



Biotecnologia per a la recuperació sostenible de sòls contaminats

Margalida Tauler, Joaquim Vila i Magdalena Grifoll

Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

BIOTECHNOLOGY FOR A SUSTAINABLE REMEDIATION OF POLLUTED SOILS. – Soil is a living and life-giving non-renewable natural resource. Pollution associated with human activity is one of the main agents of soil degradation. Hydrocarbons are the most abundant group of soil pollutants, including the toxic and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Bioremediation, which utilizes the natural biodegradative capacities of soil microorganisms, is a sustainable technology with the potential to restore the natural functions of soil. Though its use in Europe has increased dramatically during the last decade, uncertainty regarding final end-point concentrations continues to hamper its widespread application. Laboratory biotreatability studies are a useful tool for designing and evaluating the potential of bioremediation strategies in the clean-up of specific sites. However, optimization of this biotechnology and the development of new diagnostic and monitoring tools require a comprehensive understanding of the metabolic microbial networks involved in pollutants removal. Metabolic studies with single bacterial cultures have proven essential for hypothesizing how microbial communities cooperate in the synergistic degradation of organic contaminants, with key populations initiating attacks to produce partially oxidized compounds that are then more efficiently mineralized by secondary degraders. Advances in molecular tools are not only facilitating more comprehensive analysis of culturable and non-culturable microbial populations, but also finer distinctions between active and non-active microorganisms, and quantification of the expression of key enzymatic functions. These innovations will help confirm and illuminate the actual role of previously hypothesized networks, revealing new microbial functions for exploitation.

El sòl, un recurs no renovable

Funcions ecològiques del sòl

El sòl, definit com la capa superior de l'escorça terrestre, és un sistema molt dinàmic que juga un paper clau en la supervivència de la humanitat i dels ecosistemes. El sòl proporciona un ambient físic i cultural per a l'activitat humana, i produeix, a més, biomassa i matèries primeres (més del 90% d'aliments, fibra i combustibles) per al nostre consum. Des d'un punt de vista ecològic, fa funcions importants de filtració i transformació de nutrients, d'una gran varietat de productes químics i d'aigua i alberga una part important de la biodiversitat. A més, ara sabem que actua com embornal de carboni, i captura al voltant del 20% de les emissions de diòxid de carboni produïdes per l'home (European Commission, 2007), juga, per tant, un paper clau en la desacceleració potencial del canvi climàtic. Malgrat això, el sòl està sobre-exploitat i es degrada de manera irreversible com a resultat de les activitats de la majoria de sectors econòmics. A causa de la lentitud dels processos

de formació i regeneració del sòl, aquest es considera com un recurs no renovable. Tot i que es pugui degradar molt ràpidament, un mer centímetre de sòl tarda segles en formar-se. La contaminació és una de les causes més importants de degradació del sòl. Només a Europa s'han identificat més de 340.000 emplaçaments amb sòl contaminat que cal recuperar, però s'estima que la xifra real pot superar els 2,5 milions. Un 11% d'aquests emplaçaments presenten com a contaminants principals els hidrocarburs aromàtics policíclics (HAPs) (Liedekerke *et al.* 2014).

Contaminació del sòl

Quan parlem de contaminació hem de distingir entre la contaminació difosa i la contaminació per fonts puntuals. La primera consisteix en l'alliberament de contaminants per una gran varietat d'activitats que individualment no tindrien un efecte en el medi ambient. Per tant, és diversa, amb concentracions dels contaminants individuals baixes i que afecta a superfícies extenses. Per exemple, la contaminació que trobem en

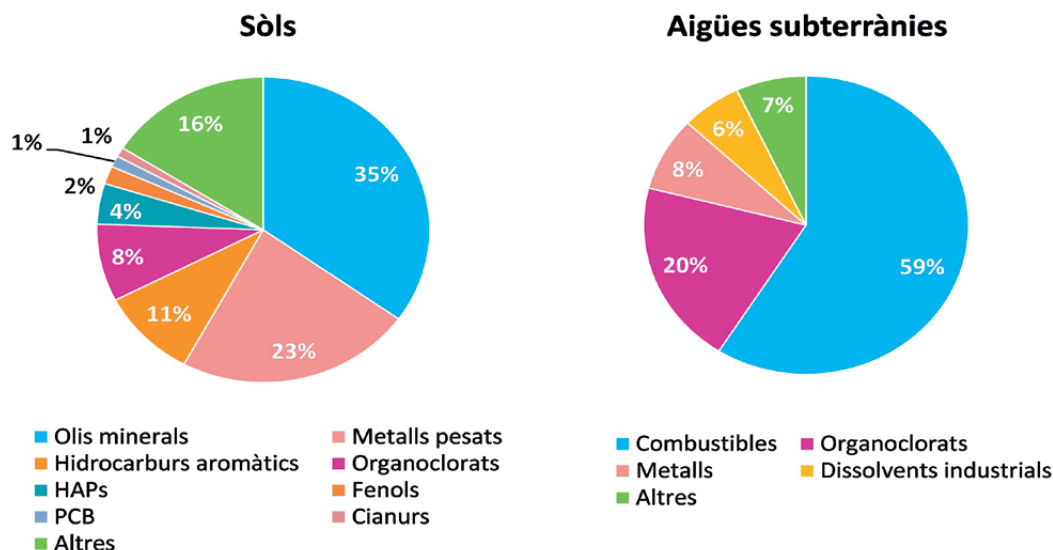


Figura 1. Principals contaminants en els emplaçaments registrats a Catalunya. Els gràfics s'han elaborat amb dades obtingudes de l'Agència de Residus de Catalunya (ARC) per sòls, i de l'Agència Catalana de l'Aigua (ACA) per aigües subterrànies. La nomenclatura dels contaminants correspon a la utilitzada, en cada cas, per les agències. Noteu per exemple que al gràfic de l'esquerra l'ARC parla d'olis minerals i els separa dels hidrocarburs aromàtics, mentre que al de la dreta, l'ACA parla de combustibles, que inclourien els dos grups anteriors.

explotacions agrícoles (pesticides, adobs...) o la que afecta les àrees urbanes (deguda a la deposició dels contaminants atmosfèrics i activitats humanes disperses). Per altra banda, la contaminació puntual està causada per vessaments intencionats o accidentals associats a l'activitat industrial i la producció, transport, emmagatzematge i utilització de combustibles fòssils. Això té un impacte sobre zones o emplaçaments més o menys delimitats on la concentració de contaminants és localment elevada i menys diversa. És a aquest tipus de contaminació a què ens referirem en aquest article.

A casa nostra, segons les dades de l'Agència de Residus de Catalunya (ARC) i de l'Agència Catalana del Aigua (ACA), autoritats competents en sòls (zona no saturada) i aigües subterrànies, respectivament, els principals emplaçaments presenten com a contaminants majoritaris metalls pesants, hidrocarburs, i compostos organoclorats (fig. 1 i 2). Dins dels hidrocarburs (HC), hi trobem en primer lloc els combustibles lleugers, com la gasolina o el dièsel, que contenen sobretot HC lineals de cadena curta i aromàtics de baix nombre d'anells. Aquests, a causa de la seva solubilitat en aigua i elevada mobilitat, afecten sobretot les aigües subterrànies, però també a la zona no saturada del sòl. Un altra fracció són els anomenats olis minerals, on predominen HC lineals de cadena mitjana o llarga que s'utilitzen com a olis hidràulics o combustibles industrials, i que trobem sobretot a la zona no saturada. Finalment, tenim els hidrocarburs aromàtics policíclics (HAPs), compostos integrats per dos o més anells fusionats que tenen un interès especial per la seva elevada persistència ambiental, toxicitat i en alguns

casos, la seva teratogenicitat, carcinogenicitat, i possible activitat com a disruptors endocrins. Els HAPs els trobem en combustibles provinents de les fraccions més pesades del petroli, però també en derivats dels carbons minerals, i són predominants en la zona saturada.

Un altre grup de contaminants importants sobretot a aigües subterrànies són els compostos organoclorats, entre els que destaquen dos productes àmpliament utilitzats com a solvents i desengreixants: el percloretilè (PCE) i el tricloretilè (TCE) (fig. 2). Aquests productes són emprats per a desengreixar tota mena de maquinària i també en la neteja en sec industrial.

