



CONAMA10
CONGRESO NACIONAL
DEL MEDIO AMBIENTE

COMUNICACIÓN TÉCNICA

Biorremediación de pendimetalina en ensayos de microcosmos controlados

Autor: Paloma Pinilla Ponz

Institución: Colegio de Químicos

e-mail: paloma_pinilla@hispanista.com

Otros Autores: María José Martínez- Íñigo; Carmen Lobo (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario)

RESUMEN

El suelo es un elemento muy importante dentro de los ecosistemas. La introducción de agentes contaminantes puede tener como consecuencias daños a la estructura del suelo que suponen la pérdida de algunas funciones del mismo y la posible contaminación del agua. Asimismo, la acumulación de contaminantes en el suelo puede conllevar riesgos para la salud humana y los ecosistemas. Los herbicidas son compuestos químicos utilizados para combatir agentes que constituyen plagas. Un uso racional de los mismos no genera problemas; pero su utilización en altas dosis, su larga persistencia en el suelo en los casos en que su degradación sea difícil, su solubilidad en el agua y la toxicidad de muchos de estos compuestos, hacen que sean potenciales contaminantes del suelo. Se han estudiado y desarrollado multitud de formas para recuperar el suelo que conlleven la eliminación de los contaminantes o la disminución del riesgo de los mismos, todo ello con la finalidad de poder recuperar las funciones y usos del mismo. Las técnicas de biorremediación se basan en la degradación de los contaminantes por la acción de microorganismos. En ellas se potencia la biodegradación del contaminante mediante el aporte de nutrientes y oxígeno para estimular la actividad de los microorganismos. Se pueden utilizar los microorganismos del suelo (atenuación natural) o bien se inoculan cultivos de bacterias (bioaumentación). En ocasiones se emplean surfactantes que pueden ayudar a que el contaminante sea más disponible o pueden servir de co-metabolito. Asimismo, existe la posibilidad de inmovilizar a las bacterias en una amplia variedad de soportes que posibilitan el aumento de la viabilidad de las mismas y ayudan a que los microorganismos sean más resistentes a concentraciones mayores del contaminante que podrían resultarle tóxicas. Los objetivos principales de este trabajo fueron estudiar la atenuación natural de la pendimetalina, un herbicida, en el suelo y el desarrollo de distintos sistemas de biorremediación de suelos a los que se había aplicado este herbicida.

Palabras Clave: Contaminación, suelo, biorremediación, microorganismos, pendimetalina, atenuación-natural, bioestimulación, bioaumentación

1. EL PROBLEMA MEDIOAMBIENTAL DERIVADO DE LA CONTAMINACIÓN DEL SUELO

El suelo se define como la capa superior de la corteza terrestre, de constitución mineral y orgánica, diferenciado en capas llamadas horizontes, de profundidad variable y que se diferencia de la roca originaria en su composición química, física y mineralógica. Desempeña una serie de funciones esenciales en el medio ambiente tales como servir de soporte para la producción biomasa vegetal (pastos, bosques, cultivos) y ser el hábitat de muchos organismos. También ejerce diversas funciones ecológicas fundamentales ya que interviene en los ciclos biogeoquímicos, almacena nutrientes minerales, materia orgánica y agua, actúa de filtro natural de las aguas subterráneas ya que puede retener algunos contaminantes derivados de las actividades humanas, y es la fuente de diversas materias primas. Asimismo, sirve de base para muchas actividades humanas siendo un elemento del paisaje y patrimonio cultural.

El suelo es un elemento muy sensible del ecosistema y está sometido a multitud de amenazas que conllevan su degradación física, química y biológica. Entre estas amenazas se encontrarían la erosión o pérdida del suelo, la salinización (acumulación de sales más solubles que el yeso), la acidificación (descenso del pH del suelo) y la contaminación debida a la introducción de agentes tóxicos tales como metales pesados y compuestos orgánicos.

Los agentes contaminantes del suelo son principalmente de origen antropogénico y aparecen como residuos de las actividades humanas: industria, explotaciones mineras, ganaderas, agricultura, etc.

El suelo posee, por sí mismo, la capacidad de absorber, filtrar y transformar los contaminantes; es decir, tiene la capacidad de atenuar la contaminación de forma natural pero, la introducción de agentes contaminantes se puede producir en una concentración tal que supere esta capacidad amortiguadora; ésto provoca daños en el suelo, la pérdida de algunas funciones del mismo y la posible contaminación secundaria del agua. Asimismo, la acumulación de contaminantes en el suelo puede conllevar riesgos para la salud humana al contaminarse los alimentos y el agua de bebida y/o riesgos para los ecosistemas al perder el suelo sus funciones.

La multitud de amenazas a las que está sometido el suelo hace que sea muy importante el realizar labores para su conservación y para ello es fundamental el

desarrollo de técnicas de descontaminación que nos permitan recuperar las funciones y usos del mismo.

