

# Biorremediación de los Recursos Naturales

Lucrecia Brutti - Marcelo Beltrán - Inés García de Salamone



# **Biorremediación de los Recursos Naturales**

Editores: Lucrecia Brutti – Marcelo Beltrán – Inés García de Salamone



**Ministerio de Agroindustria  
Presidencia de la Nación**

HURLINGHAM, BUENOS AIRES

2018

Biorremediación de los recursos naturales

Editores: Lucrecia Brutti – Marcelo Beltrán – Inés García de Salamone

1a. edición

Ediciones INTA

Instituto de Suelos, Centro de Investigación de Recursos Naturales

Hurlingham, Buenos Aires

2018

Biorremediación de los recursos naturales / Lucrecia Brutti... [et al.] ; compilado por Lucrecia Brutti ; Marcelo Beltrán ; García de Salamone, Inés. - 1a ed. - Buenos Aires: Ediciones INTA, 2018.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-521-911-3

1. Recursos Naturales. 2. Suelos. 3. Agua. I. Brutti, Lucrecia II. Brutti, Lucrecia, comp. III. Beltrán, Marcelo, comp. IV. García de Salamone, Inés, , comp.

CDD 333.7

© 2018, Ediciones INTA

Libro de edición argentina

Todos los derechos reservados. No se permite la reproducción total o parcial, la distribución o la transformación de este libro, en ninguna forma o medio. Ni el ejercicio de otras facultades reservadas sin el permiso previo y escrito del editor. Su infracción está penada por las leyes vigentes.

**AUTORIDADES DE INTA**

**Presidente:** Juan BALBÍN

**Vicepresidente:** Mariano Miguel BOSCH

**Director Nacional:** Héctor ESPINA

**Ministro de Agroindustria:** Luis Miguel Etchevehere

**Director del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales:** Pablo  
MERCURI

**Director del Instituto de Suelos:** Miguel TABOADA

## **AGRADECIMIENTOS**

Los compiladores agradecen a las instituciones por su amplia colaboración tanto a la FAUBA (Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires) como al INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) y a los autores de cada capítulo por la dedicación y confianza.

A María del Carmen Sánches de la Gerencia de Gestión de la Información – INTA

A Laura Lima de la Gerencia de Comunicación e Imagen Institucional - INTA

A Valeria Guerra, Comunicadora del Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRN) – INTA

A Guillermo Schulz del Instituto de Suelos, por el diseño de la tapa y contratapa

A Susana Russo y Juan Carlos de La Fuente, por el diseño de gráficos y tablas

*“Todo lo que puedas imaginar es real”  
Pablo Picasso*

## Prólogo

El Primer Taller Internacional de Biorremediación 2013 (PRITIBIO) fue realizado entre la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCYT) y el Instituto de Suelos del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Castelar.

A partir de la realización de este taller surgió la idea de publicar parte de la información presentada agregándole distintos aportes de otros investigadores que no participaron de este.

Esta publicación une trabajos realizados en el país y en el extranjero, referidos a la biorremediación de los recursos naturales. Cada investigador que aquí participa tiene en su desarrollo profesional varias publicaciones del tema por haberlo trabajado durante años.

Es del sentir de estos autores el saberse útil a los principios de la sustentabilidad ambiental y de la producción, atendiendo a los requisitos propios de cada recurso permitiendo el uso de este sin perturbar el ambiente.

Los países agroexportadores y aquellos que explotan la generosa naturaleza que el planeta les ofrece en su lugar tienen la responsabilidad de manejar la situación con equilibrio energético y balance de recursos adecuado para el presente y el futuro de las generaciones venideras.

El manejo sustentable del recurso incluye las metodologías para no extinguirlo y para que el proceso atinente no contamine el sitio de la explotación y menos aún el entorno cercano.

Los conceptos aquí vertidos quedan bajo la responsabilidad de los autores.

## Índice

Introducción.....	8
Summary.....	10
<b>CAPÍTULO 1</b>	
El suelo como recurso natural. ¿En qué marco se inserta la biorremediación?.....	12
<b>CAPÍTULO 2</b>	
Actinobacterias: su potencial para remover y degradar plaguicidas.....	32
<b>CAPÍTULO 3</b>	
Biobeds – Una contribución sueca para la minimización de la contaminación por el uso de plaguicidas.....	53
<b>CAPÍTULO 4</b>	
Contaminación del aire y su efecto en plantas y suelo, descontaminación y restauración.....	68
<b>CAPÍTULO 5</b>	
Propuesta de remediación con revegetación en área alterada por la actividad petrolera: desfiladero bayo, rincón de los sauces.....	85
<b>CAPÍTULO 6</b>	
Ecología microbiana de la rizósfera de ryegrass utilizado para fitorremediar suelo contaminados con PAHs.....	96
<b>CAPÍTULO 7</b>	
Electrobiorremediación de hidrocarburos en suelos insaturados de la Patagonia argentina.....	118
<b>CAPÍTULO 8</b>	
La biorremediación aplicada a la rehabilitación de suelos contaminados con hidrocarburos.....	137
<b>CAPÍTULO 9</b>	
Biorremediación de suelos contaminados con petróleo.....	171
<b>CAPÍTULO 10</b>	
El papel de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en la fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.....	200
<b>CAPÍTULO 11</b>	
Remediación de suelos contaminados con biodiesel.....	232

<b>CAPÍTULO 12</b>	
Biorremediación de suelos afectado por residuos.....	258
<b>CAPÍTULO 13</b>	
Utilización de especies vegetales para la recuperación de rellenos sanitarios.....	281
<b>CAPÍTULO 14</b>	
Suelos contaminados con hidrocarburos: un caso de estudio.....	296
<b>CAPÍTULO 15</b>	
Residuos de cosecha con fines bioenergéticos: el rastrojo de maíz.....	305
<b>CAPÍTULO 16</b>	
Biodegradación de residuos contaminantes provenientes de la actividad agropecuaria para la producción de biogás.....	319
<b>CAPÍTULO 17</b>	
Inmovilización in situ de metales en suelos contaminados mediante fitoestabilización.....	339
<b>CAPÍTULO 18</b>	
Impacto del cadmio sobre la acumulación y la producción de granos en cultivos de maní.....	367
<b>CAPÍTULO 19</b>	
Biorremediación de suelos contaminados con metales pesados.....	386
<b>CAPÍTULO 20</b>	
Rol de la simbiosis micorrízico arbuscular y de las enmiendas orgánicas en la tolerancia a elementos tóxicos: su aporte en la remediación de suelos contaminados.....	406
<b>CAPÍTULO 21</b>	
Ecología microbiana del proceso de compostaje de suelo contaminado con petróleo.....	428
<b>CAPÍTULO 22</b>	
Fitorremediación de suelos salinos.....	458
<b>CAPÍTULO 23</b>	
La digestión anaeróbica y la biorremediación de suelos.....	467
Conclusiones.....	488
Biografía de los editores.....	489



## Introducción

Desde que el hombre se congregó en grandes urbes y llegó a una situación de vida cómoda, según se entiende en una gran ciudad, se apartó de la naturaleza y la utilizó en forma indiscriminada para su beneficio económico, principalmente.

A través de esta contribución quisiéramos transmitir la idea de que la naturaleza toda es poderosa y guarda en su interior la generosidad del retorno a una situación igual o similar a la que poseía originalmente.

Previo a todo debemos definir que contaminación es la presencia de un elemento o una sustancia en cantidad no aconsejable en un lugar que no corresponde, sucede por intervención natural o antrópica y puede provenir de una fuente fija o una difusa.

En cuanto al tipo de contaminante podrían ser pesticidas, petróleo, residuos urbanos, metales pesados, residuos agrícolas, residuos pecuarios.

Biorremediación se refiere a un conjunto de metodologías que utilizan microorganismos o partes de ellos seleccionados naturalmente o por modificaciones de la ingeniería genética para degradar sustancias que se han trasladado a un lugar que no corresponde o están en cantidades no recomendables como resultante de un proceso productivo mal manejado o de un incidente natural.

Bioprofilaxis se refiere a las metodologías utilizadas para prevenir una contaminación.

La biorremediación y la bioprofilaxis podrían categorizarse por el recurso natural afectado, las herramientas utilizadas para biorremediar y el contaminante participante del proceso.

Los recursos naturales afectados en esta publicación se refieren al aire, al agua y al suelo

Las metodologías utilizadas pueden ser *in situ* o *ex situ*. Estas utilizan herramientas como la digestión anaeróbica, las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas, las plantas, la bioenergía, la simbiosis micorrízica arbuscular y las camas biológicas.

Los contaminantes citados son hidrocarburos, la actividad agropecuaria, biodiésel, metales pesados, la salinidad, PAHs, petróleo, pesticidas, relleno sanitario (biogás y líquido lixiviado).

En lo referido a herramientas participan transformaciones físico químicas y bioquímicas que incluyen fermentaciones y transformaciones surgidas por el metabolismo de las plantas y los microorganismos en procesos naturales de espacio abiertos o en procesos manejados por el hombre en espacios cerrados.

A continuación se podría ordenar de alguna manera y detallar en breve el trabajo de cada cual.

Un capítulo referido al recurso natural suelo: El suelo como recurso natural. ¿En qué marco se inserta la biorremediación?

Referido a plaguicidas: Actinobacterias: su potencial para remover y degradar plaguicidas; Biobeds – Una contribución sueca para la minimización de la contaminación por el uso de plaguicidas.

Diferentes contaminantes atmosféricos: Contaminación del aire y su efecto en plantas y suelo, descontaminación y restauración.

Referido al petróleo: Ecología microbiana del proceso de compostaje de suelo contaminado con petróleo; Electrobiorremediación de hidrocarburos en suelos insaturados de la Patagonia; Biorremediación de suelos contaminados con petróleo ; Suelos contaminados con hidrocarburos: un caso de estudio; La biorremediación aplicada a la rehabilitación de suelos contaminados con hidrocarburos; El papel de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en la fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.

Referido al biodiésel: Remediación de suelos contaminados con biodiésel.

Referido a residuos urbanos, pecuarios y agrícolas: Biorremediación de suelos en rellenos sanitarios; Residuos de cosecha con fines bioenergéticos: el rastrojo de maíz; Biodegradación de residuos contaminantes provenientes de la actividad agropecuaria para la producción de biogás.

Referido a metales pesados: Inmovilización *in situ* de metales en suelos contaminados mediante fitoestabilización; Impacto del cadmio sobre la acumulación y la producción de granos en cultivos de maní; Biorremediación de suelos contaminados con metales pesados.

Referido a elementos potencialmente tóxicos: Rol de la simbiosis micorrízico-arbuscular y de las enmiendas orgánicas en la tolerancia a elementos tóxicos: su aporte en la remediación de suelos contaminados.

Hidrocarburos aromáticos policíclicos: Ecología microbiana de la rizósfera de ryegrass utilizado para fitorremediar suelo contaminados con PAHs.

Referido a suelos salinos: Fitorremediación de suelos salinos.

Referido a procesos La digestión anaeróbica y la biorremediación de suelos.

La temática es relativamente amplia en metodología, elemento contaminante, recurso del país o del extranjero afectado por el contaminante.

Los compiladores estamos complacidos de poder presentar esta variedad de opciones en un texto único para nuestras instituciones.

## Summary

Since man has gathered in large cities and reached a comfortable life situation, as it is understood in a large city, he turned away from nature and used it indiscriminately for its economic benefit mainly.

Through this contribution we would like to convey the idea that all nature is powerful and holds within it the generosity of returning to a situation the same or similar to what it originally possessed.

Prior to everything we must define pollution, is the presence of an element or a substance in an undesirable quantity in a place that does not correspond, happens by natural or anthropic intervention and can come from a fixed source or a diffuse source. As for the type of contaminant could be pesticides, petroleum, urban waste, heavy metals, agricultural residues, livestock residues.

Bioremediation refers to a set of methodologies that use microorganisms or parts of them selected naturally or by modifications of the genetic engineering to degrade substances that have been transferred to a place that does not correspond or are in amounts not recommended as resulting from a poor production process. Handled or a natural incident.

Bioprophylaxis refers to the methodologies used to prevent contamination. Bioremediation and bioprophylaxis could be categorized by the natural resource affected, the tools used for bioremediation and/or the pollutant involved in the process. The natural resources affected in this publication relate to air, water and soil. The methodologies used may be in situ or ex situ. They use tools such as anaerobic digestion, plant growth promoting bacteria, plants, bioenergy, arbuscular mycorrhizal symbiosis and biological beds.

The pollutants mentioned are hydrocarbons, agricultural activity, biodiesel, heavy metals, salinity, PAHs, petroleum, pesticides, landfill (biogas and leachate). In terms of tools, physicochemical and biochemical transformations are involved, including fermentations and transformations arising from the metabolism of plants and microorganisms in natural processes of open space or in man-made processes in closed spaces.

Then you could sort somehow and detail the work of each shortly. A chapter on the natural resource soil: The soil as a natural resource. In what frame is bioremediation inserted?

Referred to pesticides: Actinobacteria: their potential to remove and degrade pesticides; Biobeds - A Swedish contribution to minimizing pollution from pesticide use

Different atmospheric pollutants: Air pollution and its effect on plants and soil, decontamination and restoration.

Oil related: Microbial ecology of the composting process of oil contaminated soil; Electrobioremediation of hydrocarbons in unsaturated soils of Patagonia Bioremediation of soils contaminated with Petroleum Argentina; Soils contaminated with hydrocarbons: a case study; Bioremediation applied to the rehabilitation of soils contaminated with hydrocarbons; The role of plant growth promoting rhizobacteria in the phytoremediation of soils contaminated by hydrocarbons.

Reference to biodiesel: Remediation of soils contaminated with biodiesel. Referred to urban, livestock and agricultural waste Bioremediation of soils in landfills; Harvest residues for bioenergy purposes: corn stubble; Biodegradation of polluting waste from the agricultural activity for the production of biogas.

Referred to heavy metals: In situ immobilization of metals in soils contaminated by phytostabilization; Impact of cadmium on the accumulation and production of grains in peanut crops; Bioremediation of soils contaminated with heavy metals Concerning potentially toxic elements: Role of mycorrhizal-arbuscular symbiosis and organic amendments in tolerance to toxic elements: their contribution in the remediation of contaminated soils.

Polycyclic aromatic hydrocarbons: Microbial ecology of ryegrass rhizosphere used for phytoremediation of soil contaminated with PAHs

Concerning saline soils: Phytoremediation of saline soils  
Process Reference Anaerobic digestion and soil bioremediation

Thematic coverage is relatively broad in methodology, pollutant element, resource of the country or abroad affected by the pollutant. Compilers are pleased to be able to present this variety of options in a text that is almost unique to our institutions.

## CAPÍTULO 1

### **El suelo como recurso natural. ¿En qué marco se inserta la biorremediación?**

Miguel A. Taboada<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Suelos, CIRN, INTA

E-mail: taboada.miguel@inta.gob.ar

### **El suelo: ¿un recurso natural (RRNN) renovable?**

A pesar de que los problemas de degradación irreversible de suelos y de pérdida de productividad son conocidos desde la antigüedad, a menudo se sigue pensando a los suelos como un recurso renovable. Ejemplos concretos de degradación irreversible de suelos son las pérdidas por erosión que causan decapitación de los horizontes superficiales que poseen la mayor parte de la materia orgánica y de los nutrientes vegetales, o de salinización en suelos bajo riego.

Solo algunos procesos de degradación de suelos pueden ser considerados reversibles. Por ejemplo, y hasta cierto punto, las pérdidas de fertilidad química asociadas a la extracción de nutrientes. Por el contrario, la mayoría de los procesos de degradación de suelos distan de ser reversibles.

En la Tabla 1 se presenta un listado y clasificación por su tipo de diferentes procesos de degradación de suelos, cada uno con su grado de reversibilidad (Scherr, 1999). Claramente, en nuestro país prevalecen dos procesos de degradación irreversible o poco reversible, como “la pérdida de suelo por erosión por el agua o por viento” y la “alcalinización/salinización”. Entre los poco reversibles, aparecen “los panes de arcilla, zonas compactas”, “agotamiento de nutrientes”, y “desbalance de nutrientes”, mientras que entre los reversibles a bajo costo prevalecen “panes de arcilla”, “zonas compactas”, “reducción de la infiltración/drenaje impedido”, “reducción de la capacidad de almacenaje de agua”, “anegamiento”, “aridificación”, y “pérdida de materia orgánica”. Los procesos de degradación biológico debidos al disturbio del suelo, o al uso de agroquímicos también están muy difundidos, aunque claramente menos estudiados. Toda esta información surge de una publicación reciente de Casas y Albarracín (2015) en la cual se han compilado los trabajos existentes sobre el tema en el país.

A nivel global, se ha publicado recientemente sobre el estado de los suelos del mundo (FAO-ITPS, 2015; Montanarella *et al.*, 2016). De allí surge que a nivel global también la erosión es la principal amenaza sobre el estado de los suelos, en segundo lugar, la pérdida de materia orgánica de los suelos, seguido por el desbalance de nutrientes. De todos ellos, aparece el primero como el único claramente irreversible. No obstante, aparecen otras amenazas a nivel regional o continental que afectan la funcionalidad de los suelos, como por ejemplo, la salinización, la contaminación o el sellado por avance de urbanizaciones.

La efectividad de recuperación posdegradación depende del grado de resiliencia de la propiedad afectada. Difícilmente se logre retornar al punto inicial de cero degradación o condición prístina. Por ejemplo, el nivel inicial de materia orgánica y la condición estructural del suelo.

Debiera ser objeto de discusión en qué medida los problemas de contaminación de suelos y aguas son reversibles y a qué costo.

En el futuro próximo asoman estas nuevas presiones sobre los suelos: a) el aumento de la demanda de alimentos, fibras y biocombustibles por una población creciente que llegará a 9 mil millones de habitantes hacia 2050, y b) el incremento de los denominados eventos extremos (ej. tormentas, inundaciones, sequías, olas de calor, incendios, etc.) asociados al cambio climático (FAO-ITPS 2015; Montanarella *et al.*, 2016).

