

# La biorremediación, frente al vertido del "Prestige"

Por José L. R. Gallego  
(Área de Prospección e  
Investigación Minera,  
Universidad de Oviedo)

Jesús Sánchez y Ana I. Peláez  
(Área de Microbiología,  
Universidad de Oviedo)

María Jesús García  
(Departamento de Ingeniería  
Química, ETSIM, Universidad  
Politécnica de Madrid)

José E. Ortiz, Trinidad Torres y  
Juan F. Llamas (Departamento  
de Ingeniería Geológica,  
ETSIM, Universidad  
Politécnica de Madrid)

El accidente del Prestige y la posterior secuencia de acontecimientos de todos conocida ha desembocado en una larga y compleja operación de remediación en las costas afectadas. En muchas zonas se ha alcanzado ya el límite de la efectividad de los métodos físicos de limpieza, por lo que se presenta una oportunidad muy importante para otras técnicas que pueden permitir la reducción de la contaminación residual aún presente en playas de arena, zonas rocosas y acantilados. Entre las posibilidades más sugestivas se encuentra la biorremediación, basada en la capacidad de muchos microorganismos para degradar los componentes de los productos petrolíferos. Sobre sus ventajas, limitaciones, y su aplicación en el caso del "Exxon Valdez" trataremos en este artículo. Además, en la parte

final se presentará un proyecto que están afrontando los autores del trabajo en tres emplazamientos de la costa de la Muerte.

## Biorremediación: fundamentos y aplicaciones

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (fundamentalmente bacterias, pero también hongos y levaduras) para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples poco o nada contaminantes. Los mayores rendimientos de la biorremediación se han obtenido siempre en casos de contaminación por hidrocarburos, pero ello no es óbice para que otros contaminantes sean susceptibles de tratamiento (hidrocarburos clorados tales

como PCBs, TCE, PCE, pesticidas, herbicidas; compuestos nitroaromáticos como el TNT, etc...)

Las principales ventajas de la biorremediación son las siguientes:

- Amplio ámbito de aplicabilidad (sólidos, líquidos e incluso gases).
- Es una tecnología poco agresiva con el medio y generalmente no requiere componentes estructurales o mecánicos dignos de destacar.
- Comparativamente es muy económica y, al tratarse de un proceso natural, suele tener aceptación por parte de la opinión pública. Por el contrario se ha criticado habitualmente la lentitud los procesos de degradación biológica.