2. LA BIORREMEDIACIÓN.

Las técnicas de biorremediación son técnicas biológicas de descontaminación del suelo que se basan en el empleo de microorganismos para degradar o transformar, total o parcialmente, los contaminantes al utilizarlos como fuente de carbono o aceptores de electrones en su crecimiento.

Básicamente, los microorganismos actúan en la degradación de los contaminantes orgánicos según dos mecanismos:

- La respiración anaerobia donde los compuestos son degradados completamente pero se utilizan otros compuestos distintos del oxígeno como aceptores finales de electrones. La fermentación también es un proceso en medio anaerobio pero el producto final no está completamente degradado. La fermentación es muy importante porque, en algunos casos, los productos intermedios de degradación de algunos compuestos son más tóxicos que el producto original.
- La respiración aerobia consigue la descomposición completa de los compuestos hasta llevarlos a CO_2 y H_2O en presencia de oxígeno.

Asimismo, los microorganismos pueden utilizar algunos componentes celulares, como la pared celular, para la inmovilización de contaminantes, esta modalidad recibe el nombre de biosorción. Otra forma de utilizar microorganismos para la degradación de contaminantes es emplear las enzimas libres sintetizadas por algunos de ellos añadiéndolas al suelo que se quiera descontaminar (Nannipieri y Bollag, 1991).

También se pueden eliminar contaminantes de forma indirecta con la ayuda de microorganismos ya que éstos pueden producir cambios en su estado de tal forma que los contaminantes sean volatilizados o más fácilmente lixiviables.

Existen dos maneras de aumentar la eficacia de la biorremediación, para ello se recurre a la bioestimulación y a la bioaumentación.

En la bioestimulación o biorremediación estimulada se actúan sobre las condiciones ambientales en las que se encuentran los microorganismos. Para ello se aportan nutrientes, iones, fuentes de carbono sencillas como la glucosa y/u oxígeno con lo que se potencia la biodegradación del contaminante y el mayor desarrollo de microorganismos.

En multitud de ensayos de biorremediación es necesaria la presencia de otro compuesto para que pueda llevarse a cabo la degradación total del contaminante. Este compuesto recibe el nombre de cosustrato y su finalidad es la de activar el desarrollo de los microorganismos y favorecer el mantenimiento de su población. (De la Torre, 1998).

En otras ocasiones, es necesaria la adición de un surfactante que facilite y mejore la biodisponibilidad del compuesto que se quiere degradar. Los surfactantes son moléculas conocidas por poseer superficies activas con características polares y no polares. Son capaces de permanecer en solución a altas concentraciones ya que se orientan a sí mismos en agregados llamados micelas. Los surfactantes son utilizados para solubilizar en agua productos poco solubles; este fenómeno es conocido como solubilización micelar (Nassetta et al., 1991).

Cuando se pretende utilizar un agente surfactante para aumentar la solubilidad del contaminante es necesario comprobar la toxicidad del mismo para los microorganismos con capacidad degradativa. Además, no todos los surfactantes pueden ser utilizados ya que algunos de ellos resultan muy tóxicos en el medio ambiente.

Actualmente, se está investigando en la producción de biosurfactantes tales como polisacáridos, glicolípidos, fosfolípidos, etc. para su utilización en la biorremediación. Estos biosurfactantes son más ventajosos frente a compuestos sintéticos ya que son totalmente biodegradables. Además, si las bacterias utilizadas en la degradación de compuestos presentaran, a su vez, esta ventaja de producir surfactantes, la biodegradación se llevaría a cabo de forma más rápida y eficaz (Morán et al., 2000; Banat et al., 2000).

Existen multitud de procesos o variantes de aplicación de la bioestimulación. Entre ellos se pueden distinguir:

- Landfarming o laboreo: esta técnica se puede aplicar tanto “ex situ” como “in situ”. En el laboreo las capas de suelo son aireadas mediante volteo e irrigadas con nutrientes a fin de favorecer la acción de degradación de los microorganismos. Este tratamiento es adecuado para contaminaciones bastante superficiales y de amplia extensión porque supone una técnica barata. Si se aplica “in situ”, implica la monitorización constante de la

zona para comprobar la reducción de los contaminantes y derivados tóxicos que se puedan producir. Cuando es aplicada “ex situ”, el suelo debe ser excavado y tratado extensivamente en campos abiertos donde los lixiviados resultantes son filtrados o recogidos; supone la preparación e impermeabilización del terreno donde se vaya a proceder a la descontaminación y el tratamiento de los lixiviados.