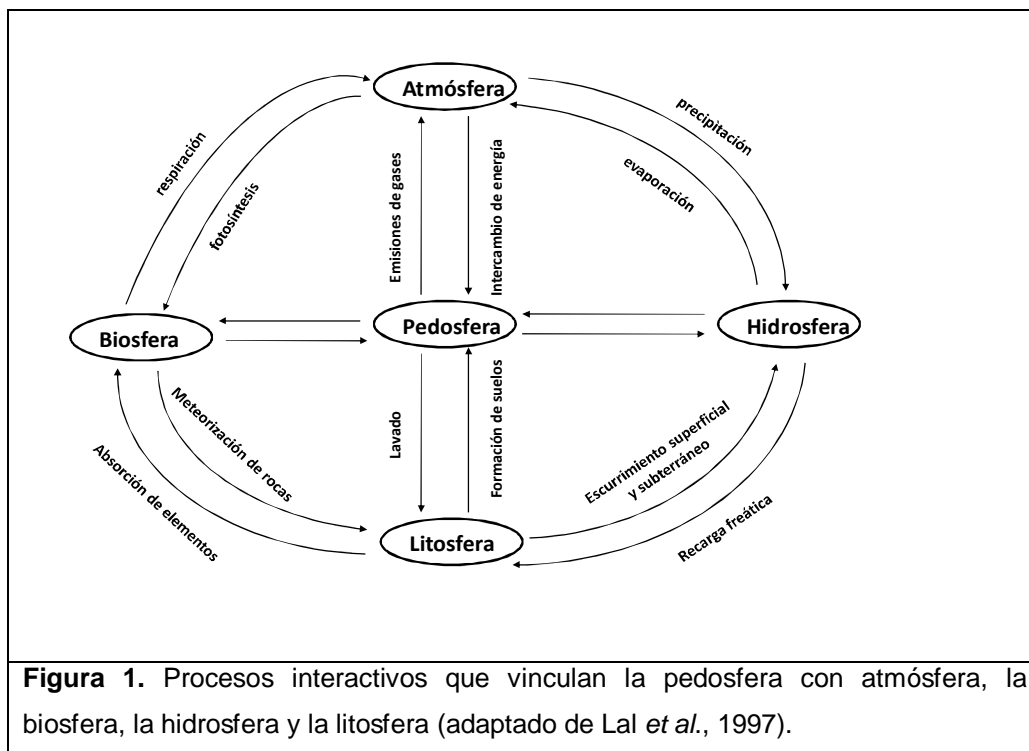
**Tabla 1.**

Reversibilidad relativa de los procesos de degradación de suelos (Scherr 1999)				
Tipo de degradación	Proceso de degradación	Grado de reversibilidad		
		Reversible a bajo costo	Reversible con costo significativo	Irreversible a muy alto costo
Física	Panes de arcilla, zonas compactas		X	
	sellado superficial y encostramiento	X		
	subsidiencia			X
	Pérdida de suelo por erosión por agua o viento		X (solo si es activa)	X
	Deformación del terreno (erosión en cárcavas, movimiento en masa)			X
Agua disponible	Reducción de la infiltración/drenaje impedido		X	
	Reducción de la capacidad de almacenamiento de agua		X	
	anegamiento		X (a escala de lote)	X (a escala de cuenca)
	aridificación		X	
Química	Pérdida de materia orgánica		X	
	agotamiento de nutrientes/lavado	X		
	Desbalance de nutrientes	X		
	atrapamiento de nutrientes		X	
	acidificación		X (si es posible el encalado)	X
	alcalinización/salinización			X
	Eutroficación		X	
Biológica	Reducción de la actividad biológica debido al disturbio del suelo		X	
	Reducción de la actividad biológica debido al uso de agroquímicos			
Polución	Contaminación		X	
	Acumulación de sustancias tóxicas			X

De cualquier manera, no cabe duda de que el suelo debe ser considerado un RRNN no renovable, al menos a una escala humana.

## Evolución de los conocimientos sobre los suelos

El suelo es un recurso natural biogeoquímico dinámico que soporta todos los componentes que comprenden los ecosistemas terrestres, de forma tal que ha sido llamado la piel viva de la Tierra. En su portada del 11 de junio de 2004, la revista *Science* declaró a los suelos como “la frontera final”. Colectivamente, el suelo es conocido como la pedosfera, y los procesos que tienen lugar dentro del suelo están ligados a servicios ecosistémicos como la cantidad y calidad del agua, el intercambio de gases atmosféricos, y son centrales en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes y el carbono que sostienen la vida (Figura 1).



Si bien el comienzo de la agricultura se remonta al período neolítico (nueve mil años antes de Cristo) y existen evidencia de una primera clasificación de suelos en China unos 4 o 5 mil años antes de Cristo, y ya en el Antiguo Testamento se hace referencia a “tierra de secano y tierra de regadío”, fueron Dokuchaev y sus discípulos de la Escuela Rusa los que asentaron las bases de la Edafología moderna entre finales del siglo 19 e inicios del siglo 20, y reconocieron al suelo como un cuerpo natural organizado, acreedor por sí mismo de un estudio científico. Recién en 1924 se realiza el primer congreso de suelos en Roma, y es a partir de entonces que la Edafología comienza a funcionar como una ciencia, con su metodología propia (Barrios, 1985). Puede afirmarse que parten de esa época los primeros estudios básicos sobre rocas y



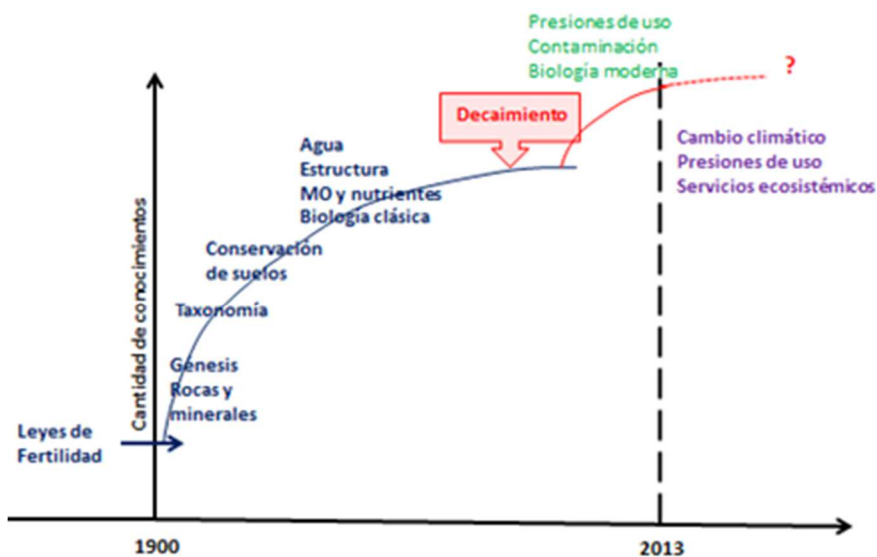
minerales y la génesis de los suelos, basado en la influencia prevaleciente del clima (ej. materiales originarios similares dan lugar a suelos diferentes bajo climas distintos). Más adelante se acepta una visión más evolucionista, aceptando la influencia de la vegetación (Barrios, 1985). Cerca de mediados de siglo, Hans Jenny (1941) define cinco factores formadores de suelo, dando lugar a la ecuación general de formación de los suelos:

$$S = f (cl, b, mp, r, t) \quad [1]$$

Donde:

S = suelo o característica de él; Cl: = clima; b= material biótico, mp= material parental, r = relieve o topografía, y t= l tiempo.

Se presenta en la Figura 2 un esquema teórico de la evolución de los conocimientos de los suelos, donde esta etapa fundamental aparece en los comienzos. Posteriormente, se generan los primeros sistemas de clasificación de los suelos y su taxonomía (Clasificación Rusa, USDA, 1938) que llevaban a cabo un enfoque en los factores de formación del suelo y su ambiente para clasificación de suelos zonales (determinados por el desarrollo de vegetación y clima), azonales y intrazonales (determinados por su material parental y tiempo de formación). Se diferenciaban entre suelos azonales e intrazonales basados en el desarrollo del perfil del suelo. Se genera la primera clasificación americana de suelos (Thorpe y Smith, 1949).



**Figura 2.** Evolución teórica de los conocimientos de los suelos.

Si bien el conocimiento de la degradación de los suelos viene de la antigüedad, a partir de la desaparición de sociedades primitivas por pérdida de fertilidad de los suelos o por salinización de estos, puede afirmarse que es a partir de 1930, cuando se desata la fenomenal sequía y tormenta de polvo (*dust bowl*) en las planicies sureñas de Estados Unidos, que se toma conciencia de la importancia de conservar los suelos. Aparece la figura del Dr. Hugh Hammond Bennett como líder de los estudios e implementación de prácticas de conservación (American Council of Learned Societies, 1999).

Se ha manifestado en los últimos años un renovado interés en el suelo y en la ciencia del suelo, dado el reconocimiento de que los ciclos biogeoquímicos que ocurren en la superficie de la Tierra influyen el cambio climático global, la degradación y remediación de tierras, el destino y transporte de nutrientes y contaminantes, la conservación del suelo y el agua, el abastecimiento y la seguridad alimentaria, la capacidad de soporte global, la función de los humedales, y muchos otros aspectos pertinentes al manejo y a la conservación de los recursos de tierras y aguas (Science, 2004; Steering Committee for Frontiers in Soil Science Research & National Research Council, 2009).

A partir de la posguerra, en consonancia con el proceso de industrialización de las sociedades desarrolladas, se producen avances sustanciales en conocimientos de las propiedades de los suelos en la relación con su capacidad para sostener la producción de cultivos agrícolas y pasturas. Esta época coincide con la denominada Revolución Verde, que si bien permitió afrontar problemas graves de escasez de alimentos por una creciente población en países en vías de desarrollo, lo hizo a expensas de un uso elevado de insumos basados en combustibles fósiles (ej. fertilizantes minerales, agroquímicos, nuevas variedades de trigo, arroz y maíz, etc.) y el avance de la deforestación en ambientes tropicales y subtropicales (IAASTD, 2009). Un hito de la Revolución Verde es el otorgamiento del Premio Nobel de la Paz 1970 al Dr. Norman E. Borlaug, considerado el padre de la Revolución Verde e inventor de la agricultura moderna (Sampedro, 2009).

Luego de los fuertes avances en el conocimiento de las propiedades físicas, como la provisión de agua a las plantas, las propiedades químicas que incluyen la disponibilidad de nutrientes vegetales y la biología de suelos, puede decirse que se llegó a un estancamiento o *plateau* en el avance de la ciencia del suelo a nivel global hacia fines del siglo 20. Sin embargo, esta situación de estancamiento comenzó a dar un vuelco al final del siglo, cuando se lleva a cabo el llamado “Estudio del Milenio” o *Millennium Ecosystem Assessment* (MEA, 2005). Este estudio pone de relieve el rol

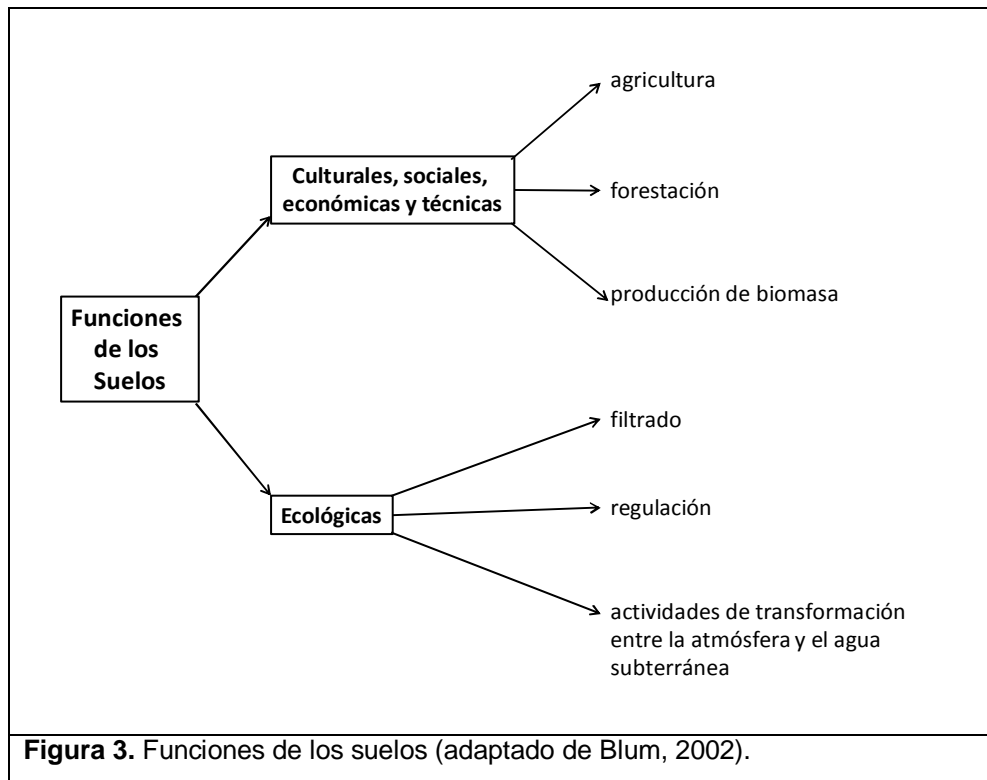
que juegan los suelos en la provisión de servicios ecosistémicos, como el filtrado y provisión de agua, la calidad del aire atmosférico y el almacenamiento de carbono, además de los servicios de provisión de alimentos y fibras.

Se considera que en los próximos 30 a 50 años el principal desafío global será incrementar la productividad agropecuaria para alimentar a una población mundial en aumento, atendiendo a su vez a los crecientes problemas de degradación y contaminación de suelos, aguas y atmósfera. Este desafío será intensificado por el cambio climático, la escasez de agua, la degradación de las tierras, la seguridad energética, y las diferencias ideológicas sobre cómo mejorar la seguridad alimentaria en todo el mundo. A similares conclusiones han arribado una serie de estudios internacionales llevados a cabo para analizar los impactos de la investigación en agricultura (IAASTD, 2009), así como el futuro de la actividad (Mangan *et al.*, 2010) y el de ecosistemas (MEA, 2005).

## **Las funciones de los suelos. Visión actual**

Los suelos son vistos en forma crecientemente importante para el desarrollo mundial, en temas tales como la seguridad alimentaria, el alivio de la pobreza, la degradación de tierras y la provisión de servicios ecosistémicos (Wood *et al.* 2000). Se considera que los suelos ejercen un rol principal en muchos servicios del ecosistema, tales como el ciclado de los nutrientes y la formación de suelos, la provisión de alimentos, madera y fibras, la regulación del clima, las inundaciones y la purificación del agua (MEA, 2005). Por estas razones, existe consenso en que los suelos han resurgido en la agenda global, luego de dos décadas de olvido parcial (Bouma, 2009).

Bouma, (2009) recomienda hacer foco en las funciones de los suelos, más que las amenazas de degradación, a fin de poder concitar la atención del resto de la sociedad. Estas funciones son presentadas en la Figura 3. Pueden ser identificadas seis funciones diferentes de los suelos, tres de ellas de tipo más ecológico, y otras tres más bien relacionadas con aspectos culturales, sociales, económicos y técnicos. Existe necesidad de relacionar con el público a las funciones de tipo ecológico, especialmente de qué manera el suelo funciona respecto a la calidad y disponibilidad de agua (Science, 2004; Steering Committee for Frontiers in Soil Science Research & National Research Council, 2009).



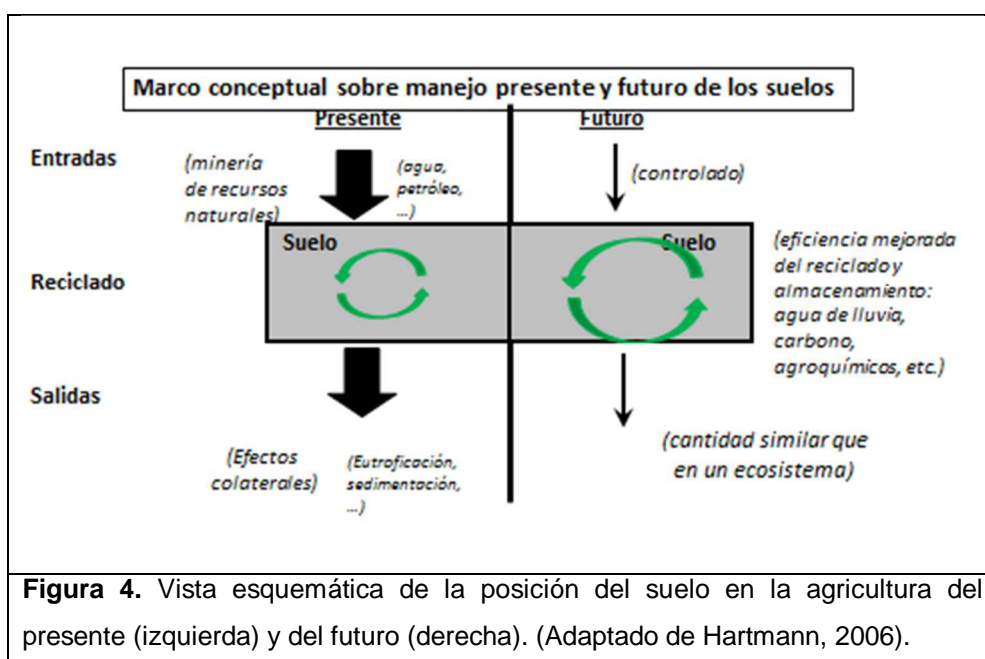
El suelo soporta la más rica biodiversidad sobre la Tierra y funciona como filtro y regulador de contaminantes inorgánicos y orgánicos, así como de microorganismos patógenos y virus. A pesar de su importancia, el suelo permanece como un recurso minusvalorado y menospreciado (Science, 2004; Steering Committee for Frontiers in Soil Science Research & National Research Council, 2009).

Existe una creciente demanda por el reconocimiento de los servicios ecosistémicos, de forma tal que se han vuelto una norma la aparición de antagonismos (*trade-offs*) entre diferentes servicios. Por ejemplo, un país puede incrementar su producción de alimentos convirtiendo un bosque o una selva en agricultura, por ejemplo, pero a expensas de afectar negativamente el aporte de servicios que pueden ser de igual o mayor importancia, tales como proveer agua limpia, leña, destinos ecoturísticos, o regulación de inundaciones y control de sequías (MEA, 2005).

### **Necesidad de reciclar**

El mundo está asistiendo a un decrecimiento de los insumos basados en agua y petróleo en la agricultura moderna. La minería de los recursos naturales no es más aceptable, por lo que la producción de alimentos solo puede ser alcanzada a través de la mejora en el reciclado, tal como se esquematiza en la Figura 4 (Edwards y

Someshwar, 2000; Kashmanian et al., 2000). Se suma a ello el probable o discutible agotamiento de las reservas fósforo (Dibb, 2004) que determinan que se deberá hacer foco en las condiciones y procesos de resiliencia del suelo en un medio natural para introducir estos aspectos en técnicas de manejo alternativas y más sofisticadas (Vance et al., 2003; Mangan et al., 2010). Los agroecosistemas esquemáticos no slo estarán caracterizados por flujos e interrelaciones, sino también por evaluaciones económicas (Hartmann, 2006; Steering Committee for Frontiers in Soil Science Research & National Research Council, 2009).

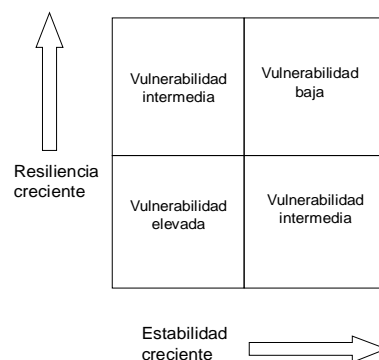


## Vulnerabilidad y resiliencia

Los suelos agrícolas se presentan en ecosistemas que poseen diferente grado de vulnerabilidad a las presiones productivas. Se pueden distinguir los ecosistemas poco frágiles de aquellos que son más frágiles o vulnerables siguiendo el lineamiento propuesto por Viglizzo & Frank (2006). Los ecosistemas poco frágiles son aquellos que poseen suelos fértiles, los cuales se caracterizan por su baja vulnerabilidad y elevada resiliencia o capacidad de recuperación (Figura 5). La vulnerabilidad es un concepto que se asocia con las condiciones del clima que hace que un suelo sea altamente susceptible a sufrir degradación (ej. erosión hídrica y eólica) por mal manejo del mismo. La resiliencia es la capacidad que posee un suelo determinado para recuperar una determinada condición luego de un daño (Kay y Angers, 2000).

Los ecosistemas frágiles se caracterizan por poseer suelos muy vulnerables, poco resilientes, o ambas cosas a la vez (Figura 4). Esta combinación de factores suele darse en los climas tropicales y subtropicales, o en las regiones más áridas. En todas estas regiones los suelos suelen poseer bajos niveles de materia orgánica, y suelen ser también poco fértiles. A pesar de estos graves problemas, la cantidad de información que se produce en estos lugares es varias veces inferior en cantidad y en calidad a la que se genera en los ecosistemas de tierras más fértiles (Hartemink, 2002). Esta escasez de información también se produce en la Argentina, particularmente en las regiones subtropicales, donde las presiones del desmonte para producir cultivos son cada vez mayores (Boletta *et al.*, 2006).

