ppm.

Se demuestra por tanto que el vertido es de la estación de bombeo por la antigüedad del hidrocarburo.

Todo esto ha de matizarse según el tipo de tratamiento empleado. En este sentido, el que resulta “ganador” a todas luces es el empleado en la parcela 3 (riego, volteo y adición de fertilizante de liberación lenta –FLL-). Así lo demuestra, no solo la bajada de la concentración de TPH, sino también los recuentos microbianos y la evolución del ratio C:N. Por si fuera poco, el bajo coste del FLL frente a los fertilizantes tipo S200 hace más contundente esta conclusión.

El S200 es un producto fiable, pero en este trabajo ha proporcionado un rendimiento menor que el FLL, como consecuencia de la consecución de unos ratios C:N menos adecuados. La explicación más probable a este resultado es la baja dosificación empleada (una más alta se descartó por el coste), y la no aplicación de dosis de “recuerdo” (por el mismo motivo).

Por otro lado, en las parcelas en las que se aplicó surfactante su uso no ha supuesto mejor rendimiento, lo que en este caso es achacable al tipo de suelo con el que se ha trabajado. Éste era inicialmente muy pobre en materia orgánica, y contaba con una textura muy arenosa cuestiones que implican la casi ausencia total de agregados húmicos y de arcilla. Los surfactantes son útiles precisamente en materiales arcillosos o con mucha M.O. puesto que permiten “desorber” las moléculas de contaminante atrapadas. En nuestro caso, por tanto su adición se ha demostrado innecesaria, aunque en dosis más altas probablemente hubiera facilitado un cierto lavado.

En cuanto al hidróxido de magnesio como aditivo para biorremediación, se ha mostrado inadecuado, al menos en las dosis en las que se ha empleado y en las condiciones ensayadas, ya que ha provocado un pH excesivamente alcalino que indujo una bajada en las poblaciones microbianas. Además, el estudio detallado de los cromatogramas revela que en la parcela donde se añadió en solitario no se ha producido apenas biodegradación (en las que se mezcló con otros productos se superponen efectos). Esto parece contradictorio con las importantes bajadas que se observaron en la citada parcela inmediatamente a su aplicación; la explicación es que el producto ha demostrado ser un buen inertizante, dificultado la extracción de los hidrocarburos en los procedimientos analíticos. Efectivamente, la extracción

para la analítica no deja de ser una lixiviación brutal, por lo que un producto con capacidad de encapsulamiento como un hidróxido reduce las concentraciones medidas.

Según el argumento anterior, el hidróxido consigue “secuestrar” los contaminantes pero no biodegradarlos (=destruirlos), por lo que sería un buen producto para un proceso de inertización o estabilización. Sin embargo este tipo de tecnologías no son las lógicas para atacar un problema de contaminación de suelos por hidrocarburos, y aunque lo fueren, la legislación vigente recomienda técnicas destructivas.

En caso de trabajarse con un suelo ácido ($\text{pH} < 5,5$) y con unas dosis menores a las empleadas en este trabajo (5% en peso), la mezcla de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ con el suelo – siempre que se complementara con un fertilizante- podría aportar buenos resultados para la biorremediación ya que mejoraría el pH.

Pasando ya a una valoración final sobre el suelo, cabe decir que en la mayoría de las parcelas los niveles de contaminación remanentes son ya bajos, y habrán descendido un poco más en el tiempo transcurrido desde el último muestreo. Además, está descartada –quizá solo a nivel de trazas- la presencia de PAHs, BTEX u otros hidrocarburos peligrosos, por lo que en nuestra opinión el suelo es prácticamente ya un residuo inerte (a salvo de la calificación que pueda recibir legalmente). No obstante, dado que las parcelas 1 y 2 aún mantienen niveles un poco elevados, si se considera asumible en costes frente a otras opciones, la mezcla del suelo de las nueve parcelas y una adición de FLL con riego y volteo frecuente durante unos meses llevaría a una degradación ya casi completa de cualquier resto de hidrocarburos.