- **Composting o compostaje:** se aplican procesos muy similares a los que se utilizan para los residuos urbanos, lodos de depuradora, restos de podas, etc. Se diferencia del “Landfarmig” en que se produce un autocalentamiento durante el proceso. En el compostaje el suelo es excavado y apilado en montículos donde se produce degradación aerobia. Estos montículos son volteados cada cierto tiempo para homogeneizar el material y controlar la temperatura. Se puede aplicar “ex situ” u “on site”.
- **Biopilas:** el suelo es excavado y dispuesto en unos montículos o pilas y se estimula la actividad microbiológica aerobia mediante la aireación o ventilación del suelo por medio de tuberías. También se adicionan nutrientes y humedad. Simplemente se diferencia del compostaje en que se controla mejor el tamaño de los montículos, la temperatura y en que no es necesario que la pila se voltee. Se puede aplicar “ex situ” u “on site”.
- Cuando se combina la ventilación mecánica con la biorremediación la técnica recibe el nombre de bioaireación, bioventilación o bioventing y consiste en inyectar aire u oxígeno a través de los pozos por encima de la capa freática para así favorecer la degradación biológica de los compuestos.
- **Tratamiento en biorreactores:** la biodegradación de los contaminantes del suelo es llevada a cabo en un reactor, lo que supone controlar mejor las condiciones de degradación (la temperatura, la mezcla, la carga del inóculo). El suelo es mezclado con agua para conseguir un fango que es introducido en el reactor. Posteriormente, el suelo es deshidratado y las aguas deben ser tratadas de forma adecuada. Se puede combinar con otras técnicas, como por ejemplo, el lavado. Esta técnica tiene una amplia aplicación en el tratamiento de policlorobifenilos y otros contaminantes muy persistentes ya que se pueden combinar ciclos anaerobio-aerobio; asimismo, al controlar mejor las condiciones de degradación, se disminuyen mucho los tiempos de tratamiento. Sin embargo, conlleva la excavación del terreno, un pretratamiento previo del suelo en el que hay que separar las fracciones más gruesas, el secado posterior del suelo y el tratamiento de las aguas residuales generadas.

La bioaumentación o biorremediación aumentada es otra forma de aumentar la eficacia de la biorremediación. En ella se inoculan en el suelo microorganismos que poseen capacidad para degradar los contaminantes.

Existen dos formas de incrementar la concentración de microorganismos degradadores en el medio: la primera sería la extracción desde el suelo de las poblaciones indígenas, su cultivo externo y posterior sembrado de los organismos degradadores otra vez en el suelo contaminado; la segunda consistiría en la utilización de cultivos exógenos (preparados comercialmente) u organismos modificados genéticamente que han sido cultivados de forma externa.

Cuando se introducen microorganismos degradadores en el suelo, se pueden producir limitaciones que impiden el crecimiento y/o la actividad del organismo introducido (Lin et al., 1995). Estas limitaciones se generan por la competencia con los microorganismos autóctonos, porque los organismos introducidos tengan poco poder para sobrevivir o por la depredación de protozoos presentes en el suelo. Para evitar estas limitaciones se han desarrollado técnicas para inmovilizar las células de tal forma que el inóculo sea viable en el medio por más tiempo. Los objetivos principales de la inmovilización de las bacterias son reducir la competencia de los microorganismos autóctonos y permitir una mejor expresión de la función metabólica introducida.

Otra forma de aplicación de la bioaumentación se basa en la utilización de los denominados “suelos activos” que consisten en consorcios de microorganismos adsorbidos sobre partículas de suelo y “aclimatados” al contaminante. Este “suelo activo” es aplicado y, posteriormente, mezclado con el suelo contaminado para actuar a modo de cebador o prolongador de la descontaminación. Con este método, las partículas del suelo actúan como soporte para el crecimiento de los microorganismos y como fuente de nutrientes. Además, al adsorber los contaminantes, las partículas del suelo consiguen disminuir la toxicidad del contaminante en solución. (Barbeau et al., 1997).

La bioaumentación puede ser aplicada conjuntamente con la bioestimulación en los tratamientos en reactores, laboreo, etc.

2.1. Ventajas e inconvenientes de la biorremediación.

Los contaminantes susceptibles de ser tratados mediante técnicas de biorremediación son muchos plaguicidas, gasóleo, gasolina, aceites y ciertos compuestos orgánicos halogenados. Estas técnicas biológicas no pueden ser utilizadas en el caso de presencia de plaguicidas organometálicos que contengan metales tóxicos porque, al degradarse la parte orgánica, se deja libre el metal pesado.

Pueden ser aplicadas “in situ” o “ex situ” mediante el empleo de un reactor que a la vez permite utilizar medio aerobio, anaerobio o ciclos de ambos.

Los costes de la biorremediación intrínseca o atenuación natural son inferiores a los de la mayoría de los tratamientos (Kaifer et al, 2004) y están asociados a la modelización de

las tasas de degradación en el estudio de viabilidad, así como a los de control y seguimiento mediante muestreos y análisis periódicos para comprobar la evolución espacial y temporal de la contaminación.