Estas áreas poco fértiles parecen adaptarse mejor para aproximaciones en pequeña escala basadas en la agroecología, en la agroforestación, en el uso de abonos orgánicos y en los métodos de conservación del agua. Existen importantes oportunidades para que la agricultura del futuro pueda ser más productiva, rentable, sustentable y ambientalmente amigable, si se basa más en fuentes de energía y nutrientes disponibles por procesos biológicos. La idea es que el uso de agroquímicos sea mínimo y que suplemente a la biología (Altieri, 2002). Debe extenderse una mayor adopción de la agricultura conservacionista por los agricultores (Knowler & Bradshaw, 2007). Muchos de estos enfoques han probado ser exitosos en otras regiones con ecosistemas frágiles, pero su implementación requiere de investigación local para ser adoptadas por los productores.



**Figura 5.** Esquema que muestra la relación entre vulnerabilidad y resiliencia en los suelos (adaptado de Kay y Angers, 2000).

## **Presiones de uso sobre los suelos y seguridad alimentaria**

La provisión de seguridad alimentaria ha sido reconocida como uno de los grandes desafíos ambientales existentes para el desarrollo sostenible de la humanidad y el planeta Tierra (Godfray *et al.*, 2010; Foley *et al.*, 2011; Pimentel, 2012; Branca *et al.*, 2013; Mc Bratney *et al.*, 2014). Los suelos se relacionan estrechamente con el concepto de seguridad alimentaria, entendida como el aseguramiento de la cantidad, la calidad y la accesibilidad de los alimentos (Mc Bratney *et al.*, 2014). Junto con la seguridad del agua, la seguridad energética, el cambio climático y su mitigación, la protección de la biodiversidad y los servicios ambientales, la seguridad alimentaria forma parte de un concepto más amplio conocido como la seguridad del suelo (Mc Bratney *et al.*, 2014).

El mundo se enfrenta a un problema de sobrepoblación grave, sobre todo en África y Asia. La tasa actual de aumento de la población es del 1,2 %, lo que significa un tiempo de duplicación de 58 años. Por lo tanto, la población actual del mundo de 7 mil millones se duplicará a 14 mil millones en menos de 60 años (Pimentel, 2012). El aumento de la población y el consumo están imponiendo demandas sin precedentes sobre la agricultura y los recursos naturales. Para satisfacer la demanda de alimentos por el aumento de la población mundial, la producción agrícola debe ser duplicada entre 2000 y 2050. De no lograrse, podríamos afrontar nuevamente un desafío similar al planteado hace más de dos siglos por Tomas Malthus (1798), quien postuló que mientras la población crecería a tasas geométricas, los alimentos lo harían a tasas aritméticas, de magnitud muy inferior, generando así un potencial escenario de hambruna con el paso del tiempo.

Las amenazas a la seguridad alimentaria son en gran medida causadas por la degradación de los suelos y de los recursos hídricos asociados, en particular cuando dicha degradación es irreversible o difícilmente reversible, como es el caso de la pérdida de suelo superficial por el viento o el agua la erosión, la deformación del terreno por la erosión en cárcavas o movimiento de masas, la acidificación, la alcalinización/salinización y la contaminación con sustancias tóxicas (Scherr, 1999). Cada año unos 10 millones de hectáreas de tierras de cultivo se pierden debido a la erosión del suelo, reduciendo así la tierra de cultivo disponible para la producción de alimentos. En general, la tasa de pérdida de suelo por degradación es 10 a 40 veces más rápida que la tasa de renovación del suelo. La pérdida de tierras agrícolas por degradación se vuelve dramática en los países o regiones con alta población o con inseguridad alimentaria, como sucede en África, donde la población se prevé un crecimiento de su actual 1,1 mil millones a 4,2 mil millones en 2100.

Suponiendo tecnologías agrícolas similares y niveles de intensificación, deben incorporarse mil millones de hectáreas adicionales de tierras de cultivo (por encima de 1,5 mil millones de hectáreas actualmente cultivadas) para el año 2050 (Tilman *et al.*, 2002). Sin embargo, estos futuros aumentos en la producción de alimentos no se pueden lograr a costa de una mayor degradación de suelos o con prácticas agrícolas no sostenibles, sino sobre la base de la intensificación y la gestión del carbono en el suelo y los nutrientes (Tilman *et al.*, 2002; Godfray *et al.*, 2010; Branca *et al.*, 2013). Un desafío mayor es cerrar las brechas de rendimiento de los cultivos mediante el aumento de la eficiencia de cultivo y la reducción del impacto ambiental de la agricultura (Foley *et al.*, 2011). Recientemente, Aramburu Merlos *et al.* (2015) hallaron brechas de rendimiento con respecto al potencial en secano de entre 30 y 40 % para los cultivos de trigo, maíz y soja en nuestro país.

La provisión de seguridad alimentaria también se ve amenazada por algunos cambios de uso del suelo, como es el caso de la simplificación agrícola impulsada por el mercado, tal como sucede en los países de América del Sur (es decir, Argentina, Brasil, etc.) (Satorre, 2005; Viglizzo y Jobbagy, 2010). A pesar del aumento de la productividad de los diferentes cultivos de cereales en los últimos 30 años en el Cono Sur, gran parte de ese aumento se hizo a expensas de una menor diversidad de productos cosechados. Ello se ve reflejado en la prevalencia del monocultivo de soja, lo que resulta en una elevada susceptibilidad a las perturbaciones de los mercados y del clima (Lavado y Taboada 2009; Viglizzo y Jobbagy, 2010).

La demanda de biocombustibles es un gran motorizador de los cambios de uso de la tierra. El principal motor de esta aceleración de la demanda es la velocidad de crecimiento del consumo *per cápita* en las economías de países emergentes. También han contribuido a esta aceleración los cambios de política en los países de la OCDE que favorecen la expansión de la producción de biocombustibles, a veces a expensas de la producción de cultivos alimentarios (De Luchi, 2012). La soja y el maíz, así como biocombustible de soja y aceite de palma, motorizaron la conversión de tierras agrícolas en América Latina y África (Deluchi, 2012; Miyake *et al.*, 2012). La producción de maíz y de soja se dedican a reservas para el bioetanol y para el biodiésel, que representan una competencia con la producción de alimentos y con el carbono del suelo (Pimentel *et al.*, 2008, 2009; Pimentel y Burgess, 2014).

Es difícil predecir la evolución del estado de los recursos mundiales de suelos en los próximos años, en el contexto de las amenazas y beneficios causados por los cambios. Según lo que se concluye a partir de un trabajo de revisión con un mínimo impacto ambiental realizado por Godfrey *et al.* (2010), la intensificación sostenible es una opción viable para alimentar a 9 mil millones de personas en los próximos 40



años, evitando así un nuevo dilema de Malthus. Para cumplir con este objetivo, deben lograrse a escala global acuerdos sobre políticas de gobernabilidad de los suelos en el futuro próximo.

Las soluciones a que no se cumpla el “dilema Malthusiano” deberían provenir de: a) la limitación de la expansión agrícola; b) el cierre de brechas de rendimiento; c) el aumento de la eficiencia de los cultivos; d) los cambios de dietas; y e) la reducción de los desperdicios (Foley *et al.* 2011). A ello se le suma la preservación de las fuentes de energía y la prevención de nuevas emisiones de gases de efecto invernadero (Godfray *et al.* 2010).

## **Cambio climático y emisiones de gases de efecto invernadero**

Los impactos del cambio climático son un tópico “caliente” para aquellos interesados en la atmósfera, los océanos y las superficies terrestres, pero pocos científicos a nivel mundial están investigando la profundidad de los suelos para explorar posibles efectos sobre las aguas subterráneas. Existen evidencias inequívocas del calentamiento de la superficie terrestre a causa del aumento de la concentración de gases con efecto invernadero (GEI) en la atmósfera. Los suelos pueden ser vistos tanto como sujeto, como objeto de este cambio climático. El rol de sujeto se desempeña de dos formas: a) porque en los suelos se encuentra el principal almacén de carbono de la naturaleza; y b) porque desde los suelos son emitidos los principales GEI que son motivo de mayor preocupación por su poder calentamiento y tiempo de residencia en la atmósfera: el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) y el metano (CH<sub>4</sub>) (Snyder *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2013).

El CO<sub>2</sub> es considerado GEI cuando existen cambios de uso de la tierra (ej. deforestación, forestación, roturación de pastizales) que producen un desbalance entre las entradas y salidas de C del sistema.

El N<sub>2</sub>O es el principal GEI producido por suelos con manejo agrícola, a partir de transformaciones del N que entra anualmente a los suelos. Finalmente, las fuentes de emisiones de CH<sub>4</sub> que pasan por los suelos son las arrozceras inundadas, por un lado, y el derretimiento de *permafrosts*, que son suelos en climas fríos típicos de altas latitudes o alturas.

El rol de objeto se origina en que los suelos sufren los impactos del cambio climático, en particular los denominados extremos (ej. tormentas, huracanes, inundaciones, sequías, olas de calor, incendios) cuya frecuencia se ha incrementado en las últimas

décadas. Dado su imprevisibilidad, las consecuencias del cambio climático sobre los suelos no son fáciles de estimar, pues a menudo interaccionan con otros cambios antrópicos que suceden en forma coetánea (ej. agriculturización, pastoralismo, urbanización). Sin embargo, un criterio para valorar el riesgo es la posibilidad de recuperación posterior del deterioro producido. En ese sentido, pueden señalarse a la erosión hídrica y eólica, el deslizamiento de laderas de montañas, y la salinización y sodificación asociado con cambios en el régimen de aguas superficiales y profundas como los deterioros de más difícil reversibilidad que puede generar o agravar el cambio climático. Gran parte de las estrategias de adaptación a los impactos del cambio climático pasan por evitar o aminorar estos daños, a través de la adopción de prácticas conservacionistas de manejo de suelos, o incluso de la creación de áreas de reserva (ej. parques nacionales, reservas de flora y fauna, sitios Ramsar, etc.) donde se considera que son los servicios ambientales el principal bien para proteger.

Por un lado, la agricultura es particularmente vulnerable al cambio climático. Por otro lado, los suelos juegan un rol fundamental en el ciclo global del carbono. Dependiendo del tipo de uso y manejo, el suelo puede ser fuente de emisión o bien un sumidero de carbono. Además, el suelo y las formas en que este se utiliza producen la liberación de otros gases que también influyen en el efecto invernadero, tales como el metano y el óxido nitroso (Six *et al.*, 2004; Snyder *et al.*, 2009). Algunas de las consecuencias del cambio climático sobre los suelos no son fáciles de estimar; así por ejemplo, la pérdida de suelo está condicionada por la biomasa que reduce el impacto de la gota de lluvia; si bien la erosividad de las precipitaciones podría ser mayor, esta se vería contrarrestada por el incremento de la biomasa derivada de mayor humedad y temperatura.

Los países que adhieren al Protocolo de Kyoto, como es el caso de la Argentina, están comprometidos a encarar opciones para mitigar las emisiones GEI. El desafío es cuánto puede mitigarse sin comprometer la seguridad alimentaria y las metas ambientales (Smith *et al.*, 2013).

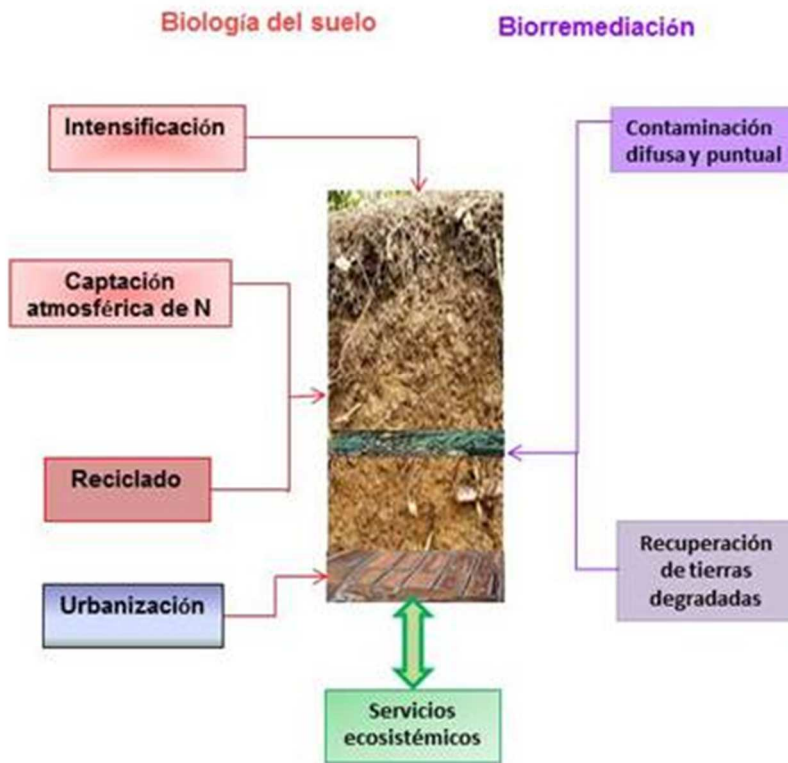
## **Rol de la biorremediación en los suelos**

Existe consenso que en el futuro se requerirá un manejo agronómico más sofisticado de los suelos. Como se ha mencionado, existe en general una amplia brecha entre el potencial genético de los cultivos y el rendimiento real obtenido a campo, debido a limitaciones de clima, suelo y manejo (Aramburu Merlos *et al.*, 2015). Existe necesidad de evitar la separación existente entre la genética y el manejo, y hay también carencia de agrónomos entrenados.

Las mejores prácticas de manejo (MPM) no deberán ser específicas para regiones, sino diseñadas para campos específicos. Existe potencial para los avances en agricultura de precisión que permitirá a los productores utilizar técnicas de manejo sitio-específico, las cuales permitirán incrementar la productividad. La falta de uniformidad a través de los paisajes determina la necesidad de mejorar el manejo agronómico, cualquiera sea el nivel de tecnología utilizado (Steering Committee for Frontiers in Soil Science Research & National Research Council, 2009).

La biología del suelo es considerada internacionalmente un campo “frontera” en el avance de la ciencia. En la Argentina el área requiere mayor esfuerzo de investigación en cantidad y calidad, no solo en campos considerados de avanzada, como el conocimiento de la genómica de los microorganismos del suelo (Avarre *et al.*, 2007; Liles *et al.*, 2003), sino también en aplicaciones biotecnológicas, como la biorremediación de suelos contaminados, o la fijación de nitrógeno atmosférico. Se requiere saber el impacto de la intensificación de la agricultura sobre la biota de los suelos.

La Figura 6 propone un esquema conceptual donde se visualizan cuáles son los aportes esperados de la biología de suelos en el futuro. A partir de una mayor intensificación de las producciones, se espera un mayor aporte de nitrógeno por captación atmosférica, y mayor reciclado de nutrientes por mecanismos de biodisponibilidad. El probable o discutible agotamiento de los yacimientos de fósforo requerirá recurrir a fuentes de reciclado y de solubilización biológica del nutriente (Vance *et al.*, 2003; Dobb, 2004). En este sentido, se prevé que cada vez más suelos recibirán el aporte de residuos agrícolas, industriales y municipales, que el consabido riesgo de contaminación por elementos potencialmente tóxicos y patógenos (Edwards & Someshwar, 2000; Kashmanian *et al.*, 2000). La biorremediación tendrá un papel principal en la recuperación de tierras afectadas por contaminación difusa y puntual, por ejemplo por exceso de fertilizantes nitrogenados y fosforados, o por residuos de agroquímicos. El avance de la minería y de las urbanizaciones sobre tierras agrícolas requerirá la eliminación de elementos potencialmente tóxicos volcados a los suelos, como metales pesados o químicos orgánicos.



**Figura 6.** Rol de la biorremediación en los suelos.

En definitiva, la biología y la biorremediación tendrán un rol principal en la promoción de la prestación de servicios ecosistémicos por los suelos, sin duda una de las demandas del milenio (MEA, 2005).

## Conclusiones

El siglo 20, cuando ha nacido y desarrollado la Ciencia del Suelo, se ha caracterizado por una visión productivista de los suelos. A fines de ese siglo, se estancó el avance de la Ciencia del Suelo y se cerraron centros de investigación en muchos lugares del mundo.

Los inicios del siglo 21 coinciden con un resurgimiento de la Ciencia del Suelo, incluyendo ahora a los servicios ecosistémicos y el surgimiento de fuertes presiones de uso y en cambio climático.

La biología de suelos y la biorremediación aparecen como temas “frontera” en este resurgimiento de la ciencia del suelo.

Los suelos deben ser considerados recursos no renovables, más en el marco de las nuevas presiones a las que estarán sujetos en el futuro cercano.

## Bibliografía

Altieri, M.A. 2002. Review. Agroecology: the science of natural resource management for poor farmers in marginal environments. *Agriculture Ecosystem Environment* 93, 1–24.

American Council of Learned Societies. 1999. "Hugh Hammond Bennett." *American National Biography*. Volume 2. Nueva York. Oxford University Press, pp. 582-583. Disponible en: <http://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/national/about/history/?cid=stelprdb1044395>.

Consultado 16 de septiembre de 2016

Aramburu Merlos, F.; Monzon, J.P.; Mercau, J.L.; Taboada, M.A.; Andrade, F.H.; Hall, A.H.; Jobbagy, E.; Cassman, K.G.; Grassini, P. 2015. Potential for crop production increase in Argentina through closure of existing yield gaps. *Field Crops Research* 184, 145-154.

Avarre, J.C.; De Lajudie, P.; Béna, G. 2007. Hybridization of genomic DNA to microarrays: a challenge for the analysis of environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* 69, 242-248.

Barrios, I. 1985. La Edafología: origen, desarrollo y conceptos. *Vasconia: Cuadernos de historia-geografía*, (5), 8, p. 113. Disponible en:

[www.euskomedia.org/PDFAnlt/vasconia/vas05/05087114.pdf](http://www.euskomedia.org/PDFAnlt/vasconia/vas05/05087114.pdf). Consultado 16 de septiembre de 2016

Blum, W.E.H. 2002. The role of soils in sustaining society and the environment: realities and challenges for the 21st century. Plenary session. Keynote Lecture. 17.º World Congress on Soil Science, Bangkok, Tailandia.

Boletta, P.E.; Ravelo, A.C.; Planchuelo, A.M.; Grilli, M. 2006. Assessing deforestation in Argentine Chaco. *Forest Ecol. Manage.* 228: 108-114.

Bouma, J. 2009. Soils are back on the global agenda: Now what? *Geoderma* 150, 224-225.

Branca, G.; Lipper, L.; Mc Carthy, N.; Jolejole, MC. 2013. Food security, climate change and sustainable land management. A review. *Agronomy Sustainability Development* 33, 635-650.

Casas, R.R.; Albarracín, M.G. 2015 *El deterioro del suelo y del ambiente en la Argentina*. PROSA. Editorial FECIC, Buenos Aires. ISBN 978-950-9149-39-7.

Delucchi, M. 2012. A conceptual framework for estimating the climate impacts of land-use change due to energy crop programs. *Biomass and Bioenergy* 35, 2337-2360.

Dibb, D.W. 2004. ¿Nos quedaremos sin fósforo? *INPOFOS*. *Informaciones Agropecuarias* 22: 1-3.

Edwards, J.H.; Someshwar, A.V. 2000. Chemical, physical, and biological characteristics of agricultural and forest by-products for land application. pp. 1-62. En W. R. Bartels (ed). *Land application of agricultural, industrial, and municipal by-products*. N.º 6 in the SSSA Book Series. SSSA, Madison, WI.