Como ya se ha explicado, el fundamento último de la biorremedia-

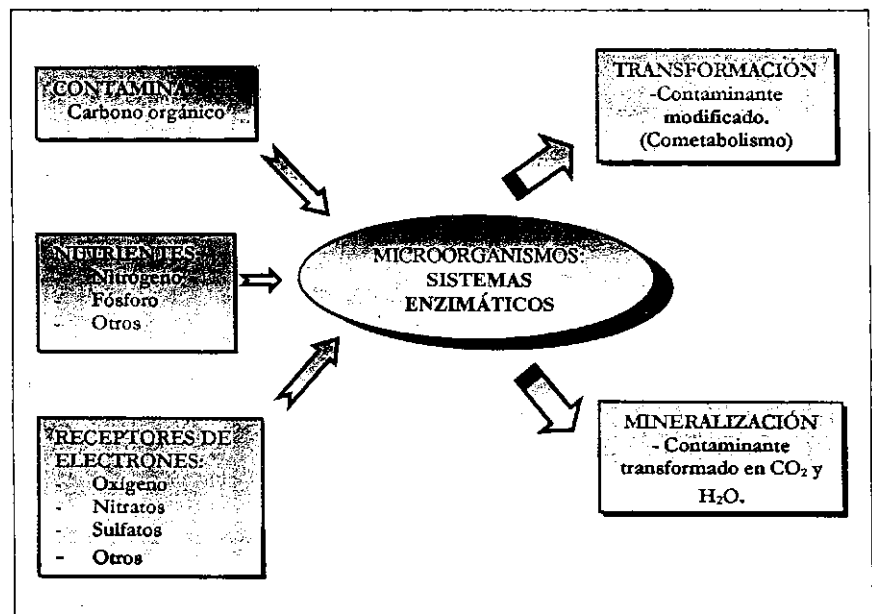


Figura 1. Actividades microbianas en el proceso de biorremediación

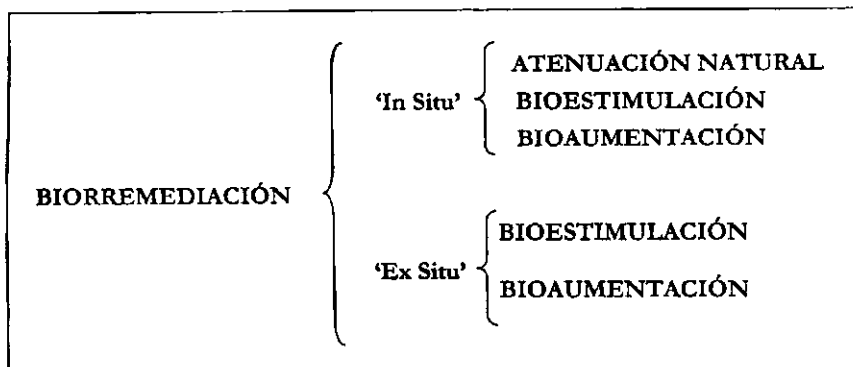


Figura 2. Aproximaciones a la biorremediación

ción reside en las capacidades enzimáticas de los microorganismos del subsuelo (figura 1). Entre los factores que pueden limitar o impedir la biodegradación los más habituales son la carencia de nutrientes esenciales para los microorganismos, la ausencia de receptores de electrones adecuados (oxígeno, nitratos u otros) o de buenas condiciones medioambientales (pH, potencial redox, humedad) y, finalmente, la ausencia de poblaciones microbianas necesarias para degradar los contaminantes. Obviamente, si aportamos al medio alguno de los elementos de los que carece o bien potenciamos los existentes, favoreceremos la eliminación del posible contaminante ("engineered bioremediation strategies").

De esta forma, a partir de las limitaciones de la atenuación natural de los contaminantes, surgen las dos aproximaciones biotecnológicas básicas: (i) introducción de modificaciones en el medio mediante el aporte de nutrientes, aireación y otros procesos (bioestimulación) y (ii) la adición de microorganismos (bioaumentación). La implementación de estos procedimientos se puede realizar en tratamientos 'in situ' o bien "ex situ" (figura 2).

En España se ha comenzado a aplicar estas técnicas con un considerable retraso con respecto a otros países desarrollados. No obstante,

tienen experiencia (más o menos amplia) de la aplicación de la biorremediación algunas empresas especializadas en contaminación de suelos y aspectos relacionados, así como compañías del ámbito petroquímico. El emplazamiento 'tipo' en el que las técnicas empleadas se han mostrado competitivas responde a un terreno contaminado por un vertido de hidrocarburos de medio peso molecular (gasoil y en ocasiones gasolina o incluso fuel-oil):

- Vertidos producidos por la rotura de oleoductos.
- Suelos contaminados en instalaciones petroquímicas tratados generalmente en biopilas o mediante "landfarming".
- Vertidos procedentes de los tanques de gasolineras (se suele aplicar la técnica conocido como "bioventing").
- Zonas contaminadas por la actividad de antiguas instalaciones industriales ("brownfields").

En cuanto a la problemática causada en las costas por las mareas negras no existe experiencia alguna en nuestro ámbito en lo que se refiere a la biorremediación (sí desgraciadamente en cuanto a accidentes, tabla 1), por lo que hay que remontarse a la limpieza del vertido del "Exxon Valdez" en Alaska para tener datos fiables.