El tratamiento mediante compostaje, el landfarming aplicado “ex situ” y las biopilas requieren la excavación del suelo y su traslado a la zona donde se vaya a realizar el tratamiento. Estos tratamientos requieren, por lo tanto, amplias áreas de terreno donde depositar el suelo contaminado. El coste de estas tecnologías depende del volumen de suelo excavado, de la concentración residual del contaminante que se quiera alcanzar y, de la persistencia del mismo ya que, cuanto más persistente, más tiempo dura el tratamiento. Asimismo, en presencia significativa de compuestos volátiles, las emisiones de éstos a la atmósfera sin depuración previa pueden representar un impacto no despreciable que hay que tener en cuenta. Una ventaja muy significativa de estos tratamientos biológicos frente a otros tratamientos de descontaminación es que, aunque se destruye la estructura del suelo al ser excavado, el suelo final sigue siendo útil para la agricultura ya que se le han añadido nutrientes durante el proceso, por lo que puede volver a ser depositado en su lugar original. No ocurre lo mismo, por ejemplo, en los tratamientos térmicos, donde el suelo queda completamente inservible.

Las técnicas de biorremediación como la bioaumentación y la bioestimulación son aplicables en zonas amplias de terreno y no requieren que el suelo presente unas características especiales como en otros tratamientos de descontaminación.

El impacto ambiental de las técnicas de biorremediación es muy reducido ya que no se introducen productos que puedan resultar potencialmente contaminantes ni suelen conllevar costosos trabajos de ingeniería, al contrario que ocurre en otras técnicas de descontaminación de suelos.

Si la ruta metabólica de degradación es completa, los productos finales en la biorremediación son CO_2 y H_2O , por lo que no se generan residuos finales peligrosos. En el caso de que la ruta metabólica no sea completa, pueden utilizarse asociaciones de microorganismos que la lleven a cabo completamente, es el caso de los PCB's que, de forma anaerobia son deshalogenados y, aeróbicamente se degradan hasta el final; por eso se utilizan ciclos anaerobios-aerobios para tratar suelos contaminados con estos productos.

Asimismo, pueden emplearse una amplia variedad de microorganismos degradadores (bacterias u hongos).

En la actualidad, las técnicas biológicas son las que están alcanzando mayores avances, ya que existe un campo muy amplio de experimentación si se considera la manipulación genética de los organismos.

La denominada biorremediación asistida se beneficia de las interacciones planta-microorganismo en la zona de la rizosfera. Las raíces de las plantas pueden generar un ambiente propicio para el desarrollo de las bacterias degradadoras ya que facilitan la aireación, suministran oxígeno y liberan exudados que puedan ser utilizados como fuentes de carbono sencillas o facilitar la biodisponibilidad de los contaminantes (Martínez-Íñigo, 2007). En multitud de ocasiones las bacterias y hongos asociadas a las micorrizas de las plantas son las que llevan a cabo todo el proceso de descontaminación.

Otra vía de experimentación se encuentra en las bacterias endofíticas. Estas bacterias residen en simbiosis dentro la planta contribuyendo, por lo general, al crecimiento vegetal mediante la fijación de N_2 , liberando antibióticos, etc. La utilización de bacterias modificadas genéticamente que degraden contaminantes y que sean capaces de colonizar el xilema de las plantas aumentaría las vías de degradación.

3. LA PENDIMETALINA: UN CONTAMINANTE DE SUELOS AGRÍCOLAS.

La pendimetalina [N-(1-etilpropinil)-2,6-dinitro-3,4-xilidina] es un herbicida que pertenece a la familia de las dinitroanilinas. Estos herbicidas actúan sobre la división celular y su acción se produce impidiendo la formación de microtúbulos durante la división mitótica de las células.

Los productos fitosanitarios que contienen pendimetalina se emplean en tratamientos de pre-plantación incorporada, en pre-emergencia y en post-emergencia temprana en cultivos de algodón, soja, maíz, trigo, cebada y girasol. Su uso también se ha extendido a los viveros de plantas ornamentales, a los usos domésticos (Lemmon et al., 1992) y a los campos de golf (Starret et al., 1996).

La pendimetalina es muy persistente en el medio debido a sus propiedades físicas y químicas. Presenta una solubilidad en agua muy baja (0,03 mg/L) y una presión de vapor relativamente alta ($9,4 \cdot 10^{-6}$ mm Hg), lo que hace que sea poco volátil. Su persistencia en el medio depende de la formulación del compuesto activo (características del producto utilizado) y de su forma de aplicación. Asimismo, la persistencia del herbicida depende de las condiciones ambientales: características del suelo, humedad, temperatura, etc.

Está clasificada por la EPA como un compuesto de toxicidad clase III (moderadamente tóxico) y lo señala como un posible cancerígeno humano incluyéndolo en la lista de Persistent Bioaccumulative and Toxic Chemical. Por ello, la EPA decidió controlar su volumen de utilización y el manejo de sus residuos incluyendo a la pendimetalina en el denominado Toxic Release Inventory.

Dentro de la Unión Europea se ha llegado a definir, por algunos autores, como contaminante prioritario de las aguas y del suelo (Eriksson et al., 2007).

4. ENSAYOS DE BIORREMEDIACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO CON PENDIMETALINA

Los objetivos principales de este trabajo fueron estudiar la atenuación natural de la pendimetalina en el suelo y el desarrollo de distintos sistemas de biorremediación de suelos a los que se había aplicado este herbicida.