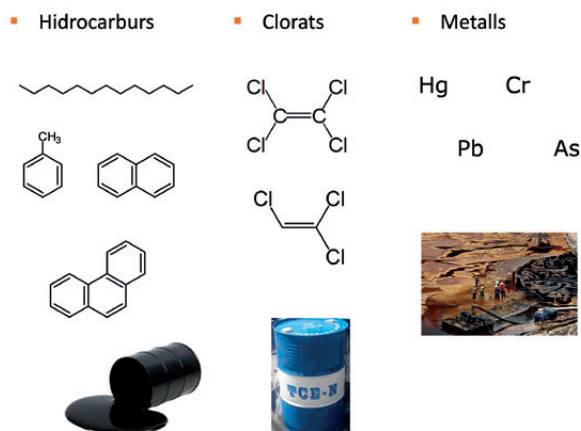


Figura 2. Les tres famílies de contaminants més abundants al sòl i les estructures químiques d'alguns exemples d'hidrocarburs (lineals, monoaromàtics i HAPs) i de compostos organoclorats (percloretilè, PCE, i tricloretilè, TCE).

Biodegradació i bioremediació de sòls contaminats

Destí ambiental

Un cop els contaminants entren en contacte amb el sòl són objecte d'una sèrie de processos que determinen la seva compartimentació i destí ambiental, i que depenen tant de les seves característiques fisicoquímiques com de la composició i estructura de la matriu del sòl. La volatilització, lixiviació, adsorció a les partícules de sòl, fotooxidació i oxidació química, bioacumulació i degradació biològica són exemples d'aquests processos. De tots, la biodegradació duta a terme per les comunitats bacterianes i fúngiques, és l'única que té el potencial d'eliminar en un temps raonable els contaminants orgànics. Quan aquesta eliminació és completa, és a dir quan els contaminants són transformats a CO_2 i H_2O com a resultat del metabolisme microbià, parlem de mineralització.

Bioremediació

És la tecnologia que explota les capacitats degradadores naturals dels microorganismes per mitigar els efectes de la contaminació en sòls i aigües subterrànies d'emplaçaments afectats. La bioremediació és una tecnologia natural, respectuosa amb el medi ambient, molt poc disruptiva, que té una relació cost-eficiència molt inferior a la d'altres tecnologies fisicoquímiques i, el més important, és l'única tecnologia capaç de restablir les funcions ecològiques originals del sòl afectat.

En general, davant d'un emplaçament que necessita ser descontaminat per tècniques biològiques tenim dues opcions: l'atenuació natural monitoritzada (ANM) i la bioremediació activa. L'atenuació natural monitoritzada respon a una intervenció mínima que es basa en demostrar que al sòl s'hi donen processos de degradació natural i fer-ne el seguiment. La bioremediació activa comporta una actuació per estimular les capacitats degradadores de la microbiota ja present al sòl o de microorganismes introduïts amb aquesta finalitat. Per entendre quines intervencions comporta la implementació de les tecnologies de bioremediació, les seves limitacions i com es poden optimitzar, hem de considerar primer els factors que condicionen la biodegradació.

Què impulsa els microorganismes a degradar els contaminants ambientals?

L'objectiu dels microorganismes, com el de tots els altres éssers vius, és créixer i multiplicar-se. Per realitzar aquestes funcions bàsiques necessiten incorporar carboni i altres elements que componen la biomassa cel·lular, i energia. La majoria dels microorganismes del sòl generen aquesta energia per reaccions d'oxidoreducció que requereixen de substrats reduïts que els pro-

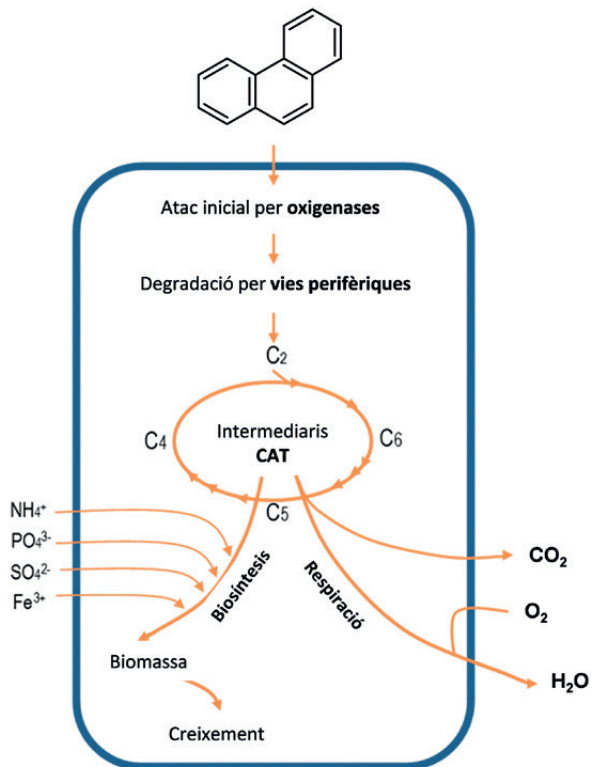


Figura 3. Els hidrocarburs com a font de carboni i energia en el metabolisme cel·lular dels bacteris aerobis degradadors. CAT, cicle dels àcids tricarbòxilics.

porcionin els electrons. Els hidrocarburs poden ser utilitzats per una gran varietat de microorganismes que serveixen tant de font de carboni com d'energia per al creixement. Així podem dir que aquests microorganismes literalment "mengen" hidrocarburs. Els microorganismes degradadors d'hidrocarburs més eficients són aerobis, és a dir, necessiten la presència d'oxigen. Un cop els hidrocarburs entren dins la cèl·lula, són ràpidament atacats per uns enzims clau, les oxigenases (mono- o di-oxigenases) que introdueixen oxigen a les seves cadenes hidrocarbonatades. Després, es produeixen una sèrie de reaccions que converteixen aquests derivats oxigenats en intermediaris del metabolisme central encarregat de la producció d'energia i de subministrar els precursors per a la síntesi de les diferents parts de la cèl·lula (fig. 3). Com hem dit, si la conversió de les molècules de l'hidrocarburi a CO_2 , H_2O i biomassa és completa el contaminant és eliminat del sòl (ha estat mineralitzat). Si no és completa, parlem d'una biodegradació parcial i els productes resultants retornen al sòl.

Un fet característic dels enzims de degradació és la seva versatilitat, és a dir, la seva capacitat d'actuar sobre substrats diferents. Aquesta plasticitat fa que, de vegades, puguin actuar fortuïtament sobre productes que no els serveixen pel seu creixement, però que són transformats de

forma "accidental". Aquestes reaccions, anomenades cometabòliques, encara que no són beneficioses per al microorganisme que les duu a terme, podran contribuir a l'eliminació de contaminants, tot transformant-los en productes oxidats que podran ser utilitzats per altres membres de la comunitat microbiana. D'aquesta forma al sòl es van construint xarxes metabòliques en què diferents poblacions col·laboren en la mineralització dels contaminants. Destaca per exemple, l'acció fortuïta de les dioxigenases que inicien l'atac a HAPs, com la naftalè dioxigenasa, sobre TCE. Aquesta és una reacció que s'ha explotat biotecnològicament per a l'eliminació d'aquest producte en estratègies de bioremediació en condicions aeròbiques.

Encara que aquest article està enfocat sobretot a la bioremediació de sòls contaminats amb hidrocarburs, és interessant explicar que altres compostos orgànics poden jugar un paper molt diferent en el metabolisme dels microorganismes que els destrueixen. L'exemple més destacable, per ser un dels mecanismes més explotats en la descontaminació d'aqüífers afectats per organoclorats, és la deshalogenació reductiva d'aquests compostos. El PCE i el TCE són degradats en condicions anaeròbiques (absència d'oxigen) per microorganismes que literalment els respiren. L'exemple més destacat és un bacteri anomenat *Dehalococcus ethenogenes*, descobert a la dècada dels 90. Aquest microorganisme, que utilitza acetat com a font de carboni, obté energia oxidant H_2 i passant els electrons obtinguts a compostos com el PCE i el TCE, que per tant es redueixen, actua de forma anàloga a l'oxigen en la respiració aeròbica. D'aquesta manera, els clors d'aquests compostos són progressivament eliminats en una cadena de reaccions que dona com a producte final età, un hidrocarbur pràcticament inòcul que és, després, fàcilment eliminat per altres membres de la comunitat microbiana.