## La experiencia del "Exxon Valdez"

La idea de que la biodegradación del petróleo vertido en un accidente se podía mejorar con la adición de nitrógeno y fósforo inorgánico se propuso por primera vez hace casi treinta años. Por entonces el conocimiento se reducía a experimentos de laboratorio o a pequeñas demostraciones en el campo. Sin embargo, otro famoso accidente, el del "Amoco Cádiz" en 1978, supuso un nuevo impulso a la investigación. A finales de los ochenta la comunidad científica ya tenía la certeza de que si no la mejor, si era una buena manera de enfrentarse a los efectos de los vertidos de petróleo. El último y decisivo impulso vendría después.

El 24 de marzo de 1989 el "Exxon Valdez" se incrustó en los arrecifes de Blight cubriéndose la bahía de Prince William en Alaska con aproximadamente 35.000 toneladas de crudo. Pasados unos meses del accidente los procesos de limpieza físico-química (figura 3) alcanzaron su límite de efectividad y se planteó la utilización de la biorremediación. En ella el protagonismo principal lo tuvo el uso de un fertilizante oleofílico (Inipol EAP22) que estimuló adecuadamente la degradación de los hidrocarburos. Las playas de la zona eran claramente deficitarias en nitrógeno y fósforo por lo que la biodegradación propiciada por los microorganismos autóctonos convenientemente estimulados con el fertilizante fue efectiva como se demostró con la utilización de biomarcadores (figura 4) para el cálculo de los índices de degradación biológica. Así, estimaciones de la National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) sobre la distribución del crudo vertido en 1992, más de tres años después del accidente, cifraron en un 50 por 100 del total vertido el porcentaje eliminado por biodegradación y fotode-

gradación, frente a valores que no superan el 25 por 100 para la volatilización y la retirada por medios físicos. El éxito en términos económicos también resultó importante, habiéndose señalado que el coste de la biorremediación de 120 kilómetros de costa resultó menor que el de un sólo día de lavado físico.

## Proyecto desarrollado para tres playas de la costa de la Muerte

En el transcurso de los últimos cinco años un grupo de investigadores de las Escuelas de Minas de Oviedo y Madrid y del área de Microbiología de la Universidad de Oviedo han abierto una línea de investigación sobre técnicas de biorremediación de hidrocarburos aplicadas a la remediación de vertidos en el subsuelo de gasoil y residuos pesados del petróleo. Gracias a la experiencia acumulada, en este año 2003 el Consejo Superior de Colegios de Ingenieros de Minas financió un proyecto de aplicación de las técnicas de biorremediación en las

**Tabla 1. Algunas de las principales "mareas negras" producidas por accidentes de petroleros en las últimas décadas**

AÑO	PETROLERO	LUGAR	VERTIDO (TON)
1967	T. CANYON	CANAL DE LA MANCHA	120.000
1970	POLYCOMANDER	VIGO	116.000
1974	METULA	ESTRECHO DE MAGALLANES	50.000
1976	URQUIOLA	GALICIA	20.000
1978	AMOCO CÁDIZ	BRETAÑA	85.000
1989	EXXON VALDEZ	ALASKA	35.000
1992	MAR EGO	GALICIA	80.000
1999	ERIKA	BRETAÑA	20.000

playas afectadas por el vertido del "Prestige" contándose con la colaboración de las Administraciones competentes. En el proyecto se intenta, mediante ensayos "in situ" a escala piloto, seleccionar y optimizar las técnicas de biorremediación que aceleren la degradación natural de los hidrocarburos que permanecen en las costas después del final de las labores de limpieza física. La metodología seguida se basa en la experiencia acumulada tras el vertido del "Exxon Valdez" en Alaska

y en los últimos avances científicos en este terreno. El objetivo general del proyecto es la evaluación, selección y aplicación de las técnicas de biorremediación más adecuadas para la degradación de los hidrocarburos que, después de la finalización de las labores de limpieza física, permanecen en las playas afectadas por el fuel objeto del proyecto (figura 5).