FAO & ITPS. 2015. *Status of the World's Soil Resources (SWSR) – Technical Summary*. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Intergovernmental Technical Panel on Soils, Roma, Italia (ISBN 978-92-5-108960-6). p. 82.

Foley, J.A.; Ramankutty, N.; Brauman, K.A.; Cassidy, E.S.; Gerber, J.C.; Johnston, M.; Mueller, N.D.; O'Connell, Ch.; Ray, D.K.; West, P.C.; Balzer, Ch.; Bennett, E.M.; Carpenter, S.R.; Hill, J.; Monfreda, Ch.; Polasky, S.; Rockstrom, J.; Sheehan, J.; Siebert, S.; Timan, D.; Zake, D.P.M. 2011. Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478, 337-342.

Godfray, H.Ch.J.; Beddington, J.R.; Crute, I.R.; Haddad, L.; Lawrence, D.; Muir, J.F.; Pretty, J.; Robinson, Sh.; Thomas, S.M.; Toulmin, C. 2010. Food security: The challenge of feeding 9 million people. *Nature* 327, 812-817.

Harrier, L.A.; Watson, C.A. 2003. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable cropping systems. *Advances in Agronomy* 79, 185-225.

Hartemink, A.E. 2002. Soil science in tropical and temperate regions. *Advances in Agronomy* 77, 269-291.

Hartmann, Ch. 2006. Future of soil science. En: International Union of Soil Sciences (IUSS) (Ed.). *The Future of Soil Science*. CIP-Gegevens Koninklijke Bibliotheek, Den Haag, pp. 57-59.

International assessment of agricultural knowledge, science and technology for development (IAASTD). 2009. Synthesis report with executive summary: a synthesis of the global and sub-global IAASTD reports / edited by Beverly D. McIntyre. ISBN 978-1-59726-550-8.

Jenny, H. 1941. Factors of soil formation. A system of quantitative pedology. Dover Publications, Nueva York, p. 191.

Kashmanian, R.M.; Kluchinski, D.; Richard, T.L.; Walker, J.M. 2000. Quantities, characteristics, barriers, and incentives for use of organic municipal by-products. p. 127-167. En W. R. Bartels (ed). *Land application of agricultural, industrial, and municipal by-products*. N.º 6 in the SSSA Book Series. SSSA, Madison, WI.

Kay, B.D.; Angers, D.A. 2000. Soil structure. p. A-229-A276. En: M. E, Summer (Ed.) *Handbook of Soil Science*. CRC Press. Boca Raton-London.Nueva York-Washington DC.

Knowler, D; Bradshaw, B. 2007. Farmers' adoption of conservation agriculture: A review and synthesis of recent research. *Food Policy* 32: 25-48.

Lal, R. 1997. Residue management, conservation tillage and soil restoration for mitigating greenhouse effect by CO<sub>2</sub>-enrichment. *Soil and Tillage Research* 43, 81-107.

Lavado, R.S.; Taboada, M.A. 2009. The Argentinean Pampas: A key region with a negative nutrient balance and soil degradation needs better nutrient management and conservation programs to sustain its future viability as a world agresource. *Journal of Soil and Water Conservation* 65, 150A-153A.

Liles, M.R.; Manske, B.F.; Bintrim, S.B.; Handelsman, J.; Goodman, R.M. 2003. A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. *Applied Environmental Microbiology* 69, 2684-2691.

Malthus, T.R. 1798. *An essay on the principle of population*. Londres.

Mangan, M.E.; Fernández, A.L.; Van Roekel, R.J.; Kantar, M.B.; Kluver, R.V.III; Yost, M.A.; Ries, L. 2010. 21<sup>st</sup> Century agriculture: balancing productivity and conservation in a changing environment. Member Forum. *CSA News*. 16-19.

McBratney, A.; Field, D.J.; Koch, A. 2014. The dimensions of soil security. *Geoderma* 213, 203-213.

Millenium Ecosystem Assessment. 2005. *Ecosystem and Human Well-Being: Wetlands and Water Synthesis*. World Resources Institute, Washington, DC, p. 80.

Miyake, S.; Renouf, M.; Peterson, A.; McAlpine, C. Smith, C. 2012. Land-use and environmental pressures resulting from current and future bioenergy crop expansion: A review. *Journal of Rural Studies* 1-12.

Montanarella, L.; Pennock, D.J.; McKenzie, N.J.; Badraoui, M.; Chude, V.; Baptista, I.; Mamo, T.; Yemefack, M.; Singh Aulakh, M.; Yagi, K.; Young Hong, S.; Vijarnsorn, P.; Zhang, G.L.; Arrouays, D.; Black, H.; Krasilnikov, P.; Sobocká, J.; Alegre, J.; Henriquez, C.R.; Mendonça-Santos, M.L.; Taboada, M.; Espinosa-Victoria, D.; AlShankiti, A.; AlaviPanah, S.K.; Elsheikh, E.A.E.; Hempel, J.; Camps Arbestain, M.; Nachtergaele, F.; Vargas, R. 2016. World's soils are under threat, *SOIL*, 2, 79-82, doi:10.5194/soil-2-79-2016

Pimentel, D. 2012. World overpopulation. *Environmental Development Sustainability* 14, 151-152.

Pimentel, D.; Burgess, M. 2014. Biofuel production using food. *Environmental Development Sustainability* 16:1–3. DOI 10.1007/s10668-013-9505-6.

Pimentel, D.; Williamson, S. Alexander, C.E. 2008. Reducing energy inputs in the US food system. *Human Ecology* 36,459-471.

Pimentel, D.; Marklein, A.; Toth, M.A.; Karpoff, M.N.; Paul, G.S.; McCormack, R.; Kyriazis, J.; Krueger, T. 2009. Food Versus Biofuels: Environmental and Economic Costs. *Human Ecology* 37, 1–12. DOI 10.1007/s10745-009-9215-8

Sampedro, J. 2009. Norman Borlaug, el padre de la 'revolución verde'. *El País*. Disponible en: [http://elpais.com/diario/2009/09/14/necrologicas/1252879201\\_850215.html](http://elpais.com/diario/2009/09/14/necrologicas/1252879201_850215.html). Visitado el 25 de agosto de 2016.

Satorre, E.H. 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Revista Ciencia Hoy* 15 n.º 87: 24-31.

Scherr, S.J. 1999. Soil Degradation. A Threat to Developing-Country Food Security by 2020? *International Food Policy Research Institute. 2020 Vision. Food, Agriculture, and the Environment. Discussion Paper 27*, p. 63.

Science. 2004. Soils-The Final Frontier, special issue of *Science*, vol. 304, 11 junio.

Smith, P.; Haberl, H.; Popp, A.; Erb, K-H.; Lauk, Ch.; Harper, R.; Tubiello, F.N.; De Siqueira Pinto, A.; Jafari, M.; Sohi, S.; Maser, O.; Böttcher, H.; Berndes, G.; Bustamante, M.; Ahammad, H.; Clark, H.; Dong, E.A.; Elsiddig, E.A.; Mbow, Ch.; Ravindranath, N.H.; Rice, Ch.W.; Robledo Abad, C.; Romanovskaya, A.; Sperling, F.; Herrero, M.; House, J.I.; Rose, S. 2013. Invited Review: How much land-based greenhouse gas mitigation can be achieved without compromising food security and environmental goals? *Global Change Biology* 19, 2285–2302.

Snyder, C.S.; Bruulsema, T.W.; Jensen, T.; Fixen, P. 2009. Review of greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 133:247-266.

Steering Committee for Frontiers in Soil Science Research, National Research Council. 2009. Frontiers in Soil Science Research: Report of a Workshop. National Academy of Sciences. The National Academies Press. Washington, DC. ISBN: 0-309-13892-2, p.80. Disponible en: <http://www.nap.edu/catalog/12666.html>. 02 de Marzo de 2016.

Thorp, J.; Smith, G.D. 1949. Higher categories of soil classification: Order, Suborder and Great Soil Groups. *Soil Science* 67, 117-126.

Tilman, D.; Cassman, K.G.; Matson, P.A.; Naylor, R.; Polasky, S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671-677.

Vance, C.P.; Uhde-Stone, C.; Allan, D.L. 2003. Tansley review: Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157: 423-447.

Viglizzo, E.F.; Frank, F.C. 2006. Land-use options for Del Plata Basin in South America: Tradeoffs analysis based on ecosystem service provision. *Ecol. Econ.* 57: 140-151.

Viglizzo, E.F.; Jobbágy, E. 2010. Expansión de la frontera agropecuaria en Argentina y su impacto ecológico-ambiental. Ediciones INTA. Buenos Aires.

Wood, S.; Sebastian, K. Scherr, S.J. 2000. Pilot Analysis of Global Ecosystems: Agroecosystems, International Food Policy Research Institute and World Resources Institute, Washington, DC.



## CAPÍTULO 2

### **Actinobacterias: su potencial para remover y degradar plaguicidas**

Juliana M. Saez<sup>1</sup>, Analia Alvarez<sup>1,2</sup>, María J. Amoroso<sup>1,3,4</sup>, Claudia S. Benimeli<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI-CONICET), Avenida Belgrano y Pasaje Caseros, 4000 Tucumán, Argentina; <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán, Miguel Lillo 205, 4000 Tucumán, Argentina;

<sup>3</sup>Universidad del Norte Santo Tomás de Aquino, 9 de Julio 165, 4000 Tucumán, Argentina;

<sup>4</sup>Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, Ayacucho 491, 4000 Tucumán, Argentina

E-mail: cbenimeli@yahoo.com.ar

### **Introducción**

Muchos compuestos químicos fabricados por el hombre tienen estructuras que no se encuentran normalmente en la naturaleza por lo que se los ha llamado xenobióticos (Santoyo Telope, 2009). El uso a gran escala de estos compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, ha desembocado en un serio y complejo incremento de la contaminación ambiental (Volke Sepúlveda y Velasco Trejo, 2002). Estos contaminantes crean numerosos problemas ambientales, incluyendo el impacto perjudicial sobre los ciclos biogeoquímicos y la salud ambiental, y los efectos tóxicos sobre organismos a los cuales no están destinados (Rayu *et al.*, 2012). Dichos efectos dependen de la concentración en la que se encuentren las sustancias, de su persistencia y de su biodisponibilidad, pudiendo ocasionar desde efectos no letales, como el desplazamiento temporal de algunas especies, hasta la muerte de poblaciones enteras (Ramírez Romero y Mendoza Cantú, 2008).

Los plaguicidas ocupan un lugar importante dentro de las sustancias químicas a las que el hombre está expuesto (Villaamil Lepori *et al.*, 2013). Los plaguicidas sintéticos surgieron entre 1930 y 1940 y, a partir de entonces, su uso ha sido múltiple y variado, aunque la agricultura es la actividad que más emplea este tipo de compuestos, consumiendo el 85 % de la producción mundial con el fin de controlar químicamente las diversas plagas que reducen la cantidad y calidad de las cosechas de alimentos y de otros vegetales (Al-Saleh y Obuekwe, 2005). Los plaguicidas se utilizaron también en salud pública para el control de enfermedades transmitidas por vectores, como la malaria, el dengue y la enfermedad de Chagas, entre otras (Zaim y Guillet, 2002). Así,

los beneficios de los plaguicidas en el control de plagas y vectores de enfermedades, así como en el incremento de la producción agrícola, son innegables. Sin embargo, con el paso de los años también se hicieron evidentes los efectos indeseables de estos. El uso de estos productos químicos está acompañado por los riesgos que implican para la salud humana y el medioambiente a causa de su potencial tóxico, alta persistencia, bioconcentración y, sobre todo, su toxicidad no específica (Bempah y Donkor, 2011). Independientemente de sus beneficios, los plaguicidas son sustancias químicas deliberadamente tóxicas, creadas para interferir sobre algún sistema biológico en particular y que carecen de selectividad real. Por esto, afectan simultáneamente, en mayor o menor grado, no solo a la “especie blanco” sino también a otras categorías de seres vivos, particularmente al ser humano (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Frente a lo expuesto, es imperativa la aplicación de tecnologías ambientalmente idóneas para la restauración de estos ecosistemas. En este contexto, desde hace algunas décadas, la necesidad de remediar los diferentes sitios contaminados ha llevado al desarrollo de tecnologías orientadas a la descontaminación del medioambiente, tales como la biorremediación. Esta herramienta consiste en la explotación de actividades biológicas para la mitigación, y si es posible, la eliminación completa de los efectos nocivos causados por los contaminantes ambientales en un sitio determinado y puede llevarse a cabo mediante el uso de diferentes organismos, desde bacterias hasta plantas, o sus derivados (De Lorenzo, 2008; Wood, 2008). En este contexto, la degradación microbiana es considerada el principal mecanismo responsable de la mitigación de plaguicidas en suelos (Bazot y Lebeau, 2009). En particular, las actinobacterias son reconocidas por su gran potencial como degradadoras y por ello se destacan como buenas candidatas para su aplicación en procesos de biorremediación (Briceño *et al.*, 2013; Polti *et al.*, 2014).

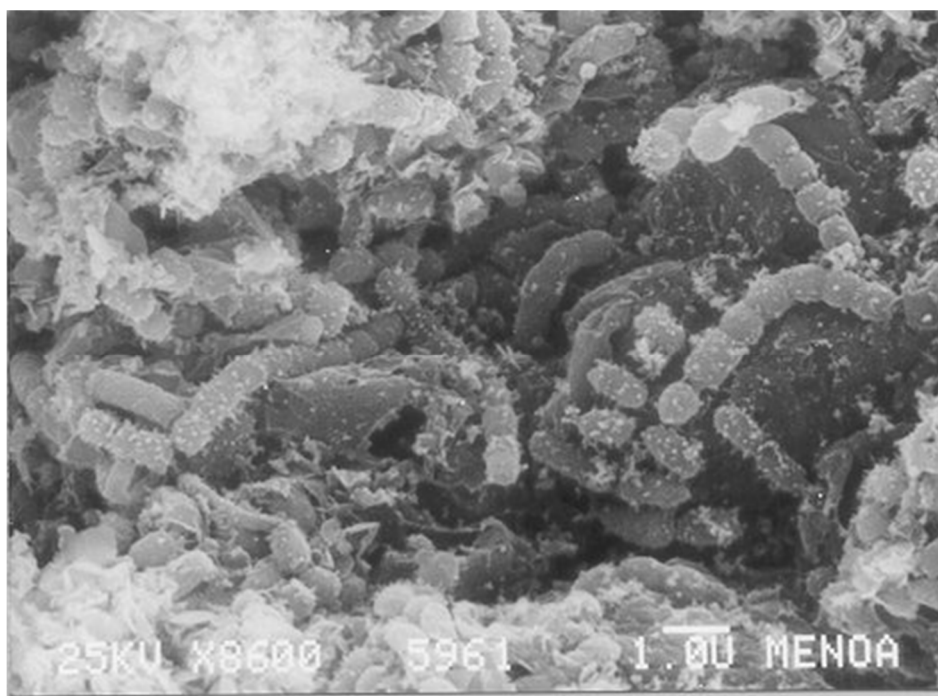
### **Actinobacterias: características generales**

La categoría Actinobacteria constituye una de las principales y más diversas unidades taxonómicas dentro del Dominio Bacteria (Eisenlord *et al.*, 2012), y se encuentra constituido por 5 clases, 19 órdenes, 50 familias y 221 géneros (Goodfellow *et al.*, 2012).

Las actinobacterias son bacterias Gram-positivas o Gram-variables y se caracterizan por presentar una pared celular rígida que contiene ácido murámico. Estas bacterias fueron históricamente conocidas por poseer un elevado contenido de bases guanina

más citosina (G+C) en su ADN (55-75 mol%); sin embargo este paradigma se rompió hace relativamente poco tiempo ya que existen nuevas especies que no responden a esta regla general (Ventura *et al.*, 2007; Ghai *et al.*, 2012).

El *phylum* incluye organismos fenotípicamente diversos que exhiben una amplia variedad de morfologías, desde células cocoides (por ejemplo, las pertenecientes al género *Micrococcus*) o coco-bacilares (*Arthrobacter*) hasta hifas fragmentadas (*Nocardia*) o micelio permanente altamente diferenciado y ramificado (*Streptomyces*) (Figura 1). También poseen diversas propiedades fisiológicas y metabólicas tales como la producción de enzimas extracelulares y la formación de una amplia variedad de metabolitos secundarios con actividad biológica como antibióticos, antivirales, anticancerígenos, inmunosupresores y otros compuestos de interés industrial (Ventura *et al.*, 2007; Adegboye y Babalola, 2012). En particular, la producción de potentes antibióticos es un rasgo que ha convertido a algunas especies del género *Streptomyces* en los principales organismos productores de antibióticos explotados por la industria farmacéutica (Berdy, 2005).



**Figura 1.** Microfotografía tomada con microscopio electrónico de barrido de *Streptomyces* sp. M7, cultivado en medio mínimo suplementado con 0,6 g L<sup>-1</sup> de glucosa.

Debido a su capacidad para colonizar diferentes tipos de sustratos, las actinobacterias presentan diversos hábitats y estilos de vida. La mayoría de ellas son de vida libre, como las saprófitas con metabolismo aerobio que se nutren a partir de los residuos de otros organismos mediante la secreción de enzimas hidrolíticas (por ejemplo, algunos

miembros del género *Streptomyces*). Otras viven en simbiosis, como el género *Frankia*, que forma nódulos para fijar nitrógeno en aproximadamente 25 géneros de plantas leñosas. Asimismo, algunas actinobacterias son patógenas obligadas u oportunistas de animales o plantas como *Mycobacterium tuberculosis* y *Streptomyces scabies* (patógeno de la papa y otros tubérculos). También se han reportado ciertas especies del género *Actinomyces* como habitantes normales del tejido gingival y miembros del género *Bifidobacterium* spp. como habitantes del tracto gastrointestinal (Ensign, 1990).

Las actinobacterias se encuentran entre los colonizadores más exitosos de la biosfera ya que pueden vivir tanto en ambientes terrestres como acuáticos, dulces y marinos, aunque predominan sobre todo en suelos, donde constituyen un componente sustancial de la microbiota, desempeñando un papel crucial en la descomposición y reciclaje de biomateriales y la formación de humus (Ventura *et al.*, 2007; DeAngelis *et al.*, 2011; Newton *et al.*, 2011). También se conocen actinobacterias endófitas estrechamente asociadas a plantas y capaces de generar efectos adversos y beneficiosos en ellas (Hasegawa *et al.*, 2006).

En general, las condiciones óptimas para su crecimiento son temperaturas de 25 a 30 °C, aunque también se han descrito representantes termotolerantes y termofílicos, como algunas especies de *Thermomonospora* y *Thermoactinomyces*. Suelen crecer en un rango de pH de 5 a 9, con un óptimo cercano al neutro. En relación con los requerimientos de oxígeno, estos microorganismos son en su mayoría aerobios, aunque existen algunos anaerobios facultativos o anaerobios. Son heterótrofos, por lo cual pueden utilizar fuentes de carbono simples y complejas (Solans y Vobis, 2003; Franco-Correa, 2008). Las actinobacterias son frecuentemente descritas como organismos de crecimiento lento. Sus colonias se pueden visualizar en medio sólido a los 3 o 4 días de incubación, aunque el desarrollo del micelio aéreo maduro con esporas puede tardar entre 7 y 14 días, y en algunas cepas hasta más de un mes de incubación. El crecimiento en medios líquidos requiere una agitación constante, que se recomienda a velocidades entre 150 a 200 rpm para suministrar la mejor aireación posible. Así, las actinobacterias pueden crecer formando pellets o agrupaciones de filamentos en medios líquidos (Franco-Correa, 2008).