Factors que determinen la biodegradació de contaminants al medi ambient

De tot el que s'ha exposat anteriorment, deduïm que perquè els contaminants siguin biodegradats en el sòl cal que hi estiguin presents els microorganismes amb les capacitats metabòliques adients i que aquestes capacitats s'expressin de forma activa, és a dir, que no estiguin limitades. Si volem eliminar els hidrocarburs d'un sòl contaminat, aquests serviran com a font de carboni i energia pels microorganismes. El carboni, per tant, no serà limitant, però caldrà que hi hagi disponibles altres nutrients en les proporcions necessàries per a la síntesi de la biomassa (fig. 3). Els més importants són el nitrogen (N) i el fòsfor (P), que són constituents essencials d'aminoàcids i àcids nucleics. Així que, generalment, caldrà afegir-los en forma de fertilitzants. Altres elements,

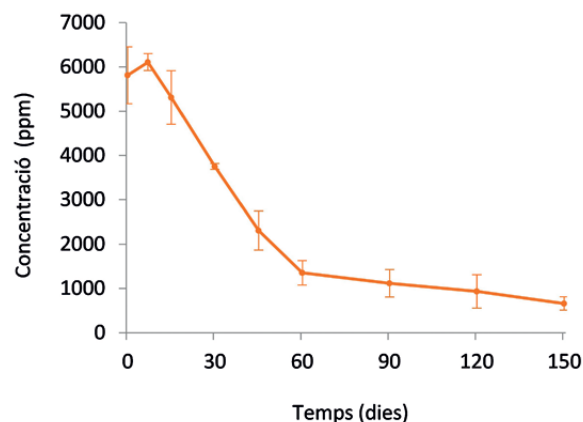


Figura 4. Degradació dels HAPs de baix pes molecular (dos i tres anells) en un experiment en què se simulà un tractament d'un sòl contaminat amb creosota mitjançant una biopila aeròbica. La cinètica mostra la típica corba en forma de "pal de hoquei".

com el ferro, magnesi, sofre, etc., generalment no són limitants, però en sòls pobres la seva administració pot ser necessària. També necessitarem oxigen per a les oxigenases i perquè els microorganismes degradadors d'hidrocarburs puguin respirar, per tant s'haurà de subministrar ja sigui per mitjans mecànics o químics. Alternativament, si el que volem eliminar són compostos clorats, els bacteris deshalogenadors hauran de disposar d'un ambient anaerobi, una font de carboni i un donador d'electrons. Aquests últims s'afegeixen habitualment com a fonts de carboni fàcilment fermentables (sucres o olis vegetals) que les comunitats fermentadores pròpies de l'emplaçament converteixen en acetat i H_2 . Els bacteris degradadors són ubics i en emplaçaments contaminats solen estar enriquits, en cas contrari podem afegir inòculs externs (bioreforç).

Un factor clau per a la degradació dels contaminants en el medi ambient, independent dels microorganismes i les seves activitats metabòliques, és la seva biodisponibilitat. La biodisponibilitat d'un contaminant és l'accessibilitat que hi tenen els microorganismes i depèn tant de l'estructura i composició del sòl com de les característiques fisicoquímiques del producte. Si analitzem una cinètica típica de degradació d'un contaminant al medi ambient, veurem que després d'una fase variable de degradació ràpida segueix sempre una fase de degradació lenta que arriba a ser asimptòtica (fig. 4). La fase de degradació ràpida correspon a la fracció de contaminant que és fàcilment accessible als microorganismes, mentre que la fase lenta correspon a una fracció segrestada, és a dir, fortament associada a la matriu del sòl per processos d'adsorció i absorció, o perquè es troba en porus on no hi poden arribar els microorganismes. En el cas d'una barreja (per ex. un cru de petroli), aquesta fracció poc disponible estarà enriquida en els compostos més recalcitrants, que solen ser els

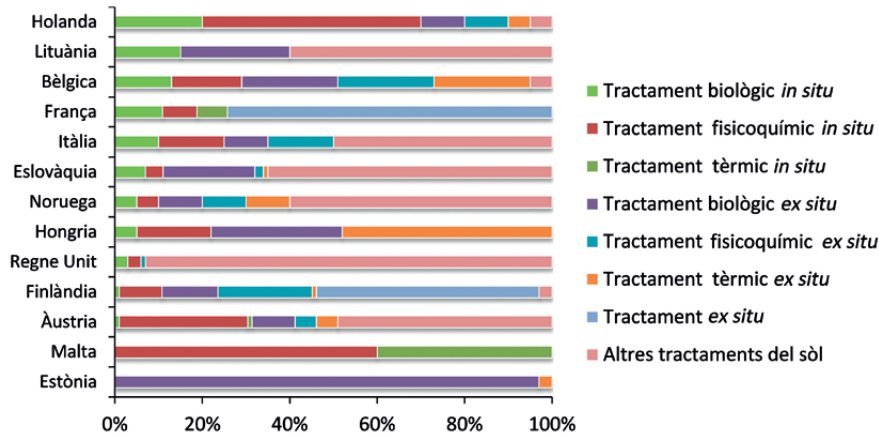


Figura 5. Percentatge d'aplicació de les tècniques de bioremediació (tractaments biològics *in situ* i *ex situ*) respecte al total de les tècniques de descontaminació de sòls en països de la Unió Europea. Dades de Panagos *et al* (2013).

de més pes molecular i més hidrofòbics. La fracció del contaminant no accessible és variable per a cada emplaçament i producte. D'aquí que la bioremediació té com a principal inconvenient la incertesa associada al procés, és a dir, la limitada capacitat de predir amb exactitud la concentració del residu final després del tractament. Els microorganismes tenen mecanismes per incrementar la biodisponibilitat, i aquesta és una línia de recerca molt actual que inclou la producció de biotensioactius i les respostes quimiològiques (Ortega-Calvo *et al.*, 2013). D'altra banda, en una intervenció en un emplaçament contaminat també podem incrementar la biodisponibilitat del residu mitjançant l'addició de tensioactius biològics o sintètics, una pràctica bastant habitual en el cas de vessaments marins.

Bioremediació de sòls contaminats amb hidrocarburs

D'acord amb els informes periòdics que publica l'Agència Europea pel Medi Ambient (<http://www.eea.europa.eu/>) fins l'any 2014 la tècnica de descontaminació de sòls més utilitzada pels països membres dels que es tenen dades va ser l'excavació i posterior abocament en dipòsits controlats. Afortunadament, però, el més exhaustiu control i el conseqüent increment en el cost de l'ús dels abocadors combinats amb el desenvolupament i optimització de les tècniques de descontaminació *in situ* i *ex situ* està produint canvis en el patró de les pràctiques de remediació. Dins d'aquestes, l'ús de la bioremediació està experimentant un creixement continu. La figura 5 mos-

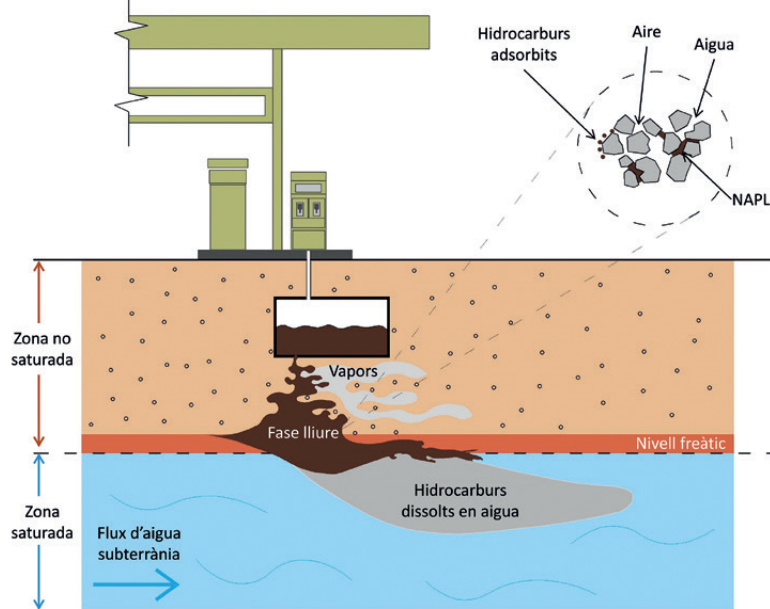


Figura 6. Model conceptual d'un episodi típic de contaminació per hidrocarburs. Es mostra un vessament produït per una fuga accidental d'un tanc subterrani en una estació de venda de combustibles i la distribució de contaminants en el sòl i les aigües subterrànies (Dibuix: Dènio Grifoll Escoda).

tra la proporció d'aquesta tecnologia en relació a les altres tècniques segons un estudi del 2013 (Panagos *et al.*, 2013). Aquí revisarem breument les estratègies de bioremediació disponibles.

La figura 6 mostra un model conceptual d'un episodi típic de contaminació per hidrocarburs. Es tracta d'un vessament accidental a partir d'un tanc subterrani deteriorat on el producte, que podria ser gasolina, dièsel o un oli mineral, contamina la zona no saturada del sòl i va baixant per gravetat fins arribar a l'aquífer. Com que els hidrocarburs són menys densos que l'aigua, a la fase lliure flota en el nivell freàtic i una part de la mateixa es dissol formant un plomall de contaminació que es desplaça seguint la direcció de les aigües subterrànies. A mesura que es desplacen els contaminants interactuen amb la matriu del sòl, patint fenòmens d'adsorció i de retard d'acord amb les seves característiques fisicoquímiques. Com ja s'ha dit més amunt, un cop es decideix que el sòl necessita ser descontaminat tenim les opcions d'una atenuació natural monitoritzada (ANM) o una bioremediació activa (Atlas i Philp, 2005).