### Consideraciones de partida

Como criterio general se considera que el proceso puede llevarse a cabo (con diferencias según se trabaje sobre roca o sobre arena) con la combinación de un producto surfactante que permita el acceso microbiano a los hidrocarburos y un fertilizante que aumente la presencia de Nitrógeno y Fósforo disponible. Este enfoque puede permitir que se reduzca la concentración de hidrocarburos y evitar la acumulación definitiva de los no degradados en el sedimento marino. Pese a ser este el procedimiento general más recomendado, hay más posibilidades que deben estudiarse (por ejemplo en el caso del "Exxon Valdez" se utilizó el Inipol por ser el único producto comercialmente disponible en las cantidades necesarias).

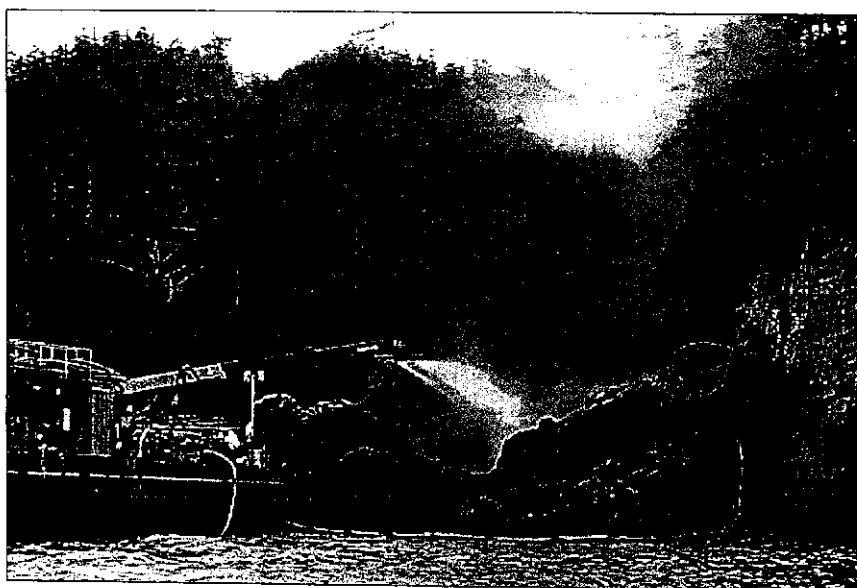


Figura 3. Limpieza mediante chorros a presión en las costas de Alaska (cortesía de "Exxon Valdez Oil Spill Trustee Council")