De todo esto se concluye que se debería utilizar como complemento el $\text{Mg}(\text{OH})_2$ únicamente en terrenos cuyo pH fuera muy bajo, siendo la clave para su correcta funcionalidad y resultado positivo, la búsqueda de un compensador de la alcalinidad de dicho componente.

Por ello, la siguiente línea de investigación sería conseguir otro producto para mezclar y compensar la alcalinidad del $\text{Mg}(\text{OH})_2$ y de esta manera comprobar la eficacia de este componente en la biorremediación de suelos contaminados.

11 BIBLIOGRAFÍA

La bibliografía sobre la que me he apoyado para los procesos relacionados con biorremediación y landfarming es:

- (1) Acuña, A. J., Tonín, N. L., Díaz, V., Pucci, G. N., & Pucci, O. H. (2012). Optimización de un sistema de biorremediación de hidrocarburos a escala de laboratorio. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 13(1), 105-112.
- (2) Acuña, M., & Alfonso, R. (2001). Manejo ambiental de residuos sólidos en el Oleoducto Nor Peruano (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Ingeniería. Facultad de Ingeniería Ambiental).
- (3) Alexander, M. (1994). Biodegradation and bioremediation. San Diego, Ca. Academic press.
- (4) Alva, V. A. C. (2014, June). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. In 3ra Jornada Científica de Estudiantes 2014-Facultad de Ingeniería y Arquitectura.
- (5) Araujo, I., Angulo, N., Cardenas, C., Méndez, M., Morante, M., & Machado, M. (2004). Biorremediación de suelos con consorcio bacteriano, compostaje y fertilización. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 38(3).
- (6) Arregui, I. A., Crespo, C. G., & Alkorta, I. (2002). Biorremediación y Ecología. *Ecosistemas: Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*, 11(3), 10.
- (7) Arrieta ramírez, Olga, Rivera Rivera, A. P., Arias Marin, Lida, Alberto Rojano, Benjamín, Ruiz, O., & Cardona Gallo, S. A. Biorremediación de un suelo con diesel mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Gestión y Ambiente*; Vol. 15, núm. 1 (2012); 27-40 *Gestión y Ambiente*; Vol. 15, núm. 1 (2012); 27-40 2357-5905 0124-177X.
- (8) Arroyo, M., Quesada, J., Quesada, R., & Geocisa, J. (2004). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. Geocisa. División de Protección Ambiental, Guadalajara-México.[Links].

- (9) Atlas R, Bartha R. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Ed. Addison Wesley. Madrid. 2002.
- (10) Becerril, J. M., Barrutia, O., Allica, H., JI, G. P., Hernández, A., & Garbisu, C. (2002). Fitorremediación y biorremediación: nuevas tecnologías biológicas para la eliminación de los contaminantes del suelo. In 2. Jornadas Científicas sobre Medio Ambiente. Madrid (España). 16-17 Abr 2002..
- (11) Belloso, C., Javier, C., & de Ingeniería Sanitaria, A. P. (1998). Biodegradación de hidrocarburos en suelos contenidos en terrarios. In Gestión ambiental en el siglo XXI (pp. 1-6). APIS.
- (12) Benazzo, G. (1996). Biorremediación: residuos, suelo y agua; posibilidades de aplicación. Empresa y medio ambiente, 3(18), 54-6.
- (13) Besalatpour, A., Hajabbasi, M. A., Khoshgoftarmanesh, A. H., & Dorostkar, V. (2011). Landfarming process effects on biochemical properties of petroleum-contaminated soils. Soil and sediment contamination, 20(2), 234-248.
- (14) Bohórquez, S. S. (1997). La reparación del daño. Aspectos técnicos: remediación y restauración. PEMEX Ambiente y Energía. Los retos del futuro México, UNAM Petróleos mexicanos.
- (15) Bordonado, I. G., & Huertas, J. A. (1982). Disposición de lodos aceitosos de refinerías de petróleo mediante "landfarming". Ingeniería química, (160), 65-72.
- (16) Boulding, R. (2003). Practical Handbook of Soil, Vadose Zone, and Ground-Water Contamination: Assessment, Prevention, and Remediation, 2nd ed. , CRC Press.
- (17) Cabranes, Y., Almazán, V., Martínez, C., Díaz, Y., Barbán, O., Oramas, J., ... & Borges, G. (2005). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.
- (18) Cabrera Jara, M. F. (2013). Estudio de dos tratamientos a escala piloto para la biodegradación de suelos contaminados por hidrocarburos por el método de landfarming (Doctoral dissertation, QUITO/EPN/2013).