Bioremediació activa o Atenuació Natural Monitoritzada?

Si no hi ha pressa i no s'identifiquen receptors afectats (en definitiva no hi ha un risc imminent per a la població ni l'ecosistema) podem optar per la segona opció, que serà sempre la menys intrusiva. Llavors, el primer requisit serà presentar evidències d'atenuació, que poden incloure l'enumeració o detecció molecular de microorganismes o d'enzims degradadors actius, o la detecció de marcadors químics de degradació (metabòlits, variació de ràtios de HC degradables respecte a components menys degradables). Sovint s'opta pel confinament físic i és imprescindible establir i mantenir una xarxa de monitoratge que permeti mostrejar sòl i aigües subterrànies (instal·lació de piezòmetres). Això ens permetrà estimar el temps necessari per la descontaminació, que habitualment es considera que no pot superar els 30 anys. Encara que aquesta pot semblar una opció de molt baix cost no ho és. A la zona contaminada s'hi ha d'instal·lar una graella de piezòmetres o pous que permetin un mostreig i anàlisi continu de tota la zona afectada i aquest monitoratge es pot perllongar durant anys.

En cas que ens decidim per una intervenció activa tenim dues opcions, la bioestimulació i el bio-reforç. La bioestimulació actua sobre els factors limitants de la biodegradació, per tant, en el cas dels hidrocarburs caldrà proporcionar en primer lloc oxigen. El més habitual és subministrar aquest oxigen mitjançant volteig del sòl o injecció d'aire, però per tractar la zona saturada (aquífer) també podem aplicar productes químics alliberadors d'oxigen. Un exemple és l'aigua oxigenada, molt soluble en aigua i que es descomposa espontàniament en O₂ i aigua. Més sofisticades són una sèrie de formu-

lacions comercials que alliberen O₂ de forma lenta, amb l'avantatge que només cal aplicar-les cada 2-3 mesos. Es tracta de diferents peròxids (de Ca o de Mg) que un cop formulats poden tenir preus bastant elevats, però que són molt eficients. La fertilització amb compostos de N i de P també és clau, es poden utilitzar compostos orgànics (urea), sals inorgàniques (nitrats i fosfats) i fins i tot fertilitzants oleofílics. Entre aquests últims destaca l'anomenat S-200, una formulació que atesa la seva naturalesa oleofílica permet que els nutrients que conté es mantinguin en contacte amb els hidrocarburs, que és on seran utilitzats pels microorganismes. Hem mencionat també que un dels factors limitants en la degradació és la biodisponibilitat. Aquesta es pot incrementar afegint tensioactius químics o biològics, sent aquests últims més amigables amb l'ambient, però de cost més elevat. Finalment, si ens trobem davant una barreja d'hidrocarburs que es resisteix a la degradació (per ex. amb productes de molt elevat pes molecular o asfàtics) una opció és afegir un cosubstrat que afavoreixi la multiplicació dels microorganismes i permeti reaccions cometabòliques. Entre els més utilitzats hi ha les melasses i els olis vegetals que sovint s'afegeixen emulsionats en aigua.

En determinats emplaçaments la població de microorganismes degradadors autòctons o la seva activitat poden ser massa baixes pels nostres objectius. En aquest cas és aconsellable aplicar microorganismes (bioforç). La utilització d'inòculs està poc documentada en llibres de consulta, però és una estratègia creixent que s'ha utilitzat en el tractament d'aigües residuals durant més de 30 anys. Hi ha una varietat d'inòculs comercials disponibles, que normalment contenen una barreja de poblacions microbianes. En alguns casos, quan preocupa la incorporació d'espècies al·lòctones, pot ser útil obtenir cultius provinents del mateix emplaçament. La figura 7 mostra un consorci microbià desenvolupat en el nostre laboratori a partir de les poblacions presents en una mostra de sorra d'una platja contaminada pel fuel vessat pel Prestige. Un cop demostrada la seva capacitat degradadora i estabilitat, aquest consorci es feia créixer en un fermentador, es concentrava i es traslladava a Galícia, on era aplicat en un estudi pilot de bioremediació d'una platja contaminada. Com es pot veure a la figura, el consorci, anomenat UBF, degradava de forma extensiva tant la fracció alifàtica (50%) com l'aromàtica (70%) del fuel vessat.

Estudis previs a la implantació d'un tractament de bioremediació activa

La bioremediació requereix de la utilització de maquinària pesant i instal·lacions que són costoses. D'altra banda, ja hem dit que una de les limitacions d'aquesta tecnologia és la seva incertesa. Per tot això és imprescindible que abans de decidir-nos per la seva implantació fem una sèrie

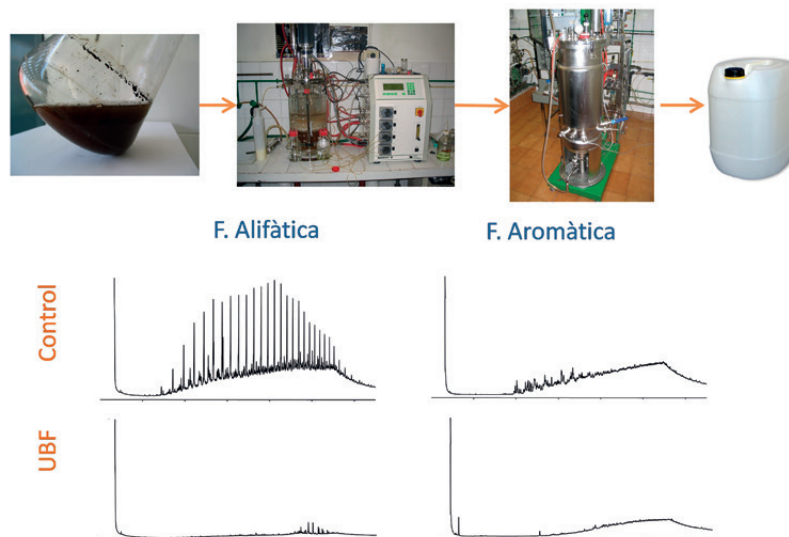


Figura 7. Desenvolupament d'un consorci microbià a partir de poblacions autòctones del mateix emplaçament per la seva aplicació en una platja afectada pel vessament del vaixell petroler *Prestige*, a Galícia. La part superior mostra el cultiu obtingut per enriquiment de les poblacions presents en una mostra de sorra i la seva producció en un fermentador. La part de sota mostra cromatogrames de les fraccions alifàtiques del fuel sense degradar i del fuel després de ser degradat pel consorci UBF.

d'estudis de laboratori que valorin les probabilitats d'èxit tot determinant quin tipus d'actuacions són les més apropiades. Aquests estudis són habitualment encarregats per les consultories ambientals a laboratoris de recerca. De fet, el nostre grup ofereix aquests estudis com a servei a les empreses.

Un cop s'han fet els estudis de camp per caracteritzar la naturalesa de la contaminació i la seva distribució, es recullen mostres representatives del sòl contaminat i es traslladen al laboratori. Aquí mostrarem com a exemple un estudi que es va fer per la consultoria ambiental Litoclean SL en relació a un vessament de fluid tèrmic (HTF de