El primer paso que se realizó fue aislar e identificar una cepa bacteriana con capacidad degradativa para la pendimetalina. Posteriormente, se desarrollaron distintos ensayos a escala de laboratorio para ensayar distintas técnicas.

Para el aislamiento de la cepa con capacidad degradativa se utilizó un suelo de vivero que presentaba antecedentes de contaminación con pendimetalina. En este suelo se había comprobado, mediante ensayos previos, que el herbicida desaparecía con el tiempo, por lo que podía haber microorganismos que se hubieran adaptado a utilizar la pendimetalina como fuente de carbono.

De este suelo se consiguió aislar una cepa bacteriana (denominada VSE) que era capaz de metabolizar la pendimetalina cuando se la disponía en un medio que contaba con este herbicida como única fuente de carbono; por lo tanto, esta cepa bacteriana obtenía con la pendimetalina la energía necesaria para el crecimiento de su población.

Esta cepa fue caracterizada como una *Pseudomonas fluorescens* mediante pruebas bioquímicas y genotípicas.

Se llevaron a cabo distintas pruebas con la cepa VSE con la finalidad de conocer el potencial de la misma para ser utilizada en ensayos de biorremediación.

La primera prueba consistió en comprobar si el surfactante que posteriormente iba a ser utilizado en los ensayos de biorremediación resultaba tóxico para ella. La cepa VSE fue capaz de crecer en placas preparadas con distintas concentraciones de sorbitan trioleato, lo que demostraba que éste no resultaba tóxico ya que la cepa era capaz de degradarlo.

Las siguientes pruebas estuvieron encaminadas a comprobar si la pendimetalina resultaba un compuesto quimioattractante para nuestra cepa VSE.

La quimiotaxis es una propiedad que poseen determinados microorganismos para moverse bajo la influencia de un gradiente químico; este gradiente ayuda a la bacteria a encontrar las condiciones óptimas para su crecimiento y supervivencia. Algunos microorganismos presentan esta propiedad hacia diferentes compuestos xenobióticos; en ocasiones, estos compuestos les sirven como fuente de carbono y energía por lo que este compuesto resultaría quimioattractante; las células móviles emigrarían activamente hacia la fuente de alimento (Grimm and Harwood, 1997; Hawkins and Harwood, 2002).

La quimiotaxis es una propiedad muy interesante y beneficiosa en los ensayos de biorremediación ya que implica que la cepa bacteriana podría moverse en busca del contaminante, en matrices como el suelo donde los microorganismos y el contaminante no están distribuidos homogéneamente y pueden no coincidir espacialmente. La cepa bacteriana se desplazaría a medida que fuera metabolizando la pendimetalina, por lo tanto, este proceso aceleraría la degradación de la pendimetalina.

La pendimetalina resultó ser un compuesto quimioattractante (+) para la cepa VSE. Gracias a esta propiedad, la cepa VSE puede detectar y responder a bajas concentraciones de contaminante en el ambiente (Grimm and Harwood, 1997).

Para los ensayos de descontaminación de pendimetalina, a escala de laboratorio, se emplearon muestras de suelos que nunca habían estado expuestos al herbicida procedentes de la finca de “El Encín”, perteneciente al Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA). Estos suelos fueron contaminados artificialmente en los distintos ensayos.

Los ensayos de biorremediación fueron diseñados a escala de microcosmos y se llevaron a cabo en una cámara de incubación con una temperatura y humedad fijas. En ellos, el suelo recibió distintos tratamientos:

- Atenuación natural: en este caso solo se controlaron la humedad y la temperatura durante el ensayo.
- Bioestimulación de la atenuación natural mediante la adicción de un surfactante al suelo. Se selecciona el sorbitan trioleato (ST) por no resultar tóxico para la cepa VSE y por ser un surfactante que tampoco presenta riesgo para el medio ambiente o la salud humana. Además de haberse comprobado durante la preparación del inóculo para la bioaumentación que la cepa lo utiliza también como sustrato.
- Bioestimulación combinada con bioaumentación. Al suelo se le añade surfactante y recibe una sola carga inicial de inóculo de la cepa VSE.
- Bioestimulación combinada con bioaumentación continuada a lo largo del ensayo. El suelo recibe surfactante y es inoculado sucesivas veces con la cepa VSE a lo largo del período ensayado. La frecuencia de inoculación es de 3 ó 4 días.
- Bioestimulación combinada con bioaumentación. El suelo recibe surfactante y la cepa VSE inmovilizada sobre el soporte inerte que es la zeolita. La carga de inóculo resulta menor que en los otros tratamientos pero se espera una mayor viabilidad del mismo como resultado de la inmovilización. El proceso de bioadsorción observado en un medio líquido, también se podría producir cuando la zeolita con células inmovilizadas es introducida en el suelo en los ensayos de bioaumentación. No obstante, la zeolita en una matriz distinta como el suelo puede presentar distintas propiedades de adsorción de la pendimetalina por lo

que los resultados de la biodegradación podrían ser malinterpretados. Para ello, el diseño de los microcosmos incluye el tratamiento que se explica a continuación. De esta forma, nos aseguramos que los resultados no sean sobreestimados.