- (19) Cando Rodríguez, M. Á. (2011). Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos (Doctoral dissertation).
- (20) Cardona, S., & Iturbe, R. (2003). Biodegradación de diesel mexicano por un consorcio de bacterias de un suelo agrícola. *Dyna*, 138, 13-26.
- (21) Castro, J. L. P., Rojas, M. C. P., & de Mesa, J. B. L. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Nova*, 2(2).
- (22) Conde, G. (2000). Técnicas y costes de recuperación de suelos. *INGENIERIA QUIMICA-MADRID-*, 32(369), 211-214.
- (23) Contreras, P., & Soledad, D. (2014). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.
- (24) Corona-Ramírez, L., & Iturbe-Argüelles, R. (2005). Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ing. Inv. y Tec*, 6(2).
- (25) Correa Araújo, V. R. (2005). Factores que controlan la biorremediación in situ de suelo y aguas subterráneas contaminadas por hidrocarburos.
- (26) Cortón, E., & Viale, A. (2006). Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación. *Revista Ecosistemas*, 15(3).
- (27) Cuadros, A. M. M. D., & Ambiental, M. (2005). Técnicas de Remediación Biológicas.
- (28) Cuartas, D. Ñ., Cuervo, D. P., & Vargas, J. C. (2014). Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia*, 37(1).
- (29) De la Rosa-Pérez, D. A., Teutli-León, M., Margarita, M., & Ramírez-Islas, M. E. (2007). Electrorremediación de suelos contaminados, una revisión técnica para su aplicación en campo. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 23(3), 129-138.

- (30) De mesa, J. B. L., Quintero, G., Vizcaíno, A. L. G., Cáceres, D. C. J., Riaño, S. M. G., & García, J. M. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5).
- (31) Del Carmen Rivera-Cruz, M., Cerrato, R. F., García, P. S., Volke-Haller, V., & Fernández-Linares, L. (2004). Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán. *Agrociencia*, 38(1), 1-12.
- (32) Delgado, K. T., & Montoya, T. Z. (2009). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Facultad de Mina. Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Trabajo de grado para optar el título de Ingeniería Química.
- (33) Di Paola, M. M., & Vicién, C. (2010). Biorremediación: vinculaciones entre investigación, desarrollo y legislación.
- (34) Dias, R. L. (2012). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en clima frío y templado (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas).
- (35) ElBagouri, I. H., Elnawawy, A. S., Abdal, M., Al-Daher, R., & Khalafawi, M. S. (1994). Mobility of oil and other sludge constituents during oily sludge treatment by landfarming. *Resources, conservation and recycling*, 11(1), 93-100.
- (36) Ercoli, E., Gálvez, J., Di Paola, M., Cantero, J., Videla, S., Medaura, M., & Bauzá, J. (2001). Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo. Laboratorio de Bioprocesos, reporte especial. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.
- (37) Eweis, J. (1999). Principios de biorrecuperación. Ed. McGrawHill.
- (38) Felsot, A. S., Mitchell, J. K., & Dzantor, E. K. (1995). Remediation of herbicide-contaminated soil by combinations of landfarming and biostimulation. *Bioremediation: Science and Applications*, (bioremediation), 237-257.
- (39) Fernández, S. L. (2013). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas (Doctoral dissertation, Universitat de Barcelona).