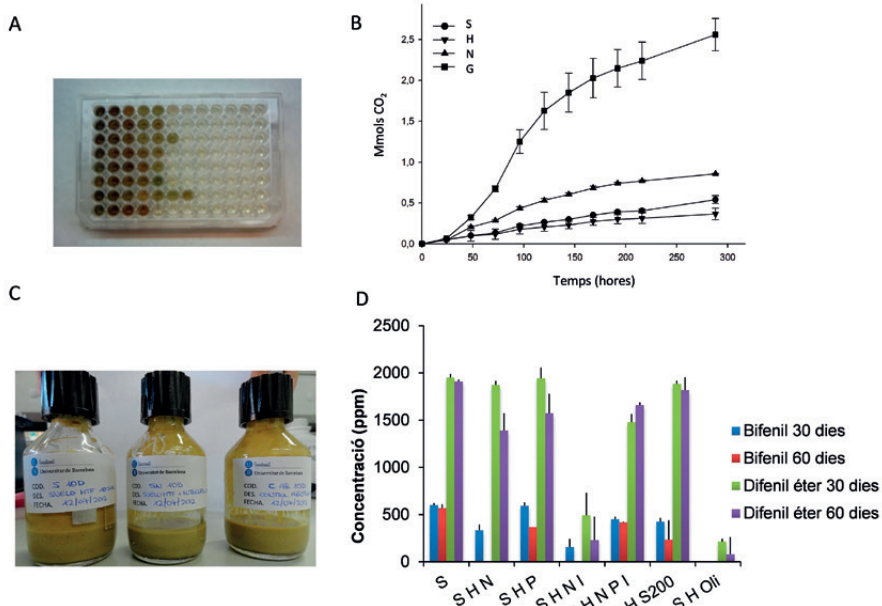


Figura 8. Estudis de laboratori previs a la implementació d'una estratègia de bioremediació en un sòl d'una estació termosolar contaminat per un vessament del fluid tèrmic (HTF) compost pels productes bifenil i difenil èter. A, recompte de poblacions degradadores per la tècnica del nombre més probable en medi mineral i HTF com a font de carboni. B, resposta de l'activitat respiratòria del sòl sense tractar (S), tractat amb humitat (H), humitat i nutrients (N) i glucosa (G). C, microcosmos de suspensions del sòl amb diferents tractaments de bioremediació. D, resultats obtinguts en els microcosmos per cadascun dels tractaments. Els millors resultats corresponen a l'aplicació d'un inòcul autòcton (SHNI) i a oli vegetal (SH Oli). Aquest treball es va fer per l'empresa Litoclean SL.

l'anglès *heat transfer fluid*) en una planta termosolar (Vila et al., 2013) (fig. 8). L'HTF és una barreja de dos compostos: bifenil i difenil èter. Es dugueren a terme assajos a dos nivells. Els de primer nivell o estudis de factibilitat pretenien determinar si al sòl hi havia poblacions microbianes capaces de degradar l'HTF vessat i, a grans trets, si aquestes poblacions podien ser estimulades. Es va fer un recompte utilitzant un medi ric que, en general, permet el creixement de tots els bacteris aerobis, i en un medi mineral amb HTF com a única font de carboni, de manera que en aquest últim només es comptaven els bacteris que creixien utilitzant els contaminants. Els resultats varen demostrar que de la població total present, una quarta part (uns 1.000 bacteris per gram de sòl) eren degradadors d'HTF. En nombres absoluts, la concentració de degradadors era molt baixa ($<10^3$ per gram de sòl), però les proves de respirometria (mesura de la producció de CO_2) demostraren una ràpida resposta a l'estimulació quan s'afegien nutrients i una font de carboni fàcilment degradable.

Els estudis de nivell 2 o de tractabilitat consistiren en la incubació de microcosmos de sòl de l'emplaçament (incubacions de mostres de sòl) exposats a diferents tractaments. En aquest cas, es va assajar l'efecte de la fertilització amb sals de N i P i amb el fertilitzant oleofílic comercial S200, l'addició d'oli vegetal com a cosubstrat, l'aplicació de palla com a material esponjant, i el bioforç amb un consorci microbià que prèviament havíem obtingut del mateix emplaçament. Com es pot veure a la figura 8, el millor resultat es va obtenir amb l'aplicació de l'inòcul i d'oli vegetal, per tant aquests van ser els tractaments recomanats.

Tecnologies de bioremediació

La restauració d'un emplaçament contaminat sol requerir la combinació de diverses tecnologies de bioremediació. La zona no saturada (sòl pròpiament dit) i la saturada (aigües subterrànies) es tracten de forma diferent. A continuació descrivim breument les tecnologies disponibles més utilitzades.

En el cas de les aigües subterrànies la intervenció que recomana la Unió Europea és el tractament *in situ*. Dins d'aquest tipus de tractament hi trobem la tecnologia dels pous d'injecció i circuits hidràulics, en què el plomall de contaminació és travessat per una xarxa de pous que s'utilitzen per aplicar els tractaments recomanats pels assajos de tractabilitat, inclosa la injecció d'aire o dels productes generadors d'oxigen, si escau. Els productes afegits s'apliquen dissolts en aigua que s'obté d'una xarxa de pous de recuperació situada aigües avall, de forma que el plomall queda emmarcat en un sistema semitancat que evita la disseminació de la contaminació durant el tractament. Quan el producte contaminant és relativament volàtil (per ex. gasolina), es pot fer servir el *biosparging*, que consisteix en una injecció d'aire en forma de bombolles molt fines que, a més de



Figura 9. Construcció de biopiles aeròbics pel tractament d'un sòl contaminat per gasoil i olis minerals en un emplaçament de la Comunitat de Madrid. La descontaminació la va dur a terme l'empresa Geotecnia 2000 (Grupo TÜV_SÜD ATISAE). En les imatges es poden veure els processos d'excavació, homogeneïtzació, reg i construcció de les piles de sòl cobertes amb una lona impermeable. Les fotografies han estat cedides per l'empresa.

subministrar l'oxigen necessari per estimular la biodegradació, s'utilitza per a forçar el pas lent del contaminant a la fase gasosa que es desplaça cap a la zona saturada. En travessar la zona saturada el contaminant es va degradant, amb el sòl actuant com un biofiltre. La injecció d'aire pot anar acompanyada o ser substituïda per un sistema de buit que condueix els possibles vapors no degradats a un sistema d'atrapament (per ex. carbó actiu) o de tractament situat a la superfície.

Una altra tècnica *in situ* és la construcció d'una barrera bioreactiva que intercepti el plomall de contaminació de manera que en travessar-la els contaminants siguin eliminats per biodegradació. Aquestes barreres han d'estar construïdes amb un material porós que afavoreixi la seva colonització per poblacions microbianes degradadores del mateix sòl o que ja hagi estat inoculat. En el cas dels hidrocarburs la barrera haurà de ser aeròbia, per la qual cosa caldrà una aportació d'oxigen ja

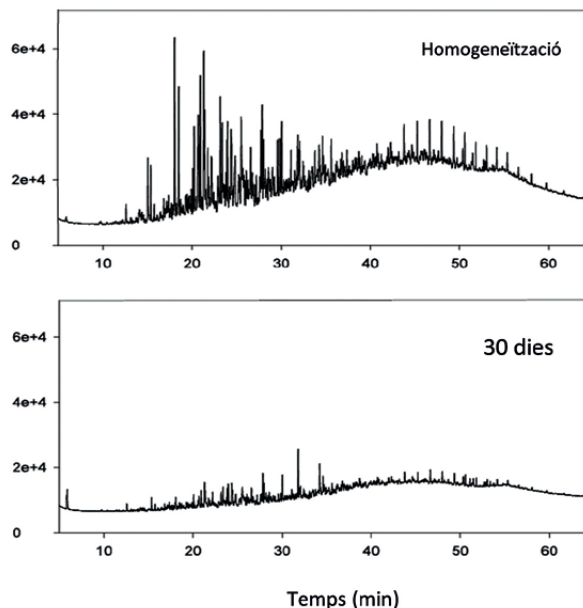
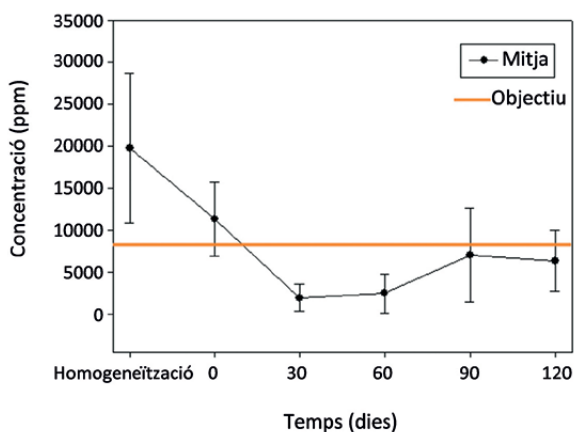


Figura 10. Evolució de les concentracions de TPH (hidrocarburs totals del petroli) en el sòl tractat en biopiles per l'empresa Geotecnia 2000 (Grupo TÜV-SÜD ATISAE). Els cromatogrames mostren el perfil dels hidrocarburs en el moment en què es va construir la biopila i després de 30 dies del tractament, quan s'havien ja assolit els objectius de descontaminació.

sigui en forma d'injecció d'aire o de productes alliberadors d'oxigen.