- Bioestimulación consistente en añadir surfactante al suelo y zeolita estéril sin inocular. Se considera que la zeolita puede ejercer dos posibles efectos: mejorar la aireación del suelo y adsorber la pendimetalina.

Los resultados de la cinética de degradación de pendimetalina en el suelo se pueden ver en la figura nº 1 y en la tabla nº 1. Todos los tratamientos se ajustan a un modelo cinético de degradación exponencial de primer orden, del tipo $C = C_0 e^{-kt}$. Donde:

- C es la concentración en un tiempo dado (t).
- C_0 es la concentración inicial en el suelo.
- K (d^{-1}) es la constante de degradación.
- El coeficiente de determinación (r^2) da una idea de la bondad del ajuste de los datos al modelo. Cuanto más próximo se encuentre este valor a 1, mejor será el ajuste.
- El tiempo de vida medio de la pendimetalina en el suelo (TD_{50}) es un parámetro que se calcula a partir del ajuste a la función exponencial.

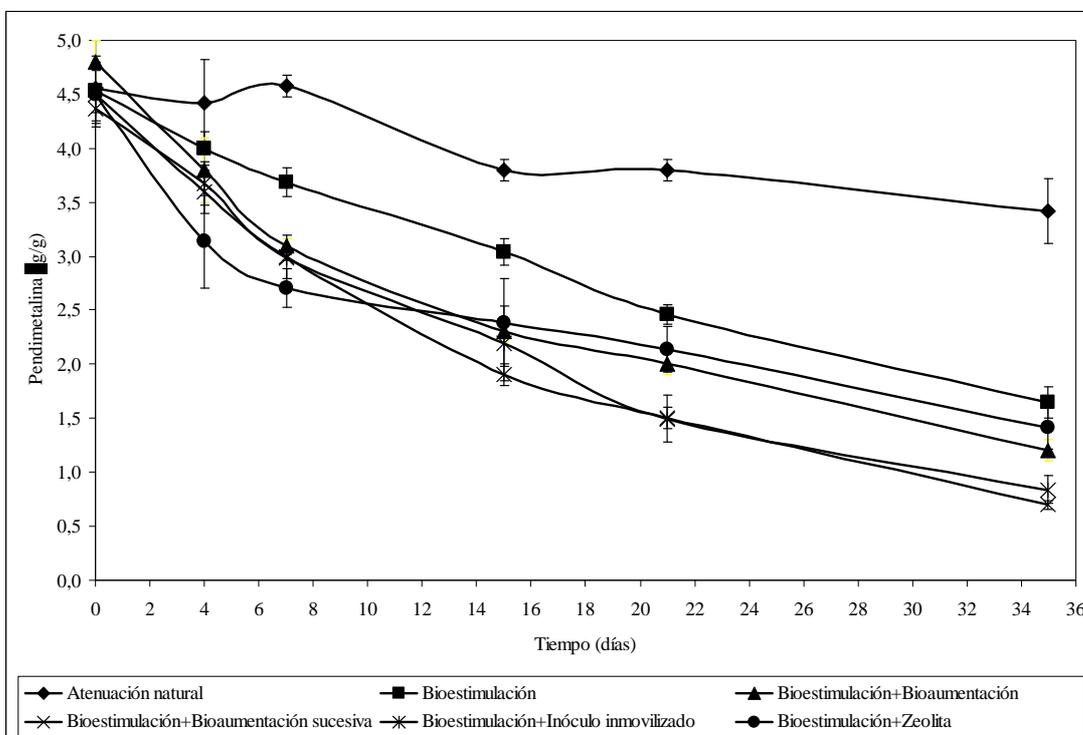


Figura nº 1. Degradación de la pendimetalina en el suelo ensayado con distintos tratamientos de biorremediación.

Tratamiento	C ₀ (µg/g)	K (d ⁻¹)	TD ₅₀	r ²	Pendimetalina en el suelo al finalizar el ensayo (%)
Atenuación natural	4,60	0,0089	78	0,904	>75
Bioestimulación:+ST	4,53	0,0287	24	0,998	36
Bioestimulación + inoculación	4,38	0,0345	20	0,988	31
Bioestimulación + sucesivas inoculaciones	4,41	0,0527	13	0,998	16
Bioestimulación + VSE inmovilizada	4,33	0,0476	15	0,996	18
Bioestimulación + Zeolita sin inocular	4,55	0,0289	24	0,926	31

Tabla nº 1. Parámetros de cinética de primer orden.

La pendimetalina en el suelo utilizado, y bajo las condiciones de temperatura y humedad establecidas en el ensayo, presenta un TD₅₀ de 78 d. Al finalizar el ensayo, que duró 35 días, casi no se ha degradado la pendimetalina. En condiciones reales la pendimetalina puede llegar a presentar un TD₅₀ muy superior al de estos ensayos (Martínez, 1996).