- (40) Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 179-187.
- (41) Ferrari, M. D. (1996). Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y su aplicación en la biorremediación de suelos y lodos contaminados. *Rev. argent. microbiol*, 28(2), 83-98.
- (42) Flores Campos, G., & Matos Chamorro, R. A. (2010). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos en la compañía minera Milpa SA.
- (43) Flores Puente, M. A., Torras Ortiz, S., & Tellez Gutierrez, R. (2004). Medidas de mitigación para uso de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos en infraestructura de transporte terrestre. *Publicación Técnica*, (257).
- (44) Gallo, A., Peñuela, G., Rodríguez, N. J. P., & Carvajal, S. (2013). Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diesel. *Producción+ Limpia*, 7(1).
- (45) Garbisu, C., Amézaga, I., & Alkorta, I. (2002). Biorremediación y ecología. *Revista Ecosistemas*, 11(3).
- (46) García, M., Infante, C., & López, L. (2012). Biodegradación de un crudo mediano en suelos de diferente textura con y sin agente estructurante. *Bioagro*, 24(2), 93-102.
- (47) García Fandiña, C. (2003). Experiencia de Repsol YPF en biorremediación de suelos. *Industria y Minería*, (351), 28-30.
- (48) Garzón, J. D., Vives-Florez, M. J., Sarria, V. M., Medina, O. F. S., Delgado, L. F., Barrios, A. F. G., & Sierra, S. H. (2010). Aproximaciones biológicas y fisicoquímicas en el tratamiento de contaminantes: un resumen del aporte de la Universidad de los Andes. *Revista de Ingeniería*, (30), 100-111.
- (49) Gomez, W., Gaviria, J., & Cardona, S. (2009). Assessment of the biostimulation against bioaugmentation and natural attenuation on contaminated soil with diesel-gasoline mixing. *Dyna*, 76(160), 83-93.

- (50) Gómez Rivera, M. E. (2015). Estudio comparativo de la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP's) por medio de la atenuación natural, la bioestimulación y la bioaumentación en un suelo contaminado.
- (51) Gómez-Santos, A., Juárez, V. M., & Gutiérrez-Rojas, M. Biorremediación por biopilas de suelo contaminado con diesel en rosarito”.
- (52) González, H. H. R., Bustillos, L. G. T., Fernández, I. M., Cortes, J. D. J. B., & Moroyoqui, P. G. (2010). Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química Viva*, 9(3), 120-145.
- (53) González-Rojas, E. H. (2011). Concepto y estrategias de biorremediación. *INGE@ UAN-Tendencias en la Ingeniería*, 1(2).
- (54) Grijalva, J., López, J., Páez, J., & Medrano, H. Influencia de la fuente de nitrógeno y surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados.
- (55) Hernández-Acosta, E., del Carmen Gutiérrez-Castorena, M., Rubiños-Panta, J. E., & Alvarado-López, J. (2006). Caracterización del suelo y plantas de un sitio contaminado con hidrocarburos. *Terra Latinoamericana*, 24(4), 463-470.
- (56) Infante, C., Ortega, C., García, F. M., Ehrmann, U., Valencia, I. H., & Pérez, R. (2010). Efecto del potasio en la biorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano. *Bioagro*, 22(2), 145-152.
- (57) Iustman, L. J. R., & López, N. I. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Revista QuímicaViva*, 8(3).
- (58) Jara, M. F. C., & Montenegro, L. (2014). Estudio De Dos Tratamientos A Escala Piloto Para La Biodegradación De Suelos Contaminados Por Hidrocarburos Por El Método De Landfarming. *Revista Politécnica*, 34(1).
- (59) Katsivela, E., Moore, E. R., Maroukli, D., Strömpl, C., Pieper, D., & Kalogerakis, N. (2005). Bacterial community dynamics during in-situ bioremediation of petroleum waste sludge in landfarming sites. *Biodegradation*, 16(2), 169-180.
- (60) Levin, M. & Gealt, M.A. (1997). Biotratamiento de Residuos Tóxicos y Peligrosos. Mc Graw Hill.