El tipus de tecnologia que s'ha d'utilitzar per la zona no saturada del sòl dependrà també del tipus de producte. En el cas de vessaments de gasolina o gasoil, on hi ha una fase gasosa important, es pot fer *bioventeg* (de l'anglès *bioventing*), un tractament *in situ* on de manera similar al *biosparging*, s'injecta aire o s'aplica buit per forçar la circulació dels vapors a través del sòl. Si el producte no és volàtil, com poden ser olis minerals o dièsel, s'opta per un tractament *ex situ*, consistent en l'excavació del sòl contaminat i el seu tractament en biopiles. Aquestes biopiles, si són estàtiques, es construeixen després d'haver homogeneïtzat el sòl i d'afegir els tractaments (nutrients, inòcul i/o fertilitzants) i tenen una forma de piràmide truncada, amb una alçada d'uns 3 m. Durant la seva construcció s'inclouen sistemes d'aïreació per injecció d'aire. El tractament dura entre 2-3 mesos i un cop assolits els objectius de descontaminació el sòl pot ser retornat al seu lloc original (fig. 9 i 10). Una modalitat sovint utilitzada a casa nostra que et permet un control més gran del procés són les biopiles actives, on el sòl es disposa en piles allargades que es van voltant periòdicament.

Una tècnica molt utilitzada, però no recomanada actualment per la Unió Europea és la coneguda amb el nom de *landfarming*. Aquesta requereix la disponibilitat de grans àrees impermeabilitzades on es disposa el sòl contaminat en una capa d'uns 20-40 centímetres que es va airejant de forma similar a com es fa en els conreus, i es va afegint fertilitzants i aigua a demanda. Finalment, molt efectiva, però amb limitacions importants de

quantitat de sòl a tractar i cost, és la utilització de bioreactors semilíquids, on el sòl es barreja amb aigua fins aconseguir un fang fluid que es tracta en reactors aerobis de funcionament similar als del tractament de les aigües residuals urbanes. El sòl es recupera per sedimentació i pot ser retornat al seu emplaçament, mentre que l'aigua utilitzada pot anar recirculant.

Reptes de recerca per al desenvolupament i millora de les tecnologies de remediació

En aquest últim apartat ens centrarem en els estudis de biodegradació d'HAPs i de bioremediació amb sòls contaminats per aquest grup d'hidrocarburs. Aquesta ha estat la línia de recerca principal del nostre grup a la UB durant més de 20 anys. La nostra intenció aquí és mostrar els enfocaments progressius que hem anat adoptant, de forma paral·lela amb altres grups internacionals, i que han tingut sempre com objectiu esbrinar les complexes xarxes metabòliques que condueixen a l'eliminació d'aquests compostos en el sòl per part dels bacteris.

Rutes metabòliques per a la degradació/transformació d'HAPs per soques bacterianes aïllades

La capacitat d'una gran diversitat de bacteris per créixer formant colònies en medis de cultiu amb HAPs individuals com a única font de carboni ens ha permès aïllar i mantenir al laboratori una col·lecció de soques degradadores (fig. 11). El cultiu d'aquestes soques en diferents condicions ens ha servit per identificar els metabòlits acumu-

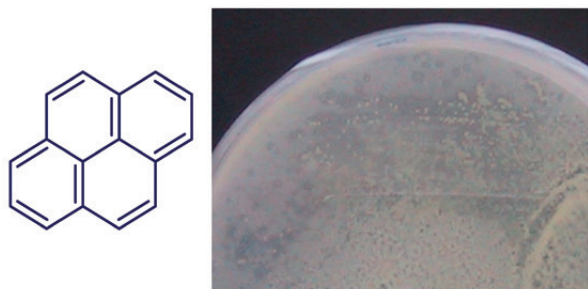


Figura 11. Estructura química de l'HAP de quatre anells més abundant en sòls contaminats, el pirè. Creixement de la soca degradadora de pirè *Mycobacterium* sp. AP1 en una placa de medi mineral pulveritzada amb pirè, que és l'única font de carboni. A la imatge es poden observar els halos de desaparició del pirè al voltant de les colònies bacterianes a causa de la degradació.

lats durant el creixement en HAPs per mètodes d'anàlisi química (cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses, GC-MS, cromatografia líquida d'alta resolució, HPLC, ressonància magnètica nuclear, NMR) i així esbrinar les vies metabòliques que condueixen a la mineralització d'aquests HAPs per soques individuals. Així, per exemple, hem publicat vies de degradació d'hidrocarburs de tres anells com el fluorè, utilitzant diferents soques Gram-negatives (*Bulkholderia*, *Pseudomonas*) o Gram-positives (*Arthrobacter*), o de quatre anells com el fluorantè o el pirè per actinobacteris (*Mycobacterium*) (Vila *et al.*, 2015). D'altra banda, aquestes soques aïllades per la seva capacitat de créixer utilitzant un determinat HAP mostraren ser molt versàtils, atacant una gran varietat de productes anàlegs que degradaven parcialment o cometabolitzaven transformant-los en productes oxidats (per ex. cetones o quinones aromàtiques) que s'acumulaven al medi.

En els sòls les poblacions microbianes estan exposades a barreges i no a HAPs individuals, això ens va portar a investigar el paper que podia fer el cometabolisme o degradació parcial en la degradació d'aquestes barreges.

Degradació de barreges d'HAPs en sòls: importància del cometabolisme

El pas següent en aquest abordatge progressiu ha estat determinar les accions de bacteris degradadors en barreges com a diferents derivats del petroli, on predominen els derivats metilats dels HAPs formant famílies d'isòmers, o dels carbons minerals. Entre els últims, una barreja que hem utilitzat sovint com a model és la creosota, un oli derivat de l'hulla que amb un contingut del 85% en HAPs que ha estat utilitzada durant molts anys per preservar la fusta del seu deteriorament ambiental. En exposar soques degradadores de pirè (HAP de quatre anells) a aquestes barreges, es va comprovar que efectivament atacaven de forma simultània tant alcans, els quals mineralitzava, com totes les famílies d'HAPs d'entre dos a cinc anells aromàtics (fig. 12). La identificació dels metabòlits acumulats mostrà que mentre alguns components eren mineralitzats, altres, malgrat que desapareixien del cromatograma dels hidrocarburs, eren només transformats. Per una banda, certs HAPs eren acomodats per les vies degradadores fins que es produïa un intermediari que ja no encaixava en els passos posteriors de la via (degradació parcial). En aquesta línia, s'acumulaven sobretot àcids aromàtics dicarboxílics, típics del metabolisme dels actinobacteris. Per altra banda, es produïen accions cometabòliques degudes sobretot a les oxigenases, que donaven cetones, quinones i àcids monocarboxílics que

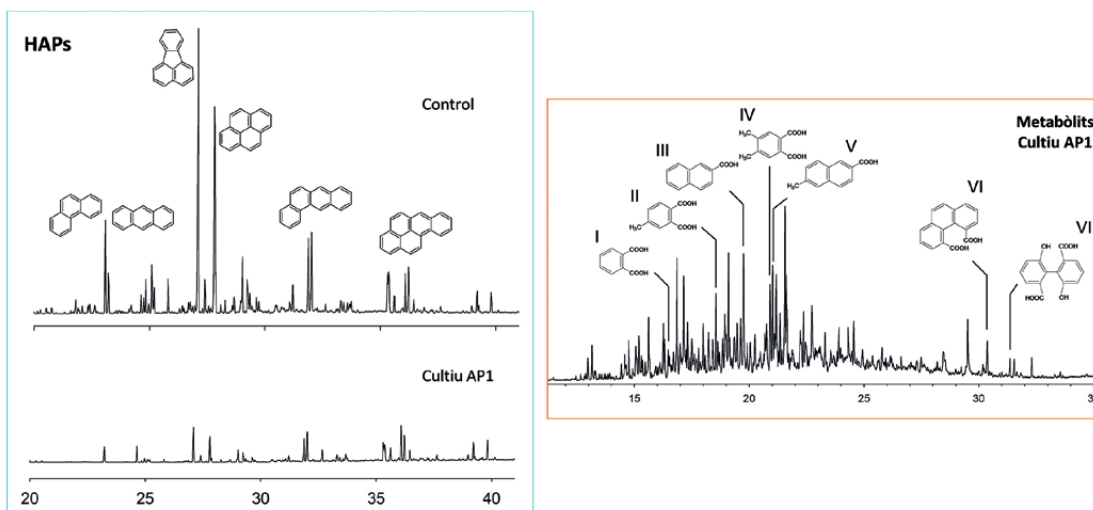


Figura 12. Cromatogrames que mostren l'eliminació d'HAPs de la creosota per un cultiu de la soca bacteriana *Mycobacterium* sp. AP1 (a l'esquerra), i l'acumulació de metabòlits en el mateix cultiu a causa de la degradació d'alguns compostos és només parcial (dreta). Alguns d'aquests metabòlits, com els productes VI i VII només s'han trobat en vies de degradació de micobacteris, per tant, la seva presència en sòls indicaria l'activitat d'aquests microorganismes.

no eren posteriorment oxidats. Aquests resultats plantejaven quin era el destí d'aquests productes d'oxidació parcial, més biodisponibles i de vegades més tòxics que els HAPs parentals. L'aïllament de soques especialitzades en la posterior degradació d'aquests productes plantejà que el seu paper dins de les xarxes de degradació ambiental és el d'actuar com a nòduls que connecten vies d'atac primari dels HAPs amb vies de degradació secundàries necessàries per completar la seva mineralització. Per tant, podem parlar de xarxes cooperatives. L'estudi d'aquestes rutes i poblacions secundàries és un dels focus de la nostra recerca actual (Vila *et al.*, 2015).