Estas bacterias exhiben diversas propiedades fisiológicas y metabólicas, tales como la producción de enzimas extracelulares y la formación de una amplia variedad de metabolitos secundarios (Goodfellow y Fiedler, 2010). En particular, los miembros del género *Streptomyces* constituyen la fuente más rica de productos naturales, incluyendo antibióticos y agentes antitumorales (Berdy 2005; Newman y Cragg 2007; Olano *et al.*, 2009). Se estima que aproximadamente dos tercios de los antibióticos

naturales son producidos por actinobacterias, y alrededor del 75 % de estos son producidos por miembros del género *Streptomyces* (Franco-Correa *et al.*, 2010). Las actinobacterias también producen otras moléculas bioactivas tales como inhibidores enzimáticos, inmunosupresores, fitotoxinas, bioplaguicidas, biosurfactantes, nanopartículas, probióticos y enzimas implicadas en la degradación de los polímeros complejos (Berdy, 2005; Ballav *et al.*, 2012; Manivasagan *et al.*, 2013). Esta gran versatilidad metabólica las convierte en importantes herramientas para aplicaciones farmacéuticas, médicas y biotecnológicas, tales como la biorremediación.

## **Rol de las actinobacterias en procesos de biorremediación**

Las actinobacterias poseen diversas propiedades que las hacen buenas candidatas para su aplicación en procesos de biorremediación. Esto se debe principalmente a que producen enzimas extracelulares que degradan una gran variedad de compuestos orgánicos complejos (Amoroso *et al.*, 2013). Por una parte, las pertenecientes al género *Streptomyces* pueden ser adecuadas para la inoculación de suelos como consecuencia de su crecimiento filamentoso, el cual favorece la colonización de las partículas del suelo, su colonización semiselectiva de sustratos y su capacidad de ser manipuladas genéticamente. Por otra parte, como son habitantes naturales de los sistemas edáficos ya se encuentran adaptadas a ese hábitat (Shelton *et al.*, 1996; Anderson y Wellington, 2001). Además, una ventaja adicional es que estos microorganismos pueden diferenciarse en esporas que ayudan en su difusión y persistencia en el ambiente. Esto puede ser visto como una adaptación a la vida en el suelo, especialmente en condiciones ambientales extremas, como escasez de nutrientes, alto contenido de sales, bajo pH, así como la presencia de compuestos contaminantes (Kothe *et al.*, 2010).

Asimismo, se demostró que especies del género *Streptomyces* son dominantes en suelos contaminados con metales pesados, en comparación con suelos prístinos en donde las actinobacterias constituían alrededor del 20 % de la población microbiana, indicando que estos microorganismos podrían desarrollar estrategias especiales para sobrevivir en diferentes concentraciones de metales pesados (Kothe *et al.*, 2010).

Por un lado, debido a las características mencionadas anteriormente, las actinobacterias se han investigado con fines biotecnológicos, desde hace más de 20 años, poniendo especial énfasis en el estudio de sus interacciones con sustancias acumuladas en el ambiente, tanto orgánicas como inorgánicas. Por ejemplo, se llevaron a cabo diversos estudios empleando actinobacterias para la biorremediación

de metales y metaloides, tales como zinc (Attwa y El Awady, 2011), níquel (Haferburg *et al.*, 2009), cadmio (Siñeriz *et al.*, 2009), cobre (Dávila Costa *et al.*, 2011, 2012), boro (Moraga *et al.*, 2013) y cromo (Politi *et al.*, 2014; Aparicio *et al.*, 2015), entre otros. Por otro lado, entre las sustancias orgánicas, se demostró la remoción de compuestos fenólicos (Roy *et al.*, 2014), hidrocarburos aromáticos policíclicos (Bourguignon *et al.*, 2014b; Isaac *et al.*, 2015), colorantes textiles (Saratale *et al.*, 2009) y diversos plaguicidas (Benimeli *et al.*, 2008; Fuentes *et al.*, 2010, 2011, Álvarez *et al.*, 2012, 2015; Saez *et al.*, 2012, 2014, 2015), entre otros.

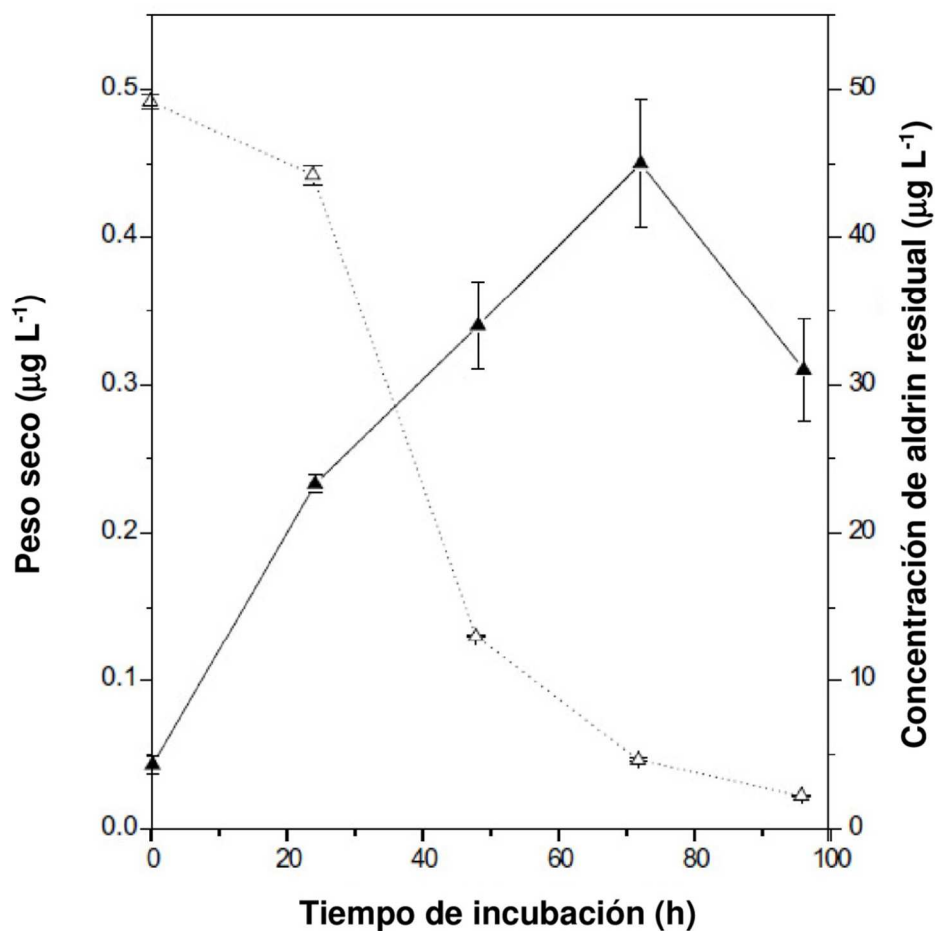
## **Biorremediación de plaguicidas por actinobacterias**

Diferentes autores han demostrado la capacidad de las actinobacterias para remover distintos tipos de plaguicidas; incluso en algunos casos se ha comprobado la degradación, mediante oxidación, dechlorinación y dealquilación, de diversos plaguicidas, como alaclor, clordano, clorpirifos, deltrametrina, diuron, lindano y metoxicloro por actinobacterias (Durães Sette *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2006; Benimeli *et al.*, 2007a, 2007b; Chen *et al.*, 2011; Briceño *et al.*, 2012; Fuentes *et al.*, 2013a; 2013b).

Entre los géneros de actinobacterias degradadoras de plaguicidas se han descrito *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Streptomyces*, entre otros (De Schrijver y De Mot, 1999). Este último, se ha destacado en numerosos estudios de biorremediación debido a las características mencionadas anteriormente, las cuales les confieren una gran habilidad para colonizar y sobrevivir en sitios contaminados (Kothe *et al.*, 2010). Además, presentan otras propiedades interesantes que contribuyen a aumentar su capacidad de degradación de compuestos orgánicos tóxicos, como la formación de biofilms y la producción de bioemulsificantes que pueden aumentar la biodisponibilidad de dichos tóxicos (Colin *et al.*, 2013).

En este contexto, el Laboratorio de Biotecnología de Actinobacterias (PROIMI-CONICET) ha desarrollado una línea de investigación abocada al estudio de actinobacterias con capacidad para biorremediar plaguicidas organoclorados y metales pesados. Para ello, Benimeli *et al.* (2003) y Fuentes *et al.* (2010) aislaron y caracterizaron actinobacterias, principalmente pertenecientes al género *Streptomyces*, a partir de muestras de suelos y sedimentos contaminados con plaguicidas organoclorados, con capacidades extraordinarias para tolerar, remover y degradar dichos contaminantes ambientales.

Inicialmente, Benimeli *et al.* (2003) aislaron 93 actinobacterias a partir de sedimentos contaminados con plaguicidas organoclorados y metales pesados, de las cuales más del 60 % presentaron capacidad para crecer en presencia de diversos plaguicidas tales como aldrín, DDT, metoxicloro y lindano, entre otros (Figura 2).



**Figura 2.** Determinación de crecimiento microbiano (▲) y remoción de aldrin (□) para la actinobacteria *Streptomyces* sp. M7 cultivada en medio mínimo suplementado con aldrin 50 µg L<sup>-1</sup>. Benimeli *et al.* (2003).

Posteriormente se realizaron estudios de degradación de plaguicidas empleando el lindano, un plaguicida altamente clorado, como modelo de estudio y uno de los aislamientos previamente seleccionado, *Streptomyces* sp. M7. Dicho microorganismo fue capaz de crecer en presencia del plaguicida como única fuente de carbono, demostrando por primera vez la degradación de este por una actinobacteria sin acumulación intracelular (Benimeli *et al.*, 2007a). También se estudió la remoción de

lindano por *Streptomyces* sp. M7, utilizando medio extracto de suelo, el cual tiene una cantidad limitada de nutrientes. A pesar de ello, la actinobacteria fue capaz de crecer y remover el lindano, mostrando su gran potencial para la biorremediación (Benimeli *et al.*, 2007b).

Por un lado, Cuozzo *et al.* (2009) reportaron por primera vez una actividad específica de dechlorinasa en *Streptomyces* sp. M7; demostraron, mediante el uso de lindano como sustrato específico, que la síntesis de la enzima con actividad dechlorinasa fue inducida por la presencia del plaguicida en el medio de cultivo. Además, se identificaron en el extracto libre de células de *Streptomyces* sp. M7 los dos primeros metabolitos de la vía de degradación de lindano ( $\gamma$ -pentaclorociclohexeno y 1,3,4,6-tetracloro-1,4-ciclohexadieno), previamente reportados por Nagata *et al.* (2007) en la vía de degradación de *Sphingobium japonicum* UT26.

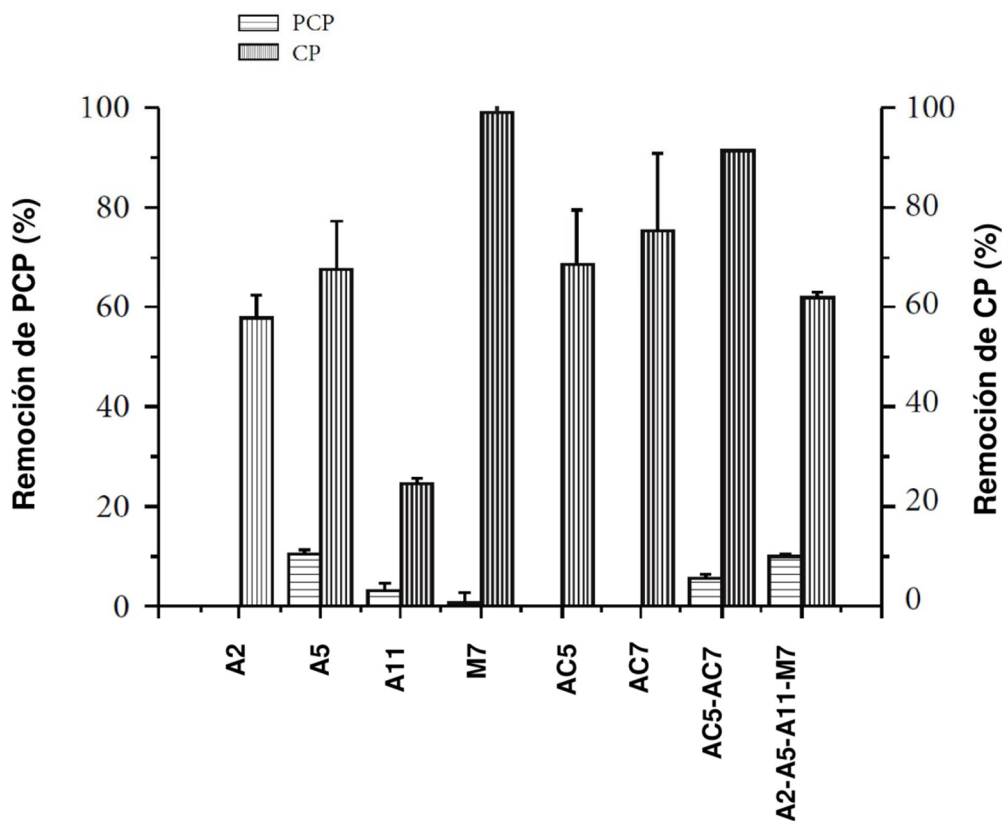
Por otro lado, Fuentes *et al.* (2010) aislaron 12 cepas de actinobacterias a partir de muestras de suelo colectadas en la Santiago del Estero, Argentina. En dicha localidad se encontró un depósito clandestino con más de 30 toneladas de plaguicidas en el terreno de la estación ferroviaria, lo que provocó una gran contaminación en el suelo y agua del lugar (Greenpeace, 2003). Las muestras de suelo se analizaron mediante cromatografía gaseosa y los resultados obtenidos manifestaron la presencia de residuos de diversos plaguicidas organoclorados, entre los que se destacan lindano, epóxido de heptacloro B, DDD, DDE, clordano, metoxicloro y aldrín (Fuentes *et al.*, 2010). Posteriormente se estudió la capacidad de las actinobacterias para biodegradar lindano, clordano y metoxicloro, demostrando que la mayoría de ellas fueron capaces de degradar uno o más plaguicidas, lo cual se evidenció mediante la presencia de iones cloruro liberados al medio de cultivo. Esto no resulta sorprendente ya que se ha demostrado que la capacidad de degradación de un cultivo depende en gran medida de su origen y el grado de adaptación de este (Pino *et al.*, 2011). Varios autores demostraron que el aislamiento de consorcios, tanto nativos como definidos, de sitios previamente expuestos al xenobiótico de interés tiene mayor probabilidad de éxito en la degradación o remoción de dicho compuesto. Esto puede explicarse debido a que la exposición prolongada de los microorganismos a ciertas condiciones extremas provoca una presión selectiva que permite la selección de microorganismos degradadores. Además, el tiempo en que los microorganismos presentes en el hábitat en estudio estuvieron expuestos a uno o más compuestos tóxicos posiblemente les permitió evolucionar hacia el desarrollo de enzimas en su metabolismo capaces de actuar sobre estos o tolerar elevadas concentraciones de estos (Carrillo Pérez *et al.*, 2004; Pino *et al.*, 2011).



En estudios más recientes se demostró también la capacidad de cultivos puros y mixtos de *Streptomyces* de remover y degradar distintos plaguicidas organoclorados en medios fangosos y suelos (Cuozzo *et al.*, 2012; Fuentes *et al.*, 2011, 2013a; Bourguignon *et al.*, 2014a) e incluso en presencia de mezclas de plaguicidas (Fuentes *et al.*, 2013b) (Figura 3), resaltando así la potencialidad de estos para ser empleados como agentes para biorremediar ambientes contaminados con plaguicidas.

## **Inmovilización de actinobacterias para la biorremediación de plaguicidas**

La inmovilización celular se ha definido como el confinamiento físico de células microbianas viables a un cierto espacio definido, de tal manera que se limite su migración, conservando sus actividades catalíticas y a su vez, mejorando la estabilidad biológica y física de estas (Siripattanakul *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2013). Por una parte, esta técnica ofrece varias ventajas en comparación con el sistema convencional de células en suspensión, tales como la retención de una mayor concentración de microorganismos en el reactor, una fácil separación sólido-líquido, elevada actividad metabólica y una mayor viabilidad celular (semanas o meses) (Yañez-Ocampo *et al.*, 2009; 2011; Ahamad y Kunhi, 2011; Liu *et al.*, 2012). Además, la matriz de inmovilización puede proporcionar a las células mayor tolerancia frente a perturbaciones ambientales, tales como cambios en la temperatura, pH, y presencia de sustancias tóxicas, resultando así particularmente interesante para su empleo en procesos de biorremediación (Siripattanakul *et al.*, 2008). Por otra parte, el empleo de microorganismos inmovilizados podría ser rentable ya que se pueden reutilizar fácilmente varias veces sin una pérdida significativa de la actividad microbiana (Martins *et al.*, 2013; Nigam *et al.*, 2009).

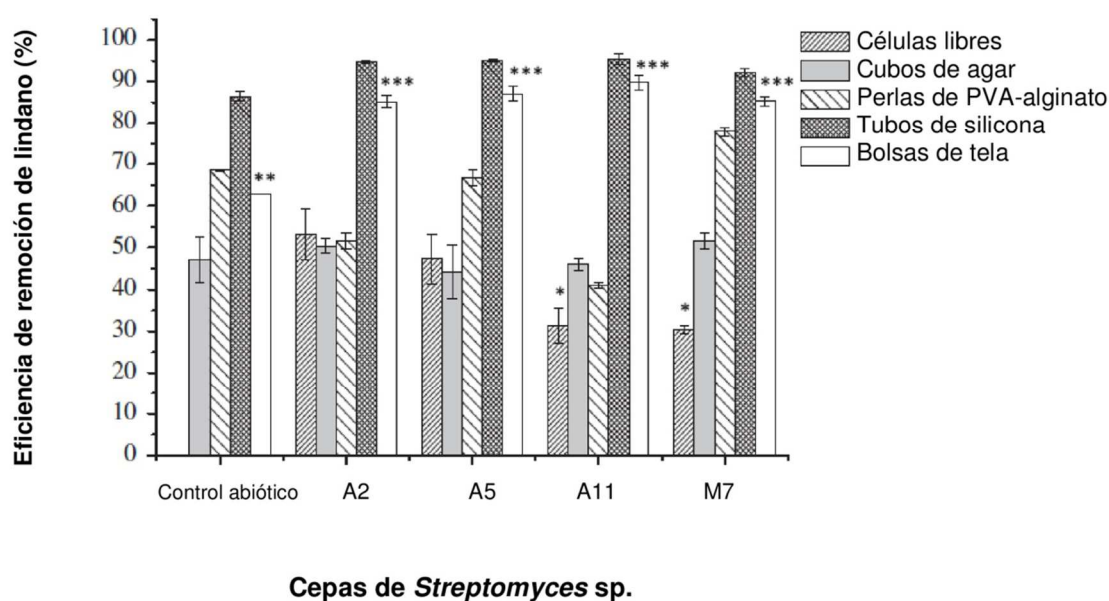


### Cultivos puros y mixtos de *Streptomyces* sp.

**Figura 3.** Remoción de pentaclorofenol (PCP) y clorpirifos (CP) por cultivos puros y mixtos de *Streptomyces* en medio mínimo suplementado con una mezcla de ambos plaguicidas (1,66 mg L<sup>-1</sup> cada uno). Fuentes *et al.* (2013b).

Todas estas características han contribuido al creciente interés que ha recibido esta técnica en diferentes campos, incluyendo el tratamiento de aguas residuales, suelos y sedimentos contaminados (Bazot *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2013). En particular, el empleo de actinobacterias inmovilizadas demostró ser una herramienta muy prometedora para la biorremediación de plaguicidas y otros contaminantes ambientales. En este contexto, Saez *et al.* (2012) estudiaron la capacidad de cultivos puros y mixtos de *Streptomyces* inmovilizados en diferentes soportes (perlas de alginato, cubos de agar, tubos de silicona y bolsas de tela) para remover lindano en cultivos líquidos y demostraron que la eficiencia de remoción alcanzada por los microorganismos inmovilizados en todos los soportes fue significativamente mayor que aquella lograda por las células libres; los cultivos inmovilizados en bolsas de tela

fueron los que mostraron el mejor rendimiento en comparación con los otros soportes evaluados (Figura 4). Además, un consorcio definido constituido por cuatro cepas de *Streptomyces* inmovilizado en dicho soporte fue reutilizado durante tres ciclos consecutivos obteniéndose hasta un 71,5 % de remoción de lindano. Este resultado es muy interesante ya que una de las principales ventajas de la aplicación de células inmovilizadas para el tratamiento de contaminantes, en comparación con la utilización de células libres, es la posibilidad real de reciclaje de estas para su utilización en ciclos posteriores (Liu *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Eficiencia de remoción de lindano (%) de cultivos puros de *Streptomyces* sp. A2, A5, A11 y M7 libres e inmovilizados en cubos de agar, cultivados en medio mínimo suplementado con lindano 2 mg L<sup>-1</sup>. Saez *et al.* (2012).

Posteriormente, dicho consorcio inmovilizado fue capaz de biorremediar sistemas de lodos contaminados con 50 mg kg<sup>-1</sup> de lindano, demostrándose su capacidad no solo de remover el plaguicida, sino también de degradarlo. Esto se comprobó mediante la determinación de iones cloruro liberados al medio y mediante la identificación de tres metabolitos intermedios de la degradación de lindano, el 1,2-diclorobenceno, el 1,4-diclorobenceno y el  $\gamma$ -pentaclorociclohexeno (Saez *et al.*, 2014, 2015). Por un lado, se comprobó la sobrevivencia de los cuatro microorganismos que conforman el consorcio en estudio al final del ensayo de biorremediación en sistemas de lodos, demostrando así

su estabilidad durante un período prolongado y su resistencia frente a elevadas concentraciones de lindano (Saez *et al.*, 2015). Esto resulta de gran importancia para la aplicación práctica de este en procesos de biorremediación ya que la estabilidad durante el almacenamiento y operación a largo plazo es un factor esencial para garantizar el éxito del empleo de células inmovilizadas (Liu *et al.*, 2009).

Por otro lado, se evaluó el empleo de cultivos puros y mixtos de *Streptomyces* para la remoción de otros plaguicidas e incluso mezclas de estos. Por ejemplo, Briceño *et al.* (2013) revelaron que *Streptomyces* sp. AC1-6 inmovilizado en perlas de alginato logró casi un 20 % más en la remoción de diazinón que las células libres. También confirmaron la reutilización de las células encapsuladas obteniendo más del 50 % de remoción del plaguicida después del tercer cultivo en lote. Además, se evaluó la remoción de una mezcla de clorpirifos y pentaclorofenol mediante el empleo de un cultivo mixto de *Streptomyces* inmovilizado en perlas de alginato. La eficiencia de remoción del consorcio bacteriano aumentó más de 30 % para clorpirifos y casi 10 % para pentaclorofenol cuando se emplearon las células inmovilizadas en lugar de las células libres en suspensión (Fuentes *et al.*, 2013b).

## **Empleo de actinobacterias y especies vegetales para la remoción de plaguicidas**

Dentro de la biorremediación, la fitorremediación comprende el uso de las plantas y sus productos, conjuntamente con los microorganismos asociados a estas para el saneamiento de sitios contaminados (Schwitzguébel *et al.*, 2009). El desarrollo de esta tecnología para la restauración de la estructura y función de suelos se encuentra en franca expansión, ya que su aplicación es menos invasiva y menos costosa que la implementación de mecanismos de remediación físico-químicos (Becerra-Castro *et al.*, 2011).

Por una parte, las plantas juegan un papel esencial y reconocido en el tratamiento de suelos contaminados con compuestos orgánicos, ya que pueden absorberlos y degradarlos en su interior o eliminarlos del suelo al transportarlos a la parte aérea y promover su volatilización (fitovolatilización). Por otra parte, las plantas también pueden estimular la degradación de compuestos orgánicos en la rizósfera mediante la liberación de exudados radiculares, y la consecuente acumulación de carbono orgánico lábil en el suelo (Rentz *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2006). Este queda disponible para los microorganismos que habitan en él, lo que incrementa sus tasas de

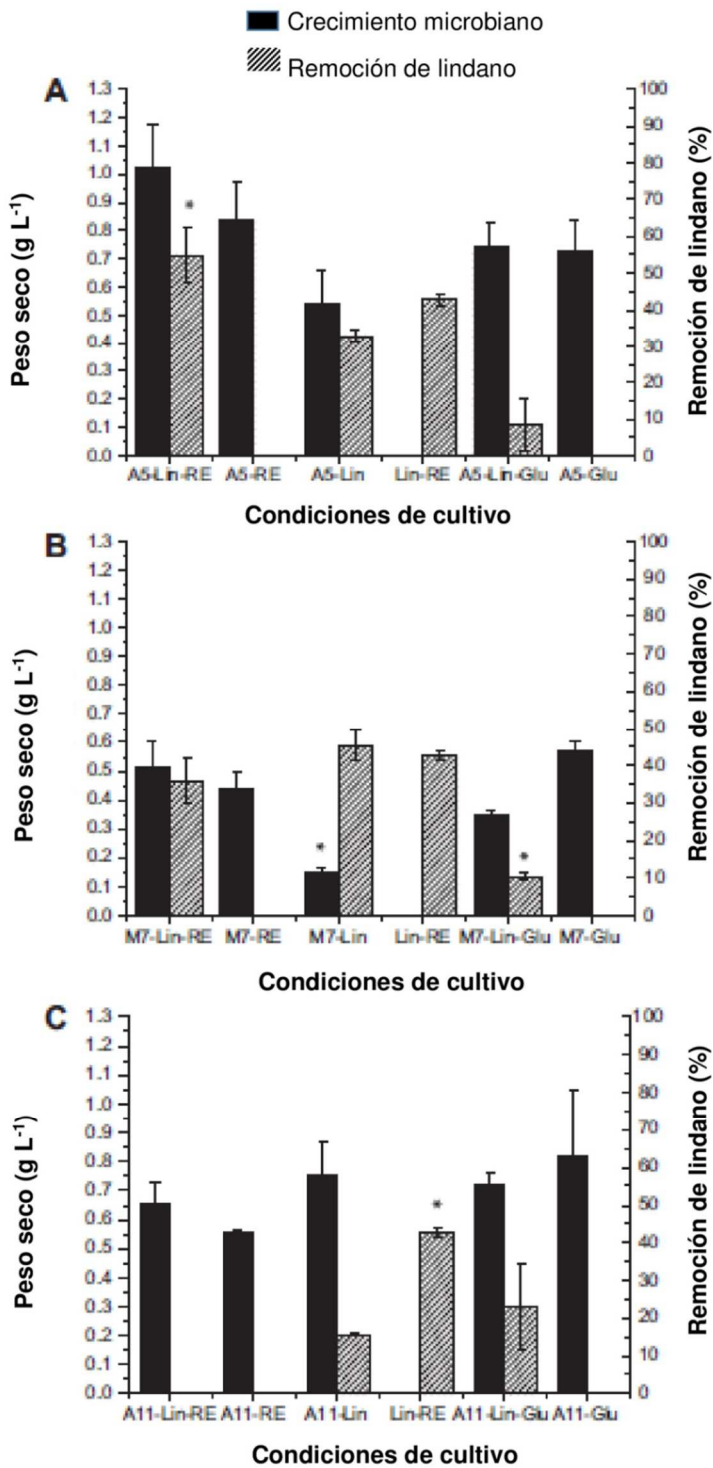
crecimiento (Blagodatskaya *et al.*, 2009) y puede promover la degradación microbiana de xenobióticos. También se ha comprobado que los exudados radiculares de algunas plantas aumentan significativamente la desorción de plaguicidas orgánicos en suelos contaminados, aumentando así su biodisponibilidad (Kidd *et al.*, 2008; Muratova *et al.*, 2009).

Existen numerosos estudios que demuestran la degradación de xenobióticos tales como fenantreno y dioxano mediante el empleo de exudados radiculares de distintas plantas y de los microorganismos del suelo (Kelley *et al.*, 2001; Rentz *et al.*, 2004). El maíz, por ejemplo, presenta capacidad como planta fitorremediadora y sus exudados radiculares se utilizaron para tratar suelos contaminados con herbicidas como atrazina (Wenger *et al.*, 2005) o insecticidas como el diclorodifeniltricloroetano (DDT) (Luo *et al.*, 2006).

Por una parte, en este contexto, el empleo de actinobacterias conjuntamente con especies vegetales o sus extractos radiculares para la fitorremediación de plaguicidas ha presentado resultados muy promisorios. Álvarez *et al.* (2012a) evaluaron el efecto de exudados radiculares de maíz (ERs) sobre el crecimiento bacteriano y la remoción de lindano por varias cepas de *Streptomyces*, previamente aisladas de sitios contaminados con plaguicidas. Los resultados demostraron que todas las cepas fueron capaces de crecer en medio de cultivo mínimo suplementado con ERs como única fuente de carbono, lo que sugiere que estos microorganismos son competitivos a nivel de la rizófora. Por otra parte, los ERs influyeron significativamente en la eliminación de  $\gamma$ -HCH por *Streptomyces* sp. A5 y M7, alcanzando porcentajes de remoción de aproximadamente 55 y 35 %, respectivamente (Figura 5). Así, los ERs pueden haber favorecido la remoción del plaguicida por varias causas. En primer lugar debido a una estimulación en el crecimiento de las actinobacterias mediante un posible cometabolismo, en segundo lugar debido a la actividad específica de dechlorinasa propia de los ERs, la cual puede haber contribuido también a la disipación del plaguicida, y en tercer lugar debido a la presencia de una actividad de tipo micelar, que podría haber aumentado la biodisponibilidad del lindano en el medio de cultivo. En este sentido, la fitoestimulación de actinobacterias degradadoras de plaguicidas con ERs se propone como una estrategia exitosa para la remediación de ambientes contaminados con estos xenobióticos (Álvarez *et al.*, 2012b).

En un estudio posterior, Álvarez *et al.* (2015) comprobaron la capacidad de las cepas de *Streptomyces* de crecer en hidroponía con plantas de maíz como única fuente de carbono, confirmando que estas o los ERs de estas representan una fuente viable de carbono y energía para las actinobacterias. Además se realizaron estudios de remoción de lindano en suelo implantado con plantas de maíz y se observó que la

disipación del plaguicida fue similar en los sistemas inoculados y no inoculados con las actinobacterias. Sin embargo, el sistema inoculado con el cultivo mixto de *Streptomyces* condujo a un mayor índice de vigor de las plantas de maíz, sugiriendo que las actinobacterias pueden proteger a la planta de los efectos adversos del plaguicida.



## Conclusiones

Los plaguicidas juegan un papel importante en el éxito de la agricultura moderna y en la producción de alimentos. Sin embargo, el manejo inadecuado de estos puede causar graves impactos sobre la salud humana, la calidad del ambiente y de los alimentos. Frente a esta problemática, la biorremediación se ha convertido en una alternativa económica, viable y ecoamigable para el tratamiento de sitios contaminados con plaguicidas y otros contaminantes. En este contexto, las actinobacterias, y en particular el género *Streptomyces*, han demostrado excelentes propiedades para la remoción y degradación de plaguicidas. Por ello el empleo de actinobacterias, ya sean libres, inmovilizadas o combinadas con especies vegetales, se propone como una herramienta promisoría para la biorremediación de ambientes contaminados con estos xenobióticos. Además su reintroducción al medioambiente no causaría desequilibrios ecológicos.

## Bibliografía

- ADEGBOYE, M.F.;BABALOLA, O.O. 2012. TAXONOMY AND ECOLOGY OF ANTIBIOTIC PRODUCING ACTINOMYCETES, AFRICAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH, 7:2255–2261.
- AHAMAD, P.Y.A.; KUNHI, A.A.M. 2011. ENHANCED DEGRADATION OF PHENOL BY *PSEUDOMONAS* SP. CP4 ENTRAPPED IN AGAR AND CALCIUM ALGINATE BEADS IN BATCH AND CONTINUOUS PROCESSES, BIODEGRADATION, 22:253–265.
- AL-SALEH, E.S.; OBUEKWE, C. 2005. INHIBITION OF HYDROCARBON BIOREMEDIATION BY LEAD IN A CRUDE OIL-CONTAMINATED SOIL, INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION, 56:1–7.
- ÁLVAREZ, A.; BENIMELI, C.S.; SAEZ, J.M.; FUENTES, M.S.; CUOZZO, S.A.; POLTI, M.A.; AMOROSO, M.J. 2012. BACTERIAL BIO-RESOURCES FOR REMEDIATION OF HEXACHLOROCYCLOHEXANE, INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, 13:15086–15106.
- ÁLVAREZ, A.; BENIMELI, C.S.; SAEZ, J.M.; GIULIANO, A.; AMOROSO, M.J. 2015. LINDANE REMOVAL USING *STREPTOMYCES* STRAINS AND MAIZE PLANTS: A BIOLOGICAL SYSTEM FOR REDUCING PESTICIDES IN SOILS, PLANT AND SOIL, 395:401–413.
- ÁLVAREZ, A.; YAÑEZ, M.L.; BENIMELI, C.S.; AMOROSO, M.J. 2012. MAIZE PLANTS (*ZEA MAYS*) ROOT EXUDATES ENHANCE LINDANE REMOVAL BY NATIVE *STREPTOMYCES* STRAINS, INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION, 66:14–18.
- AMOROSO, M.J.; BENIMELI, C.S.; CUOZZO, S.A. 2013. ACTINOBACTERIA: APPLICATION IN BIOREMEDIATION AND PRODUCTION OF INDUSTRIAL ENZYMES, CRC PRESS LLC, FLORIDA, ESTADOS UNIDOS.

ANDERSON, A.S.; WELLINGTON E.M.H. 2001. THE TAXONOMY OF *STREPTOMYCES* AND RELATED GENERA, INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, 51:797–814.

APARICIO, J.; SIMÓN SOLÁ, M.Z.; BENIMELI, C.S.; AMOROSO, M.J.; POLTI, M.A. 2015. VERSATILITY OF *STREPTOMYCES* SP. M7 TO BIOREMEDIATE SOILS CO-CONTAMINATED WITH Cr(VI) AND LINDANE, ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY, 116:34–9.

ATTWA, A.I.; EL AWADY, M.E. 2011. BIOREMEDIATION OF ZINC BY *STREPTOMYCES AUREOFACIENES*, JOURNAL OF APPLIED SCIENCES, 11:873–877.

BALLAV, S.; DASTAGER, S.G.; KERKAR, S. 2012. BIOTECHNOLOGICAL SIGNIFICANCE OF ACTINOBACTERIAL RESEARCH IN INDIA, RECENT RESEARCH IN SCIENCE AND TECHNOLOGY, 4:31–39.

BAZOT, S.; BOIS, P.; JOYEUX, C.; LEBEAU, T. 2007. MINERALIZATION OF DIURON [3-(3,4-DICHLOROPHENYL)-1, 1-DIMETHYLUREA] BY CO-IMMOBILIZED *ARTHROBACTER* SP. AND *DELFTIA ACIDOVORANS*, BIOTECHNOLOGY LETTERS, 29:749–754.

BAZOT, S.; LEBEAU, T. 2009. EFFECT OF IMMOBILIZATION OF A BACTERIAL CONSORTIUM ON DIURON DISSIPATION AND COMMUNITY DYNAMICS, BIORESOURCE TECHNOLOGY, 100:4257–4261,

BECERRA CASTRO, C.; KIDD, P.S.; PRIETO FERNÁNDEZ, Á.; WEYENS, N.; ACEA, M.J.; VANGRONSVELD, J. 2011. ENDOPHYTIC AND RHIZOPLANE BACTERIA ASSOCIATED WITH *CYTISUS STRIATUS* GROWING ON HEXACHLOROCYCLOHEXANE-CONTAMINATED SOIL: ISOLATION AND CHARACTERISATION, PLANT AND SOIL, 340:413–433.

BEMPAH, C.K.; DONKOR, A.K. 2011. PESTICIDE RESIDUES IN FRUITS AT THE MARKET LEVEL IN ACCRA METROPOLIS, GHANA, A PRELIMINARY STUDY, ENVIRONMENTAL MONITORING AND ASSESSMENT, 175:551–561.

BENIMELI, C.S.; AMOROSO, M.J.; CHAILE, A.P.; CASTRO, G.R. 2003. SCREENING OF ORGANOCHLORINE PESTICIDES REMOVAL BY AQUATIC STREPTOMYCETES, BIORESOURCE TECHNOLOGY, 89:133–138.

BENIMELI, C.S.; CASTRO, G.R.; CHAILE, A.P.; AMOROSO, M.J. 2007A. LINDANE UPTAKE AND DEGRADATION BY AQUATIC *STREPTOMYCES* SP. STRAIN M7, INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION, 59:148–155.

BENIMELI, C.S.; GONZÁLEZ, A.J.; CHAILE, A.P.; AMOROSO, M.J. 2007B. TEMPERATURE AND pH EFFECT ON LINDANE REMOVAL BY *STREPTOMYCES* SP. M7 IN SOIL EXTRACT, JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY, 47:468–473.

BERDY, J. 2005. BIOACTIVE MICROBIAL METABOLITES, JOURNAL OF ANTIBIOTICS, 58:1–26.

BLAGODATSKAYA, E.; BLAGODATSKY, S.; ANDERSON, T.; KUZYAKOV, Y. 2009. CONTRASTING EFFECTS OF GLUCOSE, LIVING ROOTS AND MAIZE STRAW ON MICROBIAL GROWTH KINETICS AND SUBSTRATE AVAILABILITY IN SOIL, EUROPEAN JOURNAL OF SOIL SCIENCE, 60:186–197.

BOURGUIGNON, N.; FUENTES, M.S.; BENIMELI, C.S.; CUOZZO, S.A.; AMOROSO, M.J. 2014A. AEROBIC REMOVAL OF METHOXYCHLOR BY A NATIVE *STREPTOMYCES* STRAIN: IDENTIFICATION OF INTERMEDIATE METABOLITES, INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION, 96:80–86.

BOURGUIGNON, N.; ISAAC, P.; ALVAREZ, H.; AMOROSO, M.J.; FERRERO, M.A. 2014B. ENHANCED POLYAROMATIC HYDROCARBON DEGRADATION BY ADAPTED CULTURES OF ACTINOMYCETE STRAINS, JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY, 54:1288–94.



- BRICEÑO, G.; FUENTES, M.S.; PALMA, G.; JORQUERA, M.A.; AMOROSO, M.J.; DIEZ, M.C. 2012. CHLORPYRIFOS BIODEGRADATION AND 3,5,6-TRICHLORO-2-PYRIDINOL PRODUCTION BY ACTINOBACTERIA ISOLATED FROM SOIL, INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION, 73: 1–7.
- BRICEÑO, G.; FUENTES, M.S.; RUBILAR, O.; JORQUERA, M.; TORTELLA, G.; PALMA, G.; AMOROSO, M.J.; DIEZ, M.C. 2013. REMOVAL OF THE INSECTICIDE DIAZINON FROM LIQUID MEDIA BY FREE AND IMMOBILIZED *STREPTOMYCES* SP. ISOLATED FROM AGRICULTURAL SOIL, JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY, 1–10.
- CARRILLO-PÉREZ E.; RUIZ-MANRÍQUEZ, A.; YEOMANS-REINA, H. 2004. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN CULTIVO MIXTO DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR DDT, REVISTA INTERNACIONAL DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL, 20, 69–75.
- CASTILLO, M.A.; FELIS, N.; ARAGÓN, P.; CUESTA, G.; SABATER, C. 2006. BIODEGRADATION OF THE HERBICIDE DIURON BY STREPTOMYCETES ISOLATED FROM SOIL, INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION, 58:196–202.
- CHEN, S.; LAI, K.; LI, Y.; HU, M.; ZHANG, Y.; ZENG, Y. 2011. BIODEGRADATION OF DELTAMETHRIN AND ITS HYDROLYSIS PRODUCT 3-PHENOXYBENZALDEHYDE BY A NEWLY ISOLATED *STREPTOMYCES AUREUS* STRAIN HP-S-01, APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 90:1471–83.
- COLIN, V.; PEREIRA, L.C.E.; VILLEGAS, L.B.; AMOROSO, M.J.; ABATE, C.M. 2013. PRODUCTION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF BIOEMULSIFIER FROM A CHROMIUM-RESISTANT ACTINOBACTERIA, CHEMOSPHERE, 90:1372–8.
- CUOZZO, S.A.; FUENTES, M.S.; BOURGUIGNON, N.; BENIMELI, C.S.; AMOROSO, M.J. 2012. CHLORDANE BIODEGRADATION UNDER AEROBIC CONDITIONS BY INDIGENOUS *STREPTOMYCES* STRAINS, INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION, 66:19–24.
- CUOZZO, S.A.; ROLLÁN, G.G.; ABATE, C.M.; AMOROSO, J.M. 2009. SPECIFIC DECHLORINASE ACTIVITY IN LINDANE DEGRADATION BY *STREPTOMYCES* SP. M7, WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 25:1539–1546.
- DÁVILA COSTA, J.S.; ALBARRACÍN, V.H.; ABATE, C.M. 2012. CUPRIC REDUCTASE ACTIVITY IN COPPER-RESISTANT *AMYCOLATOPSIS TUCUMANENSIS*, WATER AIR AND SOIL POLLUTION, 216:527–535.
- DÁVILA COSTA, J.S.; KOTHE, E.; ABATE, C.M.; AMOROSO, M.J. 2012. UNRAVELING THE *AMYCOLATOPSIS TUCUMANENSIS* COPPER-RESISTOME, BIOMETALS, 25:905–917.
- DE LORENZO, V. 2008. SYSTEMS BIOLOGY APPROACHES TO BIOREMEDIATION, CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, 19:579–589.
- DE SCHRIJVER, A.; DE MOT, R. 1999. DEGRADATION OF PESTICIDES BY ACTINOMYCETES, CRITICAL REVIEWS IN MICROBIOLOGY, 25:85–119.
- DEANGELIS, K.M.; ALLGAIER, M.; CHARVARRIA, Y.; FORTNEY, J.L.; HUGENHOLTZ, P.; SIMMONS, B.; SUBLETTE, K.; SILVER, W.L.; HAZEN, T.C. 2011. CHARACTERIZATION OF TRAPPED LIGNIN-DEGRADING MICROBES IN TROPICAL FOREST SOIL, PLOS ONE, 6:19306.
- DURÃES SETTE, L.; MENDONÇA ALVES DA COSTA, L.A.; MARSAIOLI, A.J.; MANFIO, G.P. 2004. BIODEGRADATION OF ALACHLOR BY SOIL STREPTOMYCETES, APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 64:712–717.

EISENLORD, S.D.; ZAK, D.R.; UPCHURCH, R.A. 2012 DISPERSAL LIMITATION AND THE ASSEMBLY OF SOIL ACTINOBACTERIA COMMUNITIES IN A LONG-TERM CHRONOSEQUENCE, *ECOLOGY AND EVOLUTION*, 2:538–549.

ENSIGN J.C. 1990. INTRODUCTION TO THE ACTINOMYCETES, THE PROKARYOTES. A HANDBOOK ON THE BIOLOGY OF BACTERIA: ECOPHYSIOLOGY, ISOLATION, IDENTIFICATION, APPLICATIONS (BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.; Eds.), 811–815, SPRINGER, NUEVA YORK, ESTADOS UNIDOS.

FRANCO-CORREA, M. 2008. EVALUACIÓN DE CARACTERES PGPR EN ACTINOMICETOS E INTERACCIONES DE ESTAS RIZOBACTERIAS CON HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS, TESIS DOCTORAL, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE GRANADA, GRANADA, ESPAÑA.

FRANCO-CORREA, M.; QUINTANA, A.; DUQUE, C.; SUAREZ, C.; RODRÍGUEZ, M.X.; BAREA, J.M. 2010. EVALUATION OF ACTINOMYCETE STRAINS FOR KEY TRAITS RELATED WITH PLANT GROWTH PROMOTION AND MYCORRHIZA HELPING ACTIVITIES, *APPLIED SOIL ECOLOGY*, 45:209–217.

FUENTES, M.S.; ALVAREZ, A.; SAEZ, J.M.; BENIMELI, C.S.; AMOROSO, M.J. 2013A. METHOXYCHLOR BIOREMEDIATION BY DEFINED CONSORTIUM OF ENVIRONMENTAL *STREPTOMYCES* STRAINS, *INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 11:1147–1156.

FUENTES, M.S.; BENIMELI, C.S.; CUOZZO, S.A.; AMOROSO, M.J. 2010. ISOLATION OF PESTICIDE-DEGRADING ACTINOMYCETES FROM A CONTAMINATED SITE: BACTERIAL GROWTH, REMOVAL AND DECHLORINATION OF ORGANOCHLORINE PESTICIDES, *INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION*, 64:434–441.

FUENTES, M.S.; BRICEÑO, G.E.; SAEZ, J.M.; BENIMELI, C.S.; DIEZ, M.C.; AMOROSO, M.J. 2013B. ENHANCED REMOVAL OF A PESTICIDES MIXTURE BY SINGLE CULTURES AND CONSORTIA OF FREE AND IMMOBILIZED *STREPTOMYCES* STRAINS, *BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL*, ARTÍCULO ID 392573.

FUENTES, M.S.; SÁEZ, J.M.; BENIMELI, C.S.; AMOROSO, M.J. 2011. LINDANE BIODEGRADATION BY DEFINED CONSORTIA OF INDIGENOUS *STREPTOMYCES* STRAINS”, *WATER AIR AND SOIL POLLUTION*, 222:217–231.

GHAI, R.; McMAHON, K.D.; RODRIGUEZ-VALERA, F. 2012. BREAKING A PARADIGM: COSMOPOLITAN AND ABUNDANT FRESHWATER ACTINOBACTERIA ARE LOW GC, *ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY REPORTS*, 4:29–35.

GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H.P. 2010. A GUIDE TO SUCCESSFUL BIOPROSPECTING: INFORMED BY ACTINOBACTERIAL SYSTEMATICS, *ANTONIE VAN LEEUWENHOEK*, 98:119–142.

GOODFELLOW, M.; STACH, J.E.M.; BROWN, R.; BONDA, A.N.V.; JONES, A.L.; MEXSON, J.; FIEDLER, H.P.; ZUCCHI, T.D.; BULL, A.T. 2012. *VERRUCOSISPORA MARIS* SP. NOV., A NOVEL DEEP-SEA ACTINOMYCETE ISOLATED FROM A MARINE SEDIMENT WHICH PRODUCES ABYSSOMICINS, *ANTONIE VAN LEEUWENHOEK*, 101:185–193.

GREENPEACE. 2002. [HTTP://WWW.GREENPEACE.ORG/ARGENTINA/ES/NOTICIAS/SANTIAGO-DEL-ESTEROA-OS-DE-L/](http://www.greenpeace.org/argentina/es/noticias/santiago-del-esteroa-os-de-l/). VISITADO EL 10 DE MARZO DE 2016.

HAFERBURG, G.; GROTH, I.; MOLLMANN, U.; KOTHE, E.; SATTLER, I. 2009. AROUSING SLEEPING GENES: SHIFTS IN SECONDARY METABOLISM OF METAL TOLERANT ACTINOBACTERIA UNDER CONDITIONS OF HEAVY METAL STRESS, *BIOMETALS*, 22:225–234.

- HASEGAWA, S.; MEGURO, A.; SHIMIZU, M.; NISHIMURA, T.; KUNOH, H. 2006. ENDOPHYTIC ACTINOMYCETES AND THEIR INTERACTIONS WITH HOST PLANTS, *ACTINOMYCETOLOGICA*, 20:72–81.
- ISAAC, P.; MARTÍNEZ, F.L.; BOURGUIGNON, N.; SÁNCHEZ, L.A.; FERRERO, M.A. 2015. IMPROVED PAHS REMOVAL PERFORMANCE BY A DEFINED BACTERIAL CONSORTIUM OF INDIGENOUS *PSEUDOMONAS* AND ACTINOBACTERIA FROM PATAGONIA, ARGENTINA, *INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION*, 101:23–31.
- KELLEY, S.; AITCHISON, E.; DESHPANDE, M.; SCHNOOR, J.; ALVAREZ, P. 2001. BIODEGRADATION OF 1,4-DIOXANE IN PLANTED AND UNPLANTED SOIL: EFFECT OF BIOAUGMENTATION WITH *AMYCOLATA* SP., *WATER RESEARCH*, 35:3791–3800.
- KIDD, P.; PRIETO-FERNÁNDEZ, A.; MONTERROSO, C.; ACEA, M.J. 2008. RHIZOSPHERE MICROBIAL COMMUNITY AND HEXACHLOROCYCLOHEXANE DEGRADATIVE POTENTIAL IN CONTRASTING PLANT SPECIES, *PLANT AND SOIL*, 302:233-247.
- KOTHE, E.; DIMKPA, C.; HAFERBURG, G.; SCHMIDT, A.; SCHMIDT, A.; SCHÜTZE, E. 2010. STREPTOMYCETE HEAVY METAL RESISTANCE: EXTRACELLULAR AND INTRACELLULAR MECHANISMS, *SOIL HEAVY METALS*. SHERAMETI, I.; VARMA, A.; Eds., 225–235, SPRINGER, BERLIN/HEIDELBERG, ALEMANIA.
- LIU, H.; GUO, L.; LIAO, S.; WANG, G. 2012. REUTILIZATION OF IMMOBILIZED FUNGUS *RHIZOPUS* SP. LG04 TO REDUCE TOXIC CHROMATE, *JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY*, 112, 651–659.
- LIU, Y.J.; ZHANG, A.N.; WANG, X.C. 2009. BIODEGRADATION OF PHENOL BY USING FREE AND IMMOBILIZED CELLS OF *ACINETOBACTER* SP. XA05 AND *SPHINGOMONAS* SP. FG03, *BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL*, 44:187–192.
- LUO, L.; ZHANG, S.; SHAN, X.Q.; ZHU, Y.G. 2006. OXALATE AND ROOT EXUDATES ENHANCE THE DESORPTION OF DT FROM SOILS, *CHEMOSPHERE*, 63:1273-1279.
- MANIVASAGAN, P.; VENKATESAN, J.; SIVAKUMAR, K.; KIM, S.K. 2013. MARINE ACTINOBACTERIAL METABOLITES: CURRENT STATUS AND FUTURE PERSPECTIVES, *MICROBIOLOGICAL RESEARCH*, 168:311–332.
- MARTINS, S.C.S.; MARTINS, C.M.; SANTAELLA, S.T. 2013. IMMOBILIZATION OF MICROBIAL CELLS: A PROMISING TOOL FOR TREATMENT OF TOXIC POLLUTANTS IN INDUSTRIAL WASTEWATER, *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 12:4412–4418.
- MORAGA, N.B; POMA, R.; AMOROSO, M.J.; RAJAL, V.B. 2013. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF INDIGENOUS *STREPTOMYCES* AND *LENTZEA* STRAINS FROM SOILS CONTAINING BORON COMPOUNDS IN ARGENTINA, *JOURNAL OF BACIS MICROBIOLOGY*, 54:568–77.
- MURATOVA, A.; POZDNYAKOVA, N.; GOLUBEV, S.; WITTENMAYER, L.; MAKAROV, O.; MERBACH, W.; TURKOVSKAYA, O. 2009. OXIDOREDUCTASE ACTIVITY OF SORGHUM ROOT EXUDATES IN A PHENANTHRENE-CONTAMINATED ENVIRONMENT, *CHEMOSPHERE*, 74:103–1036.
- NAGATA, Y.; ENDO, R.; ITO, M.; OHTSUBO, Y.; TSUDA, M. 2007. AEROBIC DEGRADATION OF LINDANE (γ-HEXACHLOROCYCLOHEXANE) IN BACTERIA AND ITS BIOCHEMICAL AND MOLECULAR BASIS, *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 76:741–752.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. 2007. NATURAL PRODUCTS AS SOURCES OF NEW DRUGS OVER THE LAST 25 YEARS, *JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS*, 70:461–477.

NEWTON, R.J.; JONES, S.E.; EILER, A.; MCMAHON, K.D.; BERTILSSON, S. 2011. A GUIDE TO THE NATURAL HISTORY OF FRESHWATER LAKE BACTERIA, MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, 75:14–49.

NIGAM, V.K.; KHANDELWAL, A.K.; GOTHWAL, R.K.; MOHAN, M.K.; CHOUDHURY, B.; VIDYARTHI, A.S.; GHOSH, P. 2009. NITRILASE-CATALYSED CONVERSION OF ACRYLONITRILE BY FREE AND IMMOBILIZED CELLS OF *STREPTOMYCES* SP., JOURNAL OF BIOSCIENCES, 34:21–26.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J.A. 2009. ANTITUMOR COMPOUNDS FROM MARINE ACTINOMYCETES, MARINE DRUGS, 7:210–248.

PINO, N.J.; DOMINGUEZ, M.C.; PENUELA, G.A. 2001. ISOLATION OF A SELECTED MICROBIAL CONSORTIUM CAPABLE OF DEGRADING METHYL PARATHION AND P-NITROPHENOL FROM A CONTAMINATED SOIL SITE, JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH, PART B, 46:173–180.

POLTI, M.A.; APARICIO, J.D.; BENIMELI, C.S.; AMOROSO, M.J. 2014. SIMULTANEOUS BIOREMEDIATION OF Cr(VI) AND LINDANE IN SOIL BY ACTINOBACTERIA, INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION, 88:48–55.

RAMÍREZ ROMERO, P.; MENDOZA CANTÚ, A. 2008. ENSAYOS TOXICOLÓGICOS PARA LA EVALUACIÓN DE SUSTANCIAS QUÍMICAS EN AGUA Y SUELO. LA EXPERIENCIA EN MÉXICO, SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES, INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA, MÉXICO.

RAMÍREZ, J.A.; LACASAÑA, M. 2001. PLAGUICIDAS: CLASIFICACIÓN, USO, TOXICOLOGÍA Y MEDICIÓN DE LA EXPOSICIÓN, ARCHIVOS DE PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES, 4:67–75.

RAYU, S.; KARPOUZAS, D.G.; SINGH, B.K. 2012. EMERGING TECHNOLOGIES IN BIOREMEDIATION: CONSTRAINTS AND OPPORTUNITIES, BIODEGRADATION, 23:917–926.

RENTZ, J.A.; ALVAREZ, P.J.; SCHNOOR, J.L. 2004 REPRESSION OF *PSEUDOMONAS PUTIDA* PHENANTHRENE DEGRADING ACTIVITY BY PLANT ROOT EXTRACTS AND EXUDATES, ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 6:574–583.

ROY, S.; DAS, I.; MUNJAL, M.; KARTHIK, L.; KUMAR, G.; KUMAR, S.; RAO, K.V.B. 2014. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TYROSINASE PRODUCED BY MARINE ACTINOBACTERIA AND ITS APPLICATION IN THE REMOVAL OF PHENOL FROM AQUEOUS ENVIRONMENT, FRONTIERS IN BIOLOGY, 9:306–316.

SAEZ, J.M.; ÁLVAREZ, A.; BENIMELI, C.S.; AMOROSO, M.J. 2014. ENHANCED LINDANE REMOVAL FROM SOIL SLURRY BY IMMOBILIZED *STREPTOMYCES* CONSORTIUM, INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION, 93:63–69.

SAEZ, J.M.; APARICIO, J.D.; AMOROSO, M.J.; BENIMELI, C.S. 2015. EFFECT OF THE ACCLIMATION OF A *STREPTOMYCES* CONSORTIUM ON LINDANE BIODEGRADATION BY FREE AND IMMOBILIZED CELLS, PROCESS BIOCHEMISTRY, 50:1923–1933.

SAEZ, J.M.; BENIMELI, C.S.; AMOROSO, M.J. 2012. LINDANE REMOVAL BY PURE AND MIXED CULTURES OF IMMOBILIZED ACTINOBACTERIA, CHEMOSPHERE, 89:982–987.

SANTOYO TEOPE, F. 2009. EL PAPEL CENTRAL DE *BURKHOLDERIA* SP. EN LA DEGRADACIÓN DEL HERBICIDA 2,4-D POR UN CULTIVO MIXTO INMOVILIZADO EN UN REACTOR DE LECHO FIJO”, TESIS DOCTORAL, INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, MÉXICO.

- SARATALE, R.G.; SARATALE, G.D.; CHANG, J.S.; GOVINDWAR, S.P. 2009. ECOFRIENDLY DEGRADATION OF SULFONATED DIAZO DYE C.I. REACTIVE GREEN 19A USING *MICROCOCCUS GLUTAMICUS* NCIM-2168, *BIORESOURCE TECHNOLOGY*, 100:3897–905.
- SCHWITZGUÉBEL, J.; KUMPIENE, J.; COMINO, E.; VANEK, T. 2009. FROM GREEN TO CLEAN: A PROMISING AND SUSTAINABLE APPROACH TOWARDS ENVIRONMENTAL REMEDIATION AND HUMAN HEALTH FOR THE 21ST CENTURY, *AGROCHIMICA*, VOL. LIII–N.º7.
- SHELTON, D.R.; KHADER, S.; KARNS, J.S.; POGELL, B.M. 1996. METABOLISM OF TWELVE HERBICIDES BY *STREPTOMYCES*, *BIODEGRADATION*, 7:129–136.
- SIÑERIZ, M.L.; KOTHE, E.; ABATE, C.M. 2009. CADMIUM BIOSORPTION BY *STREPTOMYCES* SP. F4 ISOLATED FROM FORMER URANIUM MINE, *JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY*, 49:55–62.
- SIRIPATTANAKUL, S.; WIROJANAGUD, W.; MCEVOY, J.; KHAN, E. 2008. EFFECT OF CELL-TO-MATRIX RATIO IN POLYVINYL ALCOHOL IMMOBILIZED PURE AND MIXED CULTURES ON ATRAZINE DEGRADATION, *WATER AIR AND SOIL POLLUTION*, 8:257–266.
- SOLANS, M.; VOBIS, G. 2003. ACTINOMYCETES SAPROFÍTICOS ASOCIADOS A LA RIZÓSFERA Y RIZOPLANO DE *DISCARIA TRINERVIS*, *ECOLOGÍA AUSTRAL*, 13:97–107.
- VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G.F.; CHATER, K.F.; VAN SINDEREN, D. 2007. GENOMICS OF ACTINOBACTERIA: TRACING THE EVOLUTIONARY HISTORY OF AN ANCIENT PHYLUM, *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 71:495–548.
- VILLAAMIL LEPORI, E.C.; NASSETTA, G.; BOVI MITRE, M. 2013. SITUACIÓN ACTUAL DE LA CONTAMINACIÓN POR PLAGUICIDAS EN ARGENTINA, *REVISTA INTERNACIONAL DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL*, 29:25–43.
- VOLKE SEPÚLVEDA, T.; VELASCO TREJO, J.A. 2002. TECNOLOGÍAS DE REMEDIACIÓN PARA SUELOS CONTAMINADOS (DEL PONT LALLI R.M., Ed.), 18–24, JIMÉNEZ EDITORES E IMPRESORES, MÉXICO.
- WENGER, K.; BIGLER, L.; SUTER, M.J.; SCHONENBERGER, R.; GUPTA, S.; SCHULIN, R. 2005. EFFECT OF CORN ROOT EXUDATES ON THE DEGRADATION OF ATRAZINE AND ITS CHLORINATED METABOLITES IN SOILS, *JOURNAL OF ENVIRONMENTAL QUALITY*, 34:2187–2196.
- WOOD, T.K. 2008. MOLECULAR APPROACHES IN BIOREMEDIATION, *CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY*, 19:572–578.
- YÁÑEZ-OCAMPO, G. SANCHEZ-SALINAS, E.; JIMENEZ-TOBON, G.A.; PENNINGKX, M.; ORTIZ-HERNÁNDEZ M.L. 2009. REMOVAL OF TWO ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES BY A BACTERIAL CONSORTIUM IMMOBILIZED IN ALGINATE OR TEZONTLE, *JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS*, 168:1554–1561.
- YÁÑEZ-OCAMPO, G.; SÁNCHEZ-SALINAS, E.; ORTIZ-HERNÁNDEZ, M.L. 2011. REMOVAL OF METHYL PARATHION AND TETRACHLORVINPHOS BY A BACTERIAL CONSORTIUM IMMOBILIZED ON TEZONTLE-PACKED UP-FLOW REACTOR, *BIODEGRADATION*, 22:1203–1213.
- ZAIM, M.; GUILLET, P. 2002. ALTERNATIVE INSECTICIDES: AN URGENT NEED, *TRENDS IN PARASITOLOGY*, 18:161–163.

## CAPÍTULO 3

### **Biobeds – Una contribución sueca para la minimización de la contaminación por el uso de plaguicidas**

María del Pilar Castillo y Leticia Pizzul<sup>1</sup>

<sup>1</sup>JTI- Instituto Sueco de Ingeniería Agrícola y Ambiental. PO BOX 7033, Upsalla, Suecia.

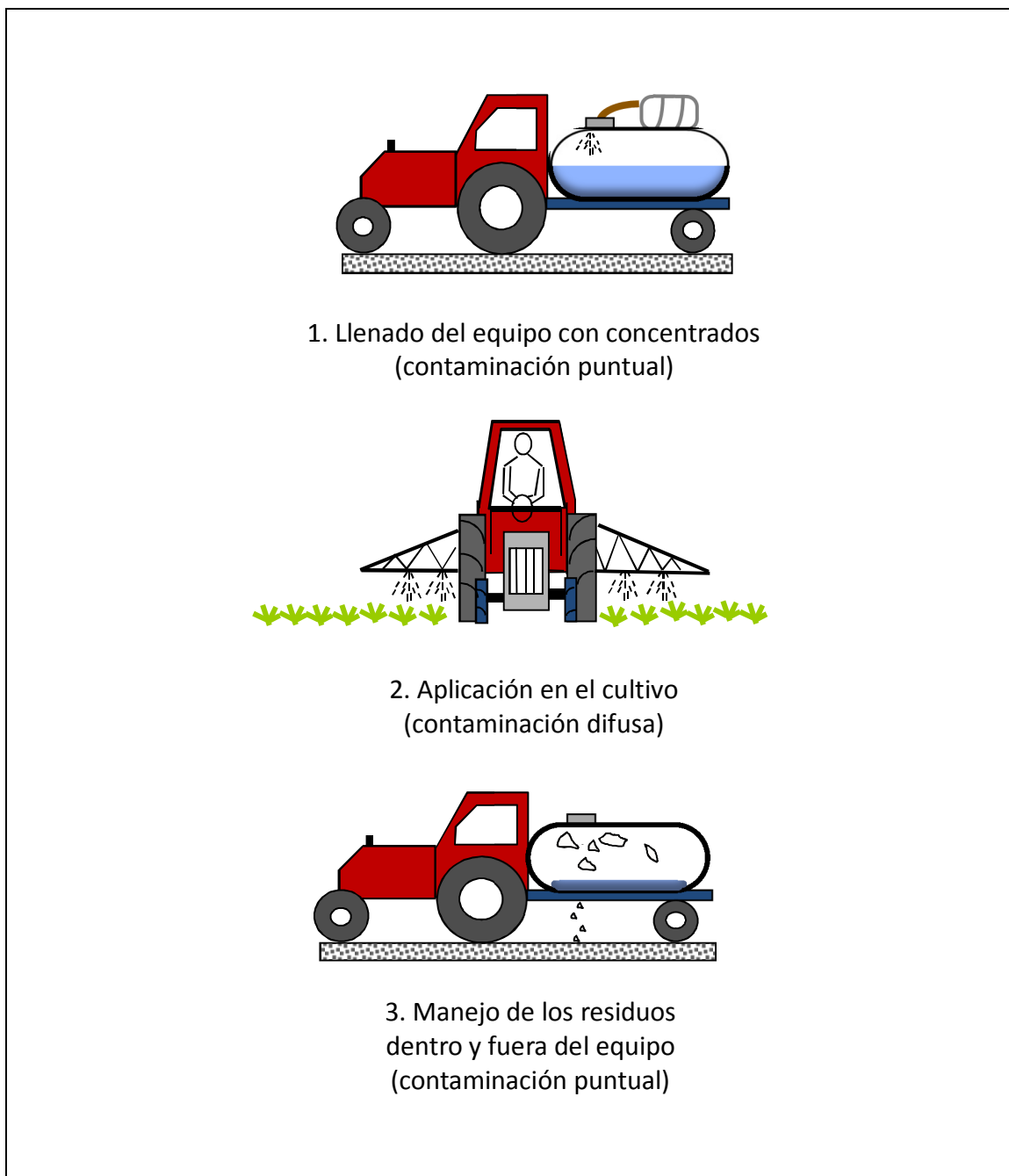
#### **Introducción**

Las camas biológicas se originaron en Suecia como una respuesta a la necesidad de encontrar un sistema sencillo y efectivo para minimizar la contaminación por plaguicidas especialmente durante el llenado de los equipos de aspersión, un ejemplo típico de contaminación puntual.

El manejo adecuado de los plaguicidas disminuye el riesgo de contaminación del medioambiente, especialmente de aguas subterráneas y superficiales. Dicho manejo implica, por ejemplo, la aplicación de las dosis recomendadas, el uso de técnicas efectivas así como la implementación de buenas prácticas agrícolas.

Hay tres momentos durante la aplicación de los plaguicidas donde los riesgos de contaminación son más elevados: 1) mezclado de los concentrados y llenado del tanque en los equipos de aplicación, 2) aplicación en el campo, y 3) manejo de residuos dentro y fuera del equipo de aplicación (Figura 1). Si los plaguicidas son usados en las dosis recomendadas, aplicados usando técnicas modernas y de acuerdo a buenas prácticas agrícolas, el riesgo de contaminación durante su aplicación, o contaminación difusa, sería mínimo (paso 2 en la figura 1). Los pasos 1 y 3 pueden constituir una fuente de contaminación puntual. En el paso 1 se dan pequeños derrames del producto, pero con altas concentraciones. El paso 3 contribuye con mayores volúmenes, pero con concentraciones más bajas provenientes del plaguicida ya diluido que se encuentra dentro del tanque y por el lavado y dilución de los residuos que se encuentran retenidos en las paredes exteriores del equipo. Las actividades en estos dos últimos pasos suelen realizarse siempre en el mismo lugar en la finca debido a la conveniencia de una fuente de agua cercana. Además es frecuente que en estos sitios la capa superficial del suelo haya sido removida y reemplazada por grava o arena. En estas condiciones el riesgo de contaminación aumenta y pueden detectarse altas concentraciones de plaguicidas (Helweg, 1994). Conjuntamente

diversos estudios en Dinamarca (Helweg, 1994, Spliid, *et al.*, 1999, Stenvang y Helweg, 2000), Alemania (Fischer *et al.*, 1998a, Fischer *et al.*, 1998b, Frede *et al.*, 1998, Seel *et al.*, 1966) y Suecia (Kreuger, 1999) han demostrado que las fuentes puntuales son las que más contribuyen a la contaminación del medioambiente por plaguicidas.

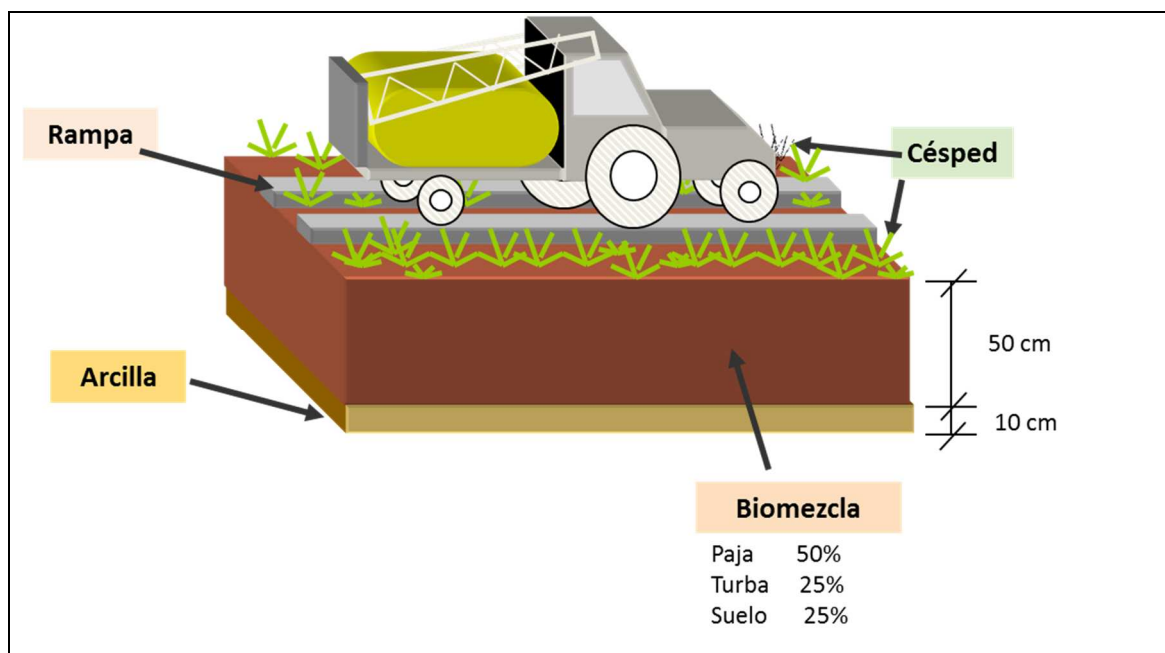


**Figura 1.** Pasos en la aplicación de plaguicidas en el campo.

A fines de los 80, análisis de aguas superficiales y subterráneas en la zona de actividad agrícola más intensiva de Suecia mostraron altos niveles de plaguicidas. Comenzó entonces una campaña a nivel nacional para implementar medidas que disminuyeran

los riesgos de contaminación. Con el objetivo de disminuir el riesgo de contaminación puntual, investigadores de la Universidad Sueca de Ciencias Agrarias, junto con un grupo de agricultores pertenecientes a la asociación *Odling i Balans* (Cultivo en equilibrio), desarrollaron la biobed. Esta tecnología se diseñó a partir de la experiencia de los agricultores y del respaldo de experimentos a nivel de laboratorio y de estudios a campo. Los resultados obtenidos confirmaron que el uso de la biobed podía evitar los riesgos de contaminación puntual si se usaba como el área determinada para la manipulación de plaguicidas durante el mezclado y llenado del tanque y el posterior estacionamiento del equipo de aplicación (Torstensson, 2000).

**¿Qué es una biobed?** Una biobed o cama biológica es una construcción sencilla y económica diseñada para retener y degradar derrames de plaguicidas (Torstensson, 2000, Torstensson y Castillo, 1997). La biobed en su diseño original consiste en una excavación en el suelo de 60 cm de profundidad, la cual es rellena de abajo hacia arriba por una capa de arcilla, una biomezcla de paja, suelo y turba y una capa de césped en la superficie. Además debe incluirse una rampa para evitar que el tractor y el equipo de aspersión se hundan durante el estacionamiento (Figura 2).



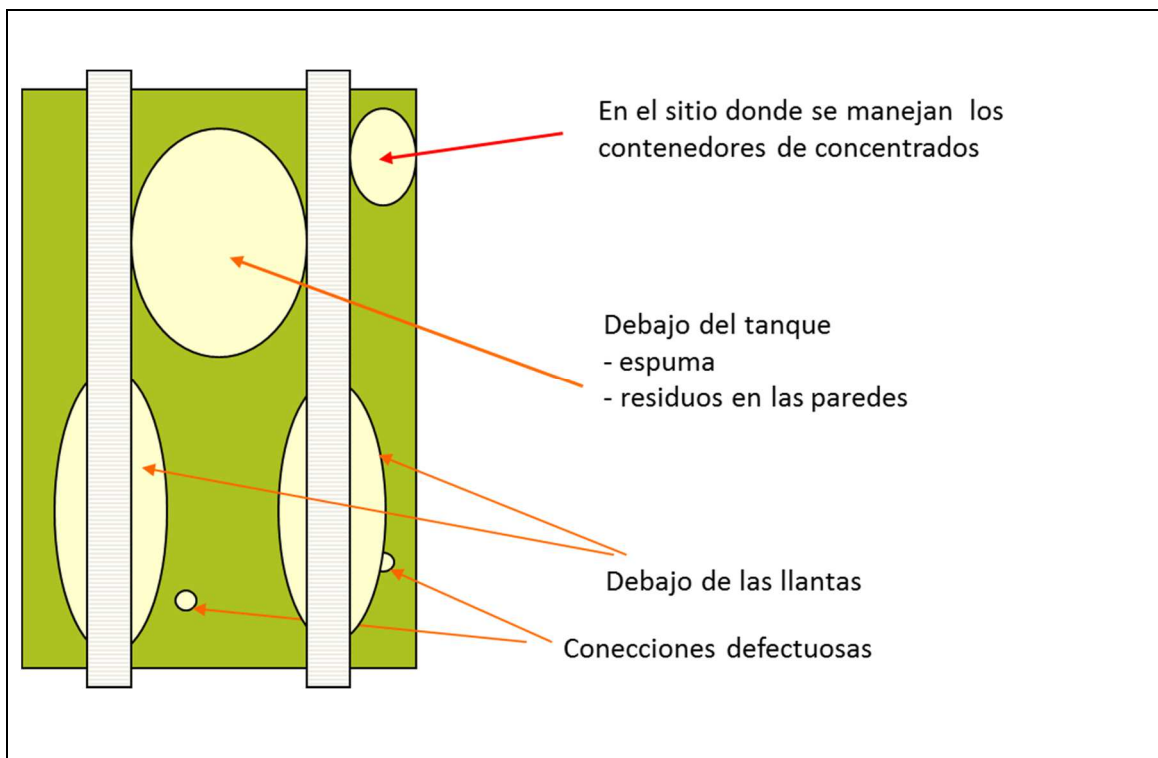
**Figura 2.** Diagrama de la biobed sueca original.

El propósito es que el manejo de plaguicidas durante el llenado del equipo de aspersión sea hecho encima de la biobed de manera que si ocurren derrames accidentales, los plaguicidas puedan ser retenidos y degradados en la biomezcla, que



es la que contribuye con la actividad microbiana adecuada para la degradación de los plaguicidas.

La típica biomezcla sueca consiste de paja, suelo y turba en una proporción de 50-25-25 % en volumen. El suelo provee de capacidad de retención y de microorganismos degradadores de plaguicidas. La turba aporta también una alta capacidad de retención y mantiene la humedad del sistema. La capa de césped en la superficie contribuye al equilibrio de la humedad por evapotranspiración y sirve además como un indicador de derrames de plaguicidas (Figura 3).

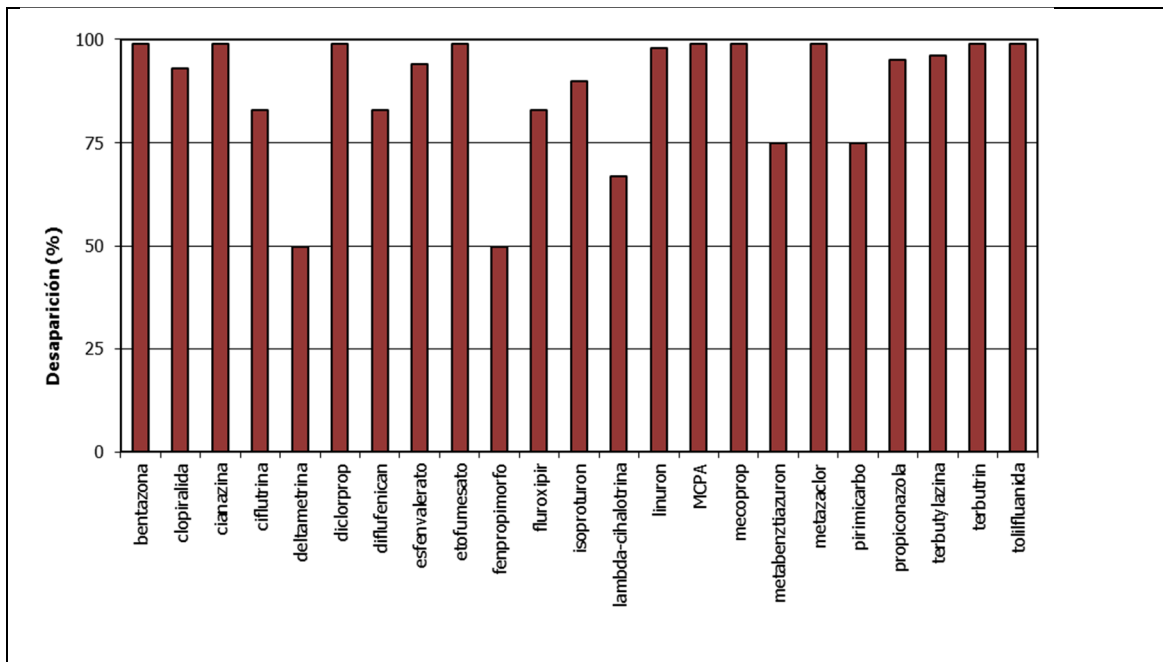


**Figura 3.** Los derrames de pesticidas, especialmente herbicidas, en una biobed dañan el césped de la superficie generando zonas decoloradas (modificado de Torstensson, 2000).

La principal actividad microbiana la aporta la paja al estimular la actividad de hongos de pudrición blanca con capacidad de degradar lignina a través de la formación de enzimas ligninolíticas, como las peroxidasas y las lacasas (actividad fenoloxidasas), las cuales han demostrado también ser eficientes en la degradación de plaguicidas (Castillo, 1997; Castillo *et al.*, 1997; Castillo *et al.*, 2000; Castillo *et al.*, 2001; Coppola *et al.*, 2007; Pizzul *et al.*, 2009; Von Wirén-Lehr *et al.*, 2001). En los estudios hechos en Suecia se ha encontrado que los niveles de paja en la biomezcla se correlacionan positivamente con el contenido de fenoloxidasas, respiración microbiana y la degradación de la mayor parte de los plaguicidas estudiados (Castillo y Torstensson, 2007). También se ha observado que la presencia de un material lignocelulósico en la biomezcla es indispensable para la completa degradación de muchos de los