- (61) López, N. A., & Lozada, J. R. (2011). Uso de la biorremediación para el saneamiento de sustratos contaminados por petróleo en el oriente de Venezuela. *Ecodiseño y Sostenibilidad*, 3(3), 227-236.
- (62) Lozano, N. P. (2005). Biorremediación de ambientes contaminados con petróleo. *Tecnogestión*, 2(1).
- (63) Maila, M. P., & Cloete, T. E. (2004). Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages?. *Reviews in Environmental science and bio/Technology*, 3(4), 349-360.
- (64) Marin, J. A., Hernandez, T., & Garcia, C. (2005). Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. *Environmental research*, 98(2), 185-195.
- (65) Maroto Arroyo, M. E., & Rogel-Quesada, J. M. (2001). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *Investigación, gestión y recuperación de acuíferos contaminados* (Ballester Rodríguez A., Grima Olmedo J., López Geta JA, y Rodríguez Hernández L. Eds). Alicante, España, 298-305.
- (66) Martín, A. R., Arguelles, R. I., & Universitaria, C. Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas.
- (67) Martínez-Prado, A., Pérez-López, M., Pinto-Espinoza, J., Gurrola-Nevárez, B. A., & Osorio-Rodríguez, A. L. (2011). Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 27(3), 241-252.
- (68) Melo, I. C. S., & Gallo, S. A. C. Evaluación de biocombustibles e hidrocarburos del petróleo (gasolina y diesel) en un suelo: proceso de transporte y biorremediación.
- (69) Miñana, M., Diaz Bautista, M. A., Ortiz Menéndez, J. E., Pérez-Hidalgo, T., & José, T. (2008). Análisis y distribución de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH's) en suelos y aguas de escombreras en Puertollano (Ciudad Real). *Geogaceta*, 44, 143-146.

- (70) Montilla, M., Herrera, L., Araujo, I., Morillo, G., Cárdenas, C., & Angulo, N. (2006). Lodos estabilizados y cepas bacterianas en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 31(4), 268-275.
- (71) Morais, E. B. D., & Tauk-Tornisielo, S. M. (2009). Biodegradation of oil refinery residues using mixed-culture of microorganisms isolated from a landfarming. *Brazilian archives of Biology and technology*, 52(6), 1571-1578.
- (72) Moreno, C. M., Becerra, A. G., & Santos, M. J. B. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev Iberoam Micol*, 21(1), 103-120.
- (73) Moromisato Rivas, L., Núñez del Prado Zárate, M. C., Panta Corzo, E. M., & Rico Leaque, L. G. (2008). Evaluación de técnicas de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados de petróleo (No. T01 M82-T). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Perú). Ciclo Optativo de Profesionalización en Gestión de Calidad y Auditoría Ambiental.
- (74) Nápoles, J., Abalos, A., Marañón, A., Aguilera, I., & Cumbá, F. (2005). Caracterización de suelos de la refinería " Hermanos Díaz" impactados con hidrocarburos. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 36.
- (75) Ñustez Cuartas, D. C. (2012). Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible.
- (76) Ortega, J. J. (2014). Biorremediación y biodisponibilidad:¿ Dónde están los límites?. *Biosaia: Revista de los másteres de Biotecnología Sanitaria y Biotecnología Ambiental, Industrial y Alimentaria*, 1(3).
- (77) Ortiz, E., Nuñez, R., Fonseca, E., Oramas, J., Almazán, V., Cabranes, Borges, G. (2005). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Contribución a la educación y protección del medio ambiente*, 6, 51-60.