Detecció de metabòlits d'HAPs en mostres ambientals com a indicadors de biodegradació activa en emplaçaments contaminats i en l'avaluació del risc

Hem vist més amunt que durant la degradació ambiental dels HAPs es poden acumular productes de degradació parcial o de cometabolisme. La detecció d'aquests productes en sòls contaminats podria ser una eina molt útil per demostrar que hi ha una degradació activa i, per tant, que és factible la implementació d'una atenuació natural monitoritzada. D'altra banda, en sòls sotmesos a bioremediació activa, serien útils per dur a terme un seguiment del procés. Per provar aquesta hipòtesi el primer pas era esbrinar si realment aquests productes s'acumulaven i si érem capaços de detectar-los en emplaçaments contaminats reals. Una col·laboració amb la Universitat

de Waterloo a Canadà ens va permetre disposar de mostres d'aigua de diferents punts de l'aquífer experimental de Borden, on cinc anys abans s'havia simulat un vessament de creosota. L'anàlisi per GC-MS va demostrar que, juntament amb els HAPs de la creosota, el plomall de contaminació contenia concentracions similars de cetones i quinones, productes que havien estat prèviament identificats com a resultat del cometabolisme bacterià dels HAPs. A més, les anàlisis dels extractes àcids mostraren una gran varietat d'àcids carboxílics procedents del trencament d'anells aromàtics de diferents HAPs, alguns dels quals eren metabòlits signatura de rutes de grups de microorganismes específics. Més endavant hem demostrat la presència de productes similars en sòls i en sòls sotmesos a bioremediació on, afortunadament, s'hi acumulen de forma transitòria per ser degradats posteriorment.

Anàlisi estructura-funció de comunitats microbianes per mètodes moleculars

El desenvolupament de les tècniques d'anàlisi molecular de mostres ambientals confirmà el que els ecòlegs microbians ja havien indicat a partir de tècniques d'observació directa: que només una petita part de les poblacions microbianes ambientals es podien recuperar per mètodes de cultiu. En el cas dels sòls s'estima que els microorganismes cultivables són menys del 0,3% (Amann *et al.*, 1995). Per tant, si aspirem a conèixer amb detall les rutes microbianes de degradació de contaminants en el sòl hem d'em-

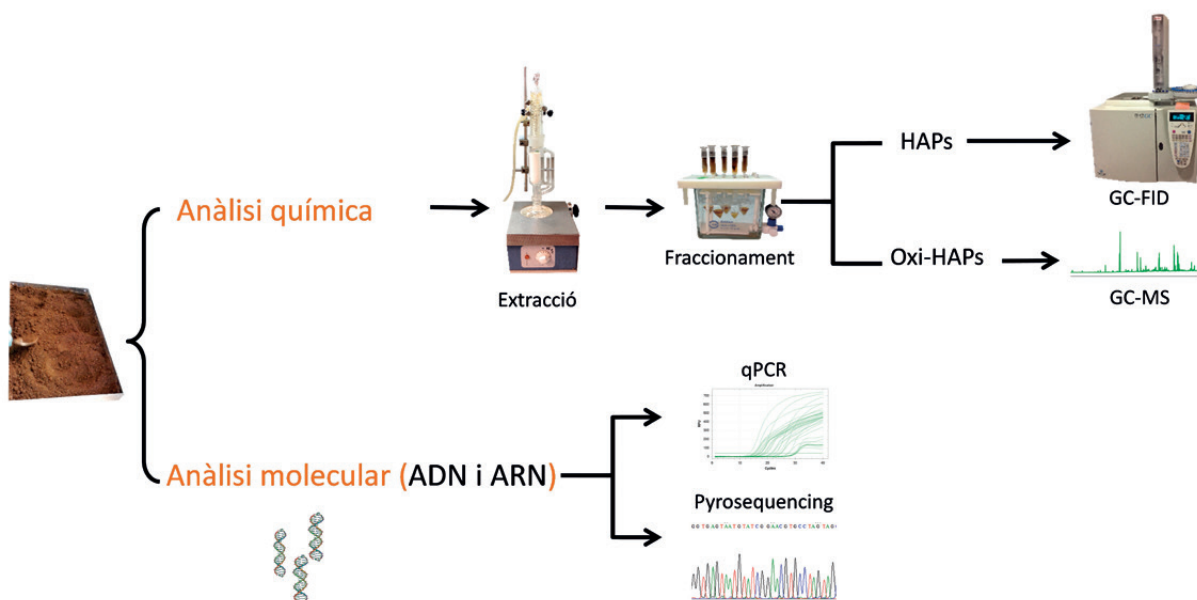


Figura 13. Disseny d'un experiment de bioremediació a escala de laboratori amb un sòl real contaminat amb creosota. El sòl es va distribuir en safates (3 kg) i es fan realitzar 3 tractaments: sòl sec (control), ajustant la humitat a la capacitat de camps al 40%, i ajustant la humitat i afegint nutrients. A través del temps es van recollir mostres per a l'anàlisi química (extracció orgànica seguida de fraccionament i anàlisi per GC-FID i GC-MS) i l'anàlisi molecular (extracció d'àcids nucleics i posterior piroseqüenciació i qPCR).

prar tècniques independents de cultiu. L'anàlisi de l'ADN ens proporciona també la capacitat de detectar i quantificar de forma selectiva gens diana que codifiquin per enzims de reaccions clau. Amb aquesta perspectiva i amb la base sòlida de coneixement que ens ha proporcionat l'estudi de les rutes degradatives amb microorganismes cultivats, ara podem plantejar estudis amb un enfocament holístic utilitzant sòls reals per analitzar de forma exhaustiva les poblacions microbianes i les xarxes metabòliques implicades en la biodegradació de contaminants orgànics *in situ*.

Un exemple és un treball recent (Tauler, 2015) on hem estudiat la degradació d'HAPs en un sòl real procedent d'un emplaçament amb contaminació històrica per creosota. Es tracta d'una antiga planta de tractament de travesses per a la construcció del ferrocarril situada al sud d'Espanya. Es van recollir 50 kg de sòl que després de ser assecats i homogeneïtzats tenien un contingut en HAPs de 8.600 mg/kg, que comprenien tota la sèrie de dos a sis anells, sent els més abundants el fenantrè i l'antracè, de tres, seguits del fluorantè i pirè de quatre. Per estimular la biodegradació inicialment es va planejar dos tractaments amb addició de nutrients i sense, després d'ajustar la humitat i proporcionant condicions aeròbiques (volteig). A través dels temps es prenen mostres per a anàlisi química (HAPs i metabòlits) i per a anàlisi molecular (extracció d'ADN i ARN) (fig. 13). L'anàlisi d'ADN serveix per determinar la composició de la comunitat microbiana total, mentre que l'ARN dona informació d'aquelles comunitats que es troben actives en un moment determinat. Els canvis en l'estructura de les comunitats es determinaven per seqüenciació massiva (piroseqüenciació) dels gens de l'ARNr 16S presents en cada moment. El gen de l'ARNr 16S està present en totes les bacteries i la seva seqüència és com un codi de barres que s'utilitza per identificar les diferents poblacions. La piroseqüenciació és una tècnica que permet l'anàlisi de milers de seqüències diferents en una mostra. La quantificació del nombre de seqüències obtingudes a partir de l'ADN i l'ARN (per una tècnica anomenada PCR quantitativa, qPCR) ens permetia també quantificar el nombre de bacteris total presents en cada moment i estimar quina proporció estaven actius. A més, s'analitzaven seqüències de gens diana en la degradació d'HAPs: les dioxigenases que ja hem vist que inicien l'atac a aquests compostos. La discussió detallada dels resultats escapa als objectius d'aquest article, però sí que en mostrem alguns per il·lustrar la valuosa informació que es pot obtenir combinant les diferents tècniques. En presència de nutrients (és a dir, quan el N i el P no eren limitants) tots els HAPs es van degradar de forma simultània amb cinètiques típiques en forma de pal de hoquei més lentes com més gran era el nombre d'anells. Al final de la incubació els de baix pes molecular s'havien reduït en un 95% mentre que els d'elevat pes molecular ho feren en