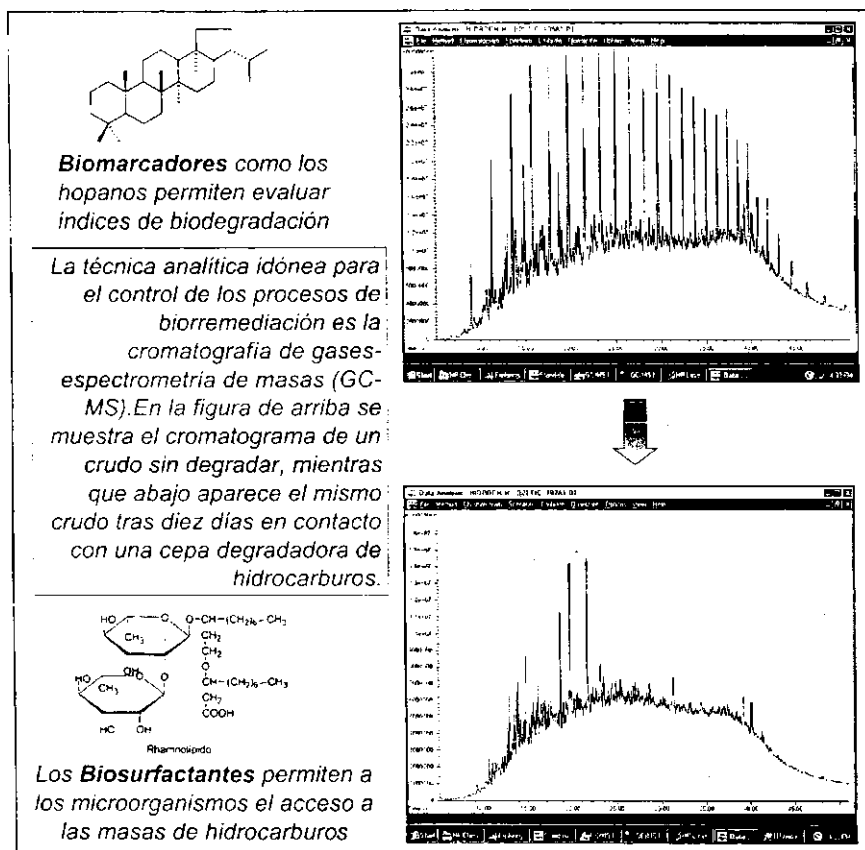


Figura 4. Métodos analíticos y moléculas de importancia en la evaluación de los efectos de la biodegradación

La influencia de la temperatura va a ser obvia en cuanto a que en los meses más cálidos la acción microbiana se reforzará aunque puedan aparecer escenarios adicionales si los restos de fuel se licuan con las altas temperaturas. Otro aspecto fundamental es la dinámica marina; ésta lleva meses ayudando a retirar residuos de la costa, colabora en la oxidación del fuel, etc... aunque por otro lado, fuertes mareas pueden impedir la aplicación de productos o evitar que se fijen los microorganismos si se efectúa algún tipo de bioaumentación.

En su breve historia, la biorremediación ha tenido éxitos y fracasos en playas de arena y en zonas rocosas. En cuanto a playas de piedra o acantilados el problema

operacional es grande ya que no se tienen las facilidades de muestreo, analítica, etc. que hay en una arena. La aproximación requiere fuentes oleofílicas de nutrientes y biosurfactantes, siendo conscientes de que la monitorización va a ser en gran parte visual, además de la utilización de biomarcadores (compuestos del petróleo útiles para la medida de la biodegradación). En las zonas arenosas aparentemente todo es más fácil ya que se puede plantear una metodología in situ o incluso ex situ en función de las mareas, el medio es más o menos homogéneo, es fácil parcelar, etc...

En lo que se refiere a los plazos es imposible predecir la efectividad que van a tener los tratamientos así como su duración.

Cabe recordar que en las costas afectadas por el vertido del "Exxon Valdez" la biorremediación ocupó tres o cuatro períodos de varios meses (el problema eran allí las bajas temperaturas) por lo que no se cerró el tratamiento hasta más de tres años después del vertido; es más, el informe final sobre el conjunto de las labores de limpieza no se publicó hasta 1997 (ocho años después del vertido). Pese a todo ello se piensa que sea posible obtener resultados preliminares a principios del verano.

### Protocolo general

Se seguirán los siguientes pasos (algunos de ellos ya en marcha):

a) Determinaciones 'in situ' y muestreo

Para la determinación de parámetros ambientales sobre el terreno se cuenta con los siguientes equipos:

- Terminales y electrodos de todo tipo para la medida de pH, Eh, conductividad, salinidad, oxígeno disuelto y temperatura.
- Métodos indirectos de tipo geoquímico para medir la presencia de hidrocarburos (TCD semiconductores, cromatógrafo portátil, FID, PID, Petroflag).
- Espectrofotómetros de campo para la determinación de contenido en nutrientes y de metales. Cuando se considere necesario se realizará una caracterización de la fracción inorgánica de las muestras, para lo que se utilizará analítica tipo plasma (ICP). Absorción Atómica y Rayos X.
- Lámparas UV para el cartografiado de las zonas contaminadas.
- Los muestreos que se realicen se efectuarán con sondas manuales

tipo Auger o semimecánicas. Los procedimientos seguirán mallados regulares en la medida de lo posible para facilitar el tratamiento geoestadístico de los resultados.

- Las muestras de sustratos contaminados (arena, roca, fuel puro, suelo, agua etc.) con destino al aislamiento de microorganismos especializados se tomarán en condiciones estériles, asegurando su representatividad.

- Las bacterias procedentes de la colección del grupo que lleva adelante el proyecto se utilizarán como referencia en experimentos de laboratorio frente a la actividad de los aislados en las zonas de trabajo.