En todos los demás tratamientos el TD₅₀ disminuye drásticamente.

La atenuación natural de la pendimetalina en el suelo se estimula significativamente mediante la adicción del sorbitan trioleato. Éste ayuda a la movilización del herbicida adsorbido en las partículas del suelo y la pendimetalina emulsionada se dispersa en la solución acuosa del suelo. El incremento de la biodisponibilidad del herbicida resulta en una mayor degradación del compuesto por los microorganismos nativos presentes en el suelo. Sin embargo, la concentración final de pendimetalina en el suelo sigue siendo de un 30%. De todos modos, estos resultados ponen de manifiesto que el sorbitan trioleato es un surfactante muy útil para ser utilizado en ensayos de biorremediación

La estimulación de la atenuación natural mediante el tratamiento del suelo con el surfactante ST y el tratamiento que además recibió la zeolita estéril consiguen los mismos valores para los parámetros de la cinética de degradación. Por lo tanto, con la simple adicción de zeolita no se aprecian efectos sobre la degradación de la pendimetalina. Al finalizar el ensayo, se midió la cantidad de pendimetalina adsorbida a la zeolita y resultó prácticamente despreciable (datos no mostrados).

La zeolita puede ser añadida al suelo para permitir una mejor aireación del mismo al aumentar la porosidad y, por lo tanto, mejorar la degradación del herbicida; sin embargo, todos los microcosmos ensayados eran volteados diariamente para asegurar la aireación de los mismos por lo que la adicción de zeolita no mejora las condiciones visiblemente.

Una simple inoculación con la cepa VSE al principio del ensayo hace disminuir el valor de TD₅₀ desde 78 d a 20 d. La concentración final de pendimetalina en el suelo

también es de un 31%, muy similar a los tratamientos explicados en los párrafos anteriores.

La bioestimulación junto con la bioaumentación debería aumentar las tasas de degradación del herbicida. Sin embargo, al inocular el suelo con la cepa VSE en una única carga no se produce ningún cambio importante en los parámetros de la degradación. La cepa VSE había sido puesta a incubar previamente en un medio líquido basal con pendimetalina y ST con la finalidad de asegurar un inóculo activo metabólicamente a largo plazo. Por lo tanto, la inoculación falla completamente en el suelo. La principal causa que señalan Ramadan *et al.*, 1990 para la inactivación del inóculo es la carga de microorganismos que aportas al suelo. Si la carga de inóculo es pequeña, puede conllevar que los microorganismos introducidos no sean capaces de competir con las bacterias indígenas del suelo. Sin embargo, al inocular una vez se consiguen cargas mayores que con la cepa VSE inmovilizada sobre zeolita; por lo tanto, aunque la carga sea mayor, la viabilidad de las mismas es menor.

Goldstein *et al.*, 1985 exponen, además, otras posibles razones para la inactivación del inóculo, entre las que se encuentran:

- La concentración del compuesto contaminante es demasiado baja para soportar el crecimiento de las células inoculadas.
- El medio puede contener sustancias que inhiban el crecimiento o la actividad de los microorganismos añadidos.
- Los microorganismos introducidos utilizan otras fuentes de carbono en el ambiente distintas al contaminante.
- El grado de crecimiento del inóculo introducido es muy bajo en comparación con, por ejemplo, la predación por protozoos.
- Los microorganismos introducidos no pueden moverse a través de los poros del suelo hacia los sitios que contienen los contaminantes.

La cepa VSE sí es capaz de moverse a través del suelo ya que la pendimetalina resulta quimioattractante para ella por lo que, aunque existieran bajas concentraciones del compuesto, ésta sería capaz de desplazarse hacia la pendimetalina. Podrían estar produciéndose cualquiera de las otras opciones: que existan sustancias en el suelo que inhiban el crecimiento, que el grado de crecimiento de la cepa VSE sea bajo o, que los microorganismos están utilizando otras fuentes de carbono presentes en el ambiente y por eso no se aprecia degradación del herbicida.

La limitada viabilidad de la cepa VSE es combatida con la renovación del inóculo cada 3-4 días. Estos resultados indican que las repetidas inoculaciones deben asegurar el mantener constante la cantidad de inóculo viable y metabólicamente activo. La bioestimulación combinada con la bioaumentación repetida es el tratamiento que consigue disminuir más el TD₅₀ hasta 13 días; después de 35 días, solo permanece un 16% de pendimetalina remanente.

La inmovilización de las bacterias sobre la zeolita consigue resultados similares a la bioestimulación con sucesivas inoculaciones a pesar de que la carga de inóculo inicial es menor, incluso siendo cargas de inóculo inmovilizado inferiores a los conseguidos por otros autores. Este hecho sugiere el aumento de la supervivencia del inóculo inmovilizado y su mejor adaptación a las condiciones naturales del suelo, ya que equivale a mantener renovado el inóculo de células libres en sucesivas inoculaciones.