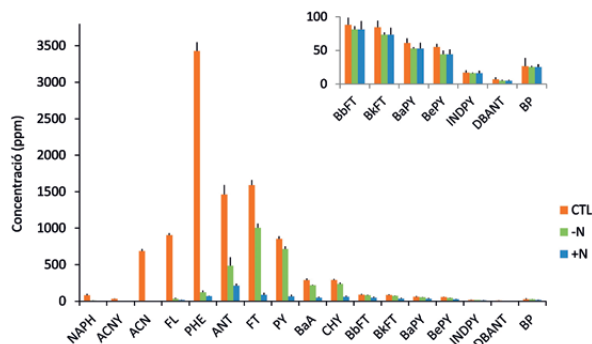


Figura 14. Degradació dels 17 HAPs més abundants de la creosota durant l'experiment de bioremediació en laboratori en el control sòl sec (CTL), ajust de la humitat (-N), i ajust de la humitat més nutrients (+N). NAPH, naftalè; ACNY, acenaftilè; ACN, acenaftè; FL, fluorè; PHE, fenantrè; ANT, antracè; FT, fluorantè; PY, pirè; BaA, benzo(a)antracè; CHY, crisè; BbFT, benzo(b) fluorantè; BkFT, benzo(k)fluorantè; BaPY, benzo(a) pirè; BePY, benzo(e)pirè; INDPY, indeno(1,2,3-cd)pirè; DBANT, dibenzo(h,a)antracè; BP, benzo(g,h,i)perilè.

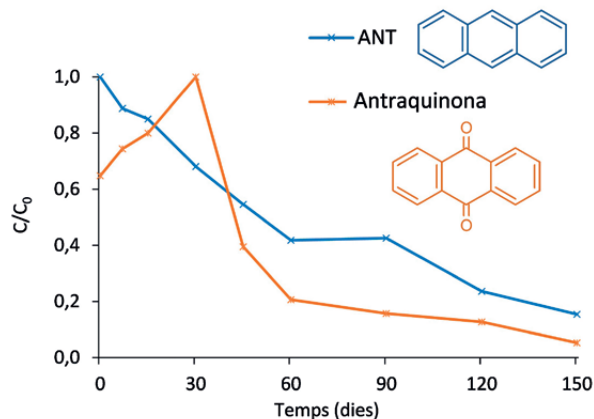


Figura 15. Evolució de les concentracions relatives de l'antracè (HAP de tres anells) i la seva quinona (antraquinona) durant el tractament amb nutrients de l'experiment de bioremediació en laboratori de sòl contaminat amb creosota. Mentre que l'antracè va disminuint més o menys de forma lineal, es pot observar una acumulació transitòria de la quinona, que es forma com a resultat del cometabolisme de l'antracè i que després és reutilitzada.

més d'un 75% (fig. 14). Durant la seva degradació s'acumularen metabòlits (oxi-HAPs) que es continuaven detectant durant molt temps després de desaparèixer els HAPs parentals, però que eren posteriorment degradats per altres poblacions (fig. 15). Això reforça la idea de la seva utilització com a indicadors de biodegradació a la vegada que demostra que, en les condicions apropiades i sense factors limitants, si la incubació continua aquests acaben essent reutilitzats.

L'anàlisi de les comunitats mostrarà que encara que el nombre total de microorganismes durant el procés no variava de forma significativa, sí canviava de forma dramàtica la proporció dels que degradaven activament els HAPs. Encara

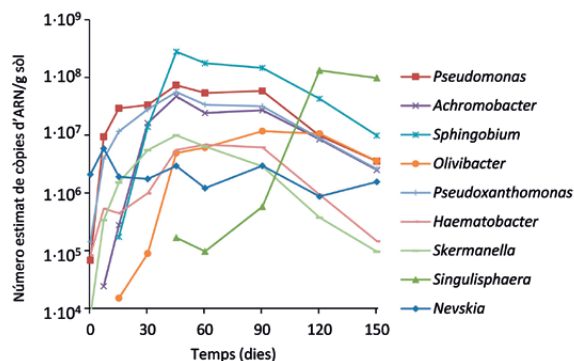


Figura 16. Dinàmica dels gèneres actius més abundants (segons les anàlisis d'ARN) durant la degradació dels HAPs d'un sòl contaminat amb creosota i tractat ajustant la humitat i afegint nutrients (experiment de bioremediació en laboratori). Els resultats representats en aquesta gràfica són estimacions realitzades a partir de les dades de qPCR i piroseqüenciació. Els resultats obtinguts per les poblacions totals (DNA) no es mostren, però donaren cinètiques completament diferents. Comparant aquestes cinètiques amb les de desaparició dels HAPs individuals es pot determinar la implicació dels diferents gèneres en la degradació dels HAPs.

que la diversitat de bacteris individuals era gran, la de gèneres va ser relativament baixa, el que ens va permetre relacionar gèneres determinats amb la degradació d'HAPs individuals. La figura 16 mostra l'evolució dels gèneres amb més activitat (ARN) al llarg de la incubació. La correlació del seu increment amb la disminució de determinats HAPs ens permeté, per exemple, deduir la participació dels gèneres *Sphingobium* i *Olivibacter* en la degradació de compostos d'alt i baix pes molecular. És important indicar que alguns dels bacteris més actius no s'havien cultivat mai i, per tant, només han estat detectats en utilitzar l'anàlisi molecular. Per últim, uns dels resultats més interessants va ser que els membres de *Mycobacterium*, un gènere que representava menys del 1% de la població total, era un dels més actius en la degradació d'HAPs d'elevat pes molecular, tal i com ho demostrava la identificació de metabòlits signatura, la quantificació específica del seu ARNr 16S per qPCR i l'evolució de les seves dioxigenases (no es mostren els resultats). Això demostra que els resultats derivats d'estudis moleculars únicament basats en l'anàlisi de l'ADN són esbiaixats. L'ADN és una molècula molt estable i, per tant, té una llarga vida en el medi ambient. Això fa que es puguin tenir en compte bacteris no viables, en estat de latèn-

cia o morts. D'aquí ve la importància d'analitzar també l'ARN, molècula molt més inestable, que permet identificar els microorganismes actius en un moment determinat.

En definitiva, les tècniques de seqüenciació massiva ens donen una informació global i exhaustiva de les poblacions implicades en els processos de biodegradació *in situ*. És imprescindible, però, el coneixement obtingut amb les tècniques de cultiu, que permeten disposar dels microorganismes clau per a la descripció de noves capacitats i posteriors aplicacions biotecnològiques. De fet, un altre focus de la nostra recerca actual és utilitzar les dades moleculars per dissenyar tècniques dirigides d'aïllament de nous bacteris no cultivats fins ara.

Bibliografia

- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Amann, R.I. i Ludwig, W. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59: 143-169.
- Atlas, R. i Philp, R.M. (2005) Bioremediation. ASM Press, Washington, D.C.
- European Commission (2007). Environment fact sheet: soil protection – A new policy for the EU (http://ec.europa.eu/environment/soil/pdf/factsheet_2007_en.pdf, accedit el 5 de febrer de 2016).
- Ortega-Calvo, J.J., Tejada-Agredano, M.C., Jimenez-Sanchez, C., Congiu, E., Sungthong, R., Niqui-Arroyo, J.L. i Cantos, M. (2013). Is it possible to increase bioavailability but not Environmental risk of PAHs in bioremediation? *Journal of Hazardous Materials*, 261: 733-745.
- Panagos, P., Van Liedekerke, M., Yigini, Y. i Montanarella, L. (2013). Contaminated Sites in Europe: Review of the Current Situation Based on Data Collected through a European Network. *Journal of Environmental and Public Health*, 2013: ID 158764, 11 pp. doi: 10.1155/2013/158764
- Van Liedekerke, M., Prokop, G., Rabl-Berger, S., Kibblewhite, M. i Louwagie, G. (2014). Progress in the management of Contaminated Sites in Europe, JRC Reference Reports, European Commission, Joint Research Centre, Luxembourg. (accedit el 5 de febrer de 2016). <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/11111/1/30755/1/lbna26376enn.pdf>
- Tauler, M. (2015). *Bacterial populations and functions driving the decontamination of polycyclic aromatic compounds polluted soils*. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona.
- Vila, J., Tauler, M., Grifoll, M., Nilsson, J., Mundó, B. (2013). Ensayos de tratabilidad para la bioremediación de suelos contaminados con HTF. *Productos Químicos*, Vol 2013: 52-57.
- Vila, J., Tauler, M., i Grifoll, M. (2015). Bacterial PAH degradation in marine and terrestrial habitats. *Current Opinion in Biotechnology*, 33: 95-102. doi: 10.1016/j.copbio.2015.01.006