- Los experimentos que se realicen en las diferentes parcelas acotadas para ello contarán con un diseño estadístico previo y con control del mismo tipo. También se tratará de conseguir que los posibles efectos positivos sean visibles y comparables con zonas de control no tratadas.

Una vez obtenidos todos los datos del muestreo se dividirán en varias parcelas las zonas seleccionadas. En ellas se procederá a la realización de, al menos, los siguientes experimentos de biorremediación:

- Bioestimulación mediante fertilizantes. La selección de estos es un punto clave de todo el trabajo). Probablemente más importante que su composición química puede ser su "físico" y su relación con las mareas. En estos momentos ya se han iniciado contactos con los suministradores para conseguir cantidades pequeñas con las que realizar los ensayos. Las posibilidades son muy diversas: Briquetas, gránulos ('Customblen'), 'Inipol' (fertilizante oleofílico líquido), surfactantes de origen químico biodegradables, sales minerales y otros productos.

- En cuanto a la bioaumentación, la experiencia existente y la prudencia necesaria no recomiendan la utilización de productos con "bacterias comerciales" por lo que en principio se descarta. La única posibilidad que se contempla es la utilización de bacterias autóctonas mediante un consorcio preparado con parte de las aisladas en la primera fase del trabajo.

- Experimentos de control.

La monitorización que se realice con posterioridad al inicio de los ensayos abarcará los siguientes parámetros (se busca en todo momento un control mixto químico y microbiológico).

- La medida de hidrocarburos totales se realizará por medio de Espectrometría Infrarroja (TPH-IR) y el cálculo de índices de biodegradación mediante Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas (GC-MS) con respecto a biomarcadores como Pristano y Fitano en una primera aproximación y Hopanos en una segunda más fina. Esta

última técnica también permitirá determinar el fraccionamiento actual del fuel y el estudio de la evolución de cada una de las fracciones (alifáticos, aromáticos, resinas y asfaltenos).

- La cinética de los procesos degradativos y la evaluación de la posible producción de biosurfactantes (figura 6) se efectuará con métodos desarrollados en el laboratorio de microbiología de los participantes en el proyecto.

- La identificación de los microorganismos se efectuará mediante técnicas moleculares, que consisten esencialmente en la amplificación del gen del ARN ribosomal 16S utilizando oligonucleótidos conservados de eubacterias como iniciadores en reacciones de amplificación en un equipo de PCR

## Bibliografía

Alexander, M. «Biodegradation and Bioremediation». 2nd ed. Academic Press, London (1999).



Figura 5. Aspecto de una de las zonas en las que se pretende aplicar la biorremediación

Atlas RM & R. Unterman. Bioremediation. In: Demain AL & Davies JE (Eds) «Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology 2nd ed» (pp 666-681). ASM Press, Washington D.C. (1999).

Bragg, J.R.; R.C. Prince; E.J. Harner & R.M. Atlas. «Effectiveness of bioremediation for the "Exxon Valdez" oil spill». *Nature* 368: 413-418 (1994).

Gallego, J.R.; J. Loredó; J.F. Llamas & J. Sánchez. «Sources of hydrocarbon-degrading microorganisms: isolation, characterization and applications». *Proceedings of the First European Bioremediation Conference, Chania- Greece*, pp. 324-327 (2001a).

Gallego, J.R.; J. Loredó; J.F. Llamas; F. Vázquez & J. Sánchez. «Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ

techniques by study of bacterial degradation». *Biodegradation* 12, 325-335 (2001b).

Head, I.M. & R.P. Swannell. «Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats». *Curr. Op. Biotechnol.* 10: 234-239 (1999).

Prince, R.C. «Bioremediation of marine oil spills». *Tibtech* 15:158-160 (1997).

Pritchard P. H. & C.F. Costa. EPA's «Alaska oil spill bioremediation project». *Environmental Science and Technology*, 25, 3, 372-379 (1991).