5. CONCLUSIONES.

La biorremediación ha sido una técnica ampliamente utilizada para descontaminar suelos. Se ha aplicado, sobre todo, en vertidos de petróleo y sus derivados. También ha sido empleada para descontaminar suelos con plaguicidas: DDT, Lindano y otros.

Con este trabajo se ha pretendido demostrar su eficacia para descontaminar suelos con pendimetalina, un contaminante emergente.

La biorremediación es una técnica sencilla, barata y que no requiere grandes trabajos de ingeniería. Se trata, por lo tanto, de una buena alternativa a utilizar en problemas de contaminación de suelos.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S., 2000. *Potential commercial applications of microbial surfactants*. Appl Microbiol Biotech 53, 495-508.
- Barbeau, C.; Deschenes, L.; Karamanev, D.; Comeau, Y. and Samson, S. *Bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil*. Appl. Environ. Microbiol. (1997) Vol. 48, pp. 745-752.
- De la Torre, A. *La atenuación natural: una técnica alternativa para la descontaminación de suelos*. En "Terceras Jornadas sobre Suelos Contaminados". Series monográficas del Ministerio de Medio Ambiente (1998) pp. 177-197.
- Eriksson, E.; Baun, A.; Scholes, L.; Ledu, A; Ahlman, S.; Revitt, M.; Noutsopoulos, C. and Mikkelsen, P. S. *Selected stormwater priority pollutants – a European perspective*. Sci. Total Environ. (2007) Vol. 383, pp. 41-51.
- Goldstein, R. M.; Mallory, L. M. and Alexander, M. *Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation*. Appl. Environ. Microbiol. (1985) Vol. 50, nº 4, pp. 977-983.
- Grimm, A. and Harwood, C. *Chemotaxis of Pseudomonas spp. to the Polyaromatic Hydrocarbon Naphthalene*. Appl. Environ. Microbiol. (1997) Vol. 63, nº 10, pp.4111-4115.
- Hawkins, A. C. and Harwood, C. *Chemotaxis of Ralstonia eutropha JMP134(pJP4) to the herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetate*. Appl. Environ. Microbiol. (2002) Vol. 68, nº 2, pp. 968-972.
- Kaifer, M. J.; Aguilar, A.; Arana, E.; Balseiro, C.; Torá, I.; Caleyá, J. M. and Pijls, C. "Guía de Tecnologías de Recuperación de Suelos Contaminados". Plan Regional de Actuaciones en Materia de Suelos Contaminados de la Comunidad

de Madrid (2001-2006). Consejería de Medio Ambiente, Comunidad de Madrid. Dirección General de Promoción y Disciplina Ambiental, Madrid, 2004, 175 páginas.

- Lemmon, C. R. and Pylypiw, H. M. *Degradation of Diazon, Chlorpyrifos, Isofenphos and Pendimethalin in Grass and Compost*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. (1992) Vol. 48, nº 3, pp. 409-415.
- Lin, J. E.; Lantz, S.; Schultz, W. W.; Mueller, J. G. and Pritchard, P. H. *Use of Microbial Encapsulation/Immobilization for Biodegradation of PAHs*. En "Bioaugmentation for Site Remediation" Third International In Situ and On-Site Bioreclamation Symposium. Battelle Press, Columbus (Ohio-USA), 1995, pp. 211-228.
- Martínez, L. *Estudio del comportamiento en el medioambiente de los herbicidas empleados en el maíz*. Tesis doctoral de la Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 1996.
- Martínez-Íñigo, M. J. *Biorremediación aplicada a suelos contaminados por plaguicidas*. En "Contaminación de suelos. Tecnologías para su recuperación". Serie Ponencias. Ed. CIEMAT, Madrid, 2007, pp. 441-449.
- Morán, A.C., Oliveira, N., Commendatore, M., Esteves, J.L., Siñeriz, F., 2000. *Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a surfactant from Bacillus subtilis O9*. Biodegradation 11, 65-71.
- Nannipieri, P. and Bollag, J. M. *Use of enzymes to detoxify pesticide-contaminated soils and waters*. J. Environ. Qual. (1991) Vol. 20, nº 3, pp. 510-517.
- Nassetta, M. M.; Remedi, V.; de Rossi, R. H. *Effect of Surfactants on the Solubility of Herbicides*. J. Agric. Food Chem. (1991) Vol. 39, nº 6, pp. 1175-1178.
- Ramadan, M.; El-Tayeb, O. M. and Alexander, M. *Inoculum size as a factor limiting the success of inoculation for biodegradation*". Appl. Environ. Microbiol. (1990) Vol. 56, nº 5, pp. 1392-1396.
- Starrett, S. K.; Christians, N. E. and Austin, T. Al. *Movement of Pesticides under Two Irrigation Regimes Applied to Turfgrass*. J. Environ. Qual. (1996) Vol.25, nº 3, pp. 566-571.