- (78) Oudot, J., Ambles, A., Bourgeois, S., Gatellier, C., & Sebyera, N. (1989). Hydrocarbon infiltration and biodegradation in a landfarming experiment. *Environmental Pollution*, 59(1), 17-40.
- (79) Pabon, C. Y. (2010). Comparacion de bioestimulantes empleados en el tratamiento de bioremediacion de residuos aceitosos, mediante la modalidad de Landfarming.
- (80) Partida, A. H., Trejo-Hernández, M., Loera, O., & Ramírez-Saad, H. Dinámica de poblaciones bacterianas de suelos contaminados con hidrocarburos en biopilas de remediacion.
- (81) Pérez Casimiro, G., Iturbe Argüelles, R., & Flores Serrano, R. M. (2005). Cambio en las propiedades físicas de un suelo contaminado con hidrocarburos debido a la aplicación de una tecnología de remediación. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: investigación, desarrollo y práctica*, 1(1).
- (82) Petro Cardona, P. H., & Mercado Montero, G. D. C. (2015). Biorremediación de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos derivados del petróleo en Colombia.
- (83) Plaza, G., Otero, M., Torres, N., Velásquez, M., Corbalan, E., & Rodríguez, T. (2001). Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*, 5, 163-167.
- (84) Pozzo Ardizzi, M. G., Ferrari, M., Calderón, G., & Argentina, A. I. D. I. S. (2000). Diseño y ejecución de un plan de biotratamiento para residuos (cortes) de perforación de la actividad petrolera, por la metodología de biodegradación con bioaumentación. In *Es tiempo de convertir nuestras acciones en proyectos* (p. 21). AIDIS.
- (85) Proaño Herrera, C. M., & Rivas Aybar, D. M. (2010). Rehabilitación de suelos contaminados por derrame de hidrocarburos mediante biorremediación.
- (86) Pucci, G. N., & Pucci, O. H. (2003). Biodegradabilidad de componentes de mezclas naturales de hidrocarburos previamente sometidas a landfarming. *Rev. argent. microbiol*, 35(2), 62-68.

- (87) Quintero, P., & Silvia, L. (2015). Evaluación teórica de la remoción y tiempo de acción de tres técnicas de biorremediación, para tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos.
- (88) Ramírez, O. M. A., Rivera, A. P. R., Marin, L. A., Rojano, B. A., Ruiz, O., & Gallo, S. A. C. Biorremediación de un suelo con diesel.
- (89) Rodríguez, N. J. P., Acevedo, S. C., Gallo, A., & Mesa, G. P. (2012). Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diesel. *Producción+ Limpia*, 7(1), 101-108.
- (90) Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.
- (91) Reddi, L. & Inyang, H.I. (2000). *Geoenvironmental Engineering: Principles and Applications*. CRC.
- (92) Riser-Roberts E. (1998) *Remediation of petroleum contaminated sites*. CRC Press.
- (93) Rodríguez, D. T. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Revista Ecosistemas*, 12(2).
- (94) Rodríguez, N. J. P., Acevedo, S. C., Gallo, A., & Mesa, G. P. (2012). Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diesel. *Producción+ Limpia*, 7(1), 101-108.
- (95) Rodríguez Gallego, J. L. (2004). Tratamiento de residuos de refinería mediante técnicas de biorremediación.
- (96) Romero, A. R. I. (2014). Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo: análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales (Doctoral dissertation, Universitat de Barcelona).
- (97) Saval, S. (1997). Biorremediación de un suelo contaminado con diesel. *Ingeniería y ciencias ambientales*, 3, 24-30.

- (98) Saval, S., & Lesser, J. (2000). Una Experiencia de Caracterización y Remediación de un Suelo Arcilloso Contaminado con Hidrocarburos. In Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. Morelia, México., Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales.
- (99) Sabater, J., Viñas, M., Vázquez, A., Solanas, A. M., Gandarillas, C., Vázquez, V., & Grifoll, M. (2001). Ensayos de tratabilidad en la recuperación de suelos contaminados por la tecnología de la biorremediación. Residuos: Revista técnica, 11(59), 78-82.
- (100) Samanez Gibaja, E. (2008). Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo.
- (101) Sánchez, J. & Gallego, J.R. (2005). Biorremediación: conceptos esenciales y ámbitos de aplicación en "Biotecnología y Medioambiente". I. Marín, J.L. Sanz, R. Amils (Eds), Ephemera, Madrid pp. 61-75.
- (102) Sánchez Martín, J., & Rodríguez Gallego, J. L. (2003). Biorremediación. Fundamentos y aspectos microbiológicos. Industria y minería, (351), 12-16.
- (103) Sara, M.N. (2003). Site Assessment and Remediation Handbook, 2nd ed, CRC Press.
- (104) Saval, S. (1997). Biorremediación de un suelo contaminado con diesel por estimulación de la microflora autóctona. In Congreso nacional de ingeniería sanitaria y ciencias ambientales: memorias técnicas (pp. 292-297). FEMISCA.
- (105) Schmidt, W. (2002). Suelos Contaminados con Hidrocarburos: La Biorremediación como una Solución Ecológicamente Compatible. Corporación técnica alemana.
- (106) Schroeder, R. H. A., Rodríguez, V. I. D., & Hernández, L. G. (1999). Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. Terra, 17(2), 159-174.
- (107) SHARMA H.D. & REDDY K.R. (2004). Geoenvironmental Engineering: Site Remediation, Waste Containment, and Emerging Waste Management Technologies. John Wiley & Sons.

- (108) Sims, R. C., & Sims, J. L. (1999). Landfarming of petroleum contaminated soils. *Bioremediation of contaminated soils, (bioremediationo)*, 767-781.
- (109) Solanas, A. M. (2009). La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona.
- (110) Speight, J.G. (2001). *Handbook of petroleum analysis*. John Wiley & Sons.
- (111) Straube, W. L., Nestler, C. C., Hansen, L. D., Ringleberg, D., Pritchard, P. H., & Jones- Meehan, J. (2003). Remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulation and bioaugmentation. *Acta Biotechnologica*, 23(2- 3), 179-196.
- (112) Suarez Suarez, R. J. (2014). Análisis de riesgo laborales: Planta de tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos de EP PetroEcuador- Refinería la Libertad área Landfarming.
- (113) Terán, J. J. (2004). Biorremediación de un suelo limo-arenoso contaminado de crudo utilizando un coctel enzimático comercial (Doctoral dissertation, Universidad Internacional SEK).
- (114) Tipán, M., & Patricio, E. (2014). Artículo Científico-Evaluación de la eficiencia de un inóculo enzimático como acelerador del proceso landfarm en biorremediación de suelos contaminados con diésel y bunker a escala piloto. Parroquia el Reventador provincia de Sucumbios.
- (115) Toro, M. A. T., & Quirama, J. F. R. (2012). Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia/Bioremediation in soil contaminated with hydrocarbons in Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 3(2), 37.
- (116) Trejo, J. A. V. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. Instituto Nacional de Ecología.
- (117) Turzunzade, R. T., & Iglesias, C. documentación de referencia sobre biorremediación.
- (118) USEPA (1994). Chapter V. Lanfarming. EPA 510-B-94-003

- (119)USEPA (1995-2004). How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers.
- (120)USEPA (2006). Test-methods for evaluating solid wastes physical/chemical methods.
- (121)Vallejo, V., Salgado, L., & Roldan, F. (2007). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. Revista Colombiana de Biotecnología, 7(2), 67-78.
- (122)Viñas Canals, M. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Universitat de Barcelona.
- (123)Windevoxhel, R., Sánchez, N., Suberoa, N., Bastardob, H., & Malaverb, N. (2009). Grupos funcionales de bacterias con potencial para Biodegradación de Hidrocarburos. Revista INGENIERÍA UC, 16(1), 51-53.

ANEXO FOTOGRAFICO

Parcela original de la que procedía el suelo tratado en Málaga.

Aspecto superficial del suelo contaminado *in situ* (izquierda). Suelo una vez excavado y transportado a Los Barrios (derecha).

Zona destinada para el landfarming y preparación de los trabajos. Abajo se observa ya lámina de PEAD en los bordes, rotulación de parcelas para la disposición del suelo y acopios a la izquierda.

Distintas secuencias de la preparación de las parcelas.

Aplicación manual de FLL (izquierda), y de productos líquidos S- 200 y surfactante (derecha).

Procedimientos de riego y volteo.