Pritchard P.H. «Cuestiones regulatorias y de eficacia en la biorrecuperación de los derrames de petróleo: experiencias con el derrame del "Exxon Valdez" en Alaska». En: Levin M.; M.A. Ge-

alt -editores- «Biotratamiento de residuos sólidos y peligrosos». Cap. 12, pp 273-311. McGraw Hill. Madrid (1997).

Riser-Roberts, E. «Remediation of petroleum contaminated soils». CRC Press. Lewis publishers. (1998)

Röling, W.F; M.G. Milner; D. M. Jones; K. Lee; F. Daniel; R.P.Swannell & I.M. Head. «Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation». *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 68 (11), pp 5537-5548, (2002).

Ron, E.Z. & E. Rosenberg. «Natural roles of biosurfactants». *Environmental Microbiology* 3(4), 229-236 (2001).

Rosenberg E & E.Z. Ron. Bioremediation of petroleum contamination. In: Crawford RL & Crawford DL (Eds) «Bioremediation. Principles and Applications» (pp 100-124). *Biotechnology Research Series 6*. University Press, Cambridge (1996).

Swannell, R.P.; K. Lee & M. McDonagh. «Field evaluations of marine oil spill bioremediation». *Microbiological Reviews* vol. 60 (2), pp 342-365 (1996).

Timmis, K.N & D.H. Pieper. «Bacteria designed for bioremediation». *Trends in Biotechnology* 17, 201-204 (1999).

Walter, M.V. Bioaugmentation. In: Hurst CJ (Ed) «Manual of Environmental Microbiology» (pp 753-765). ASM Press, Washington, D.C. (1997).

Zhu, X.; A.D. Venosa; M.T. Suidan, & K. Lee. «Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands». U.S EPA. Cincinnati (2001). ■

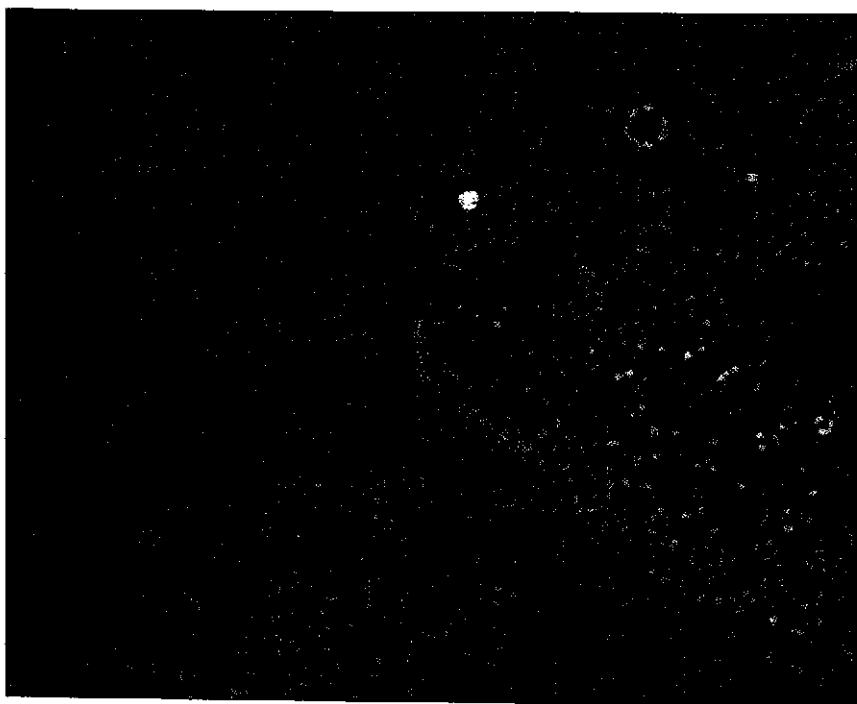


Figura 6. Dos cepas bacterianas degradando masas de hidrocarburos. La primera de ellas —en color blanco brillante— penetra en la masa de hidrocarburos (derecha de la imagen) por su actividad biosurfactante. La segunda —negra redondeada— se concentra en las masas ya puestas en "disolución" acuosa (Fotografía 1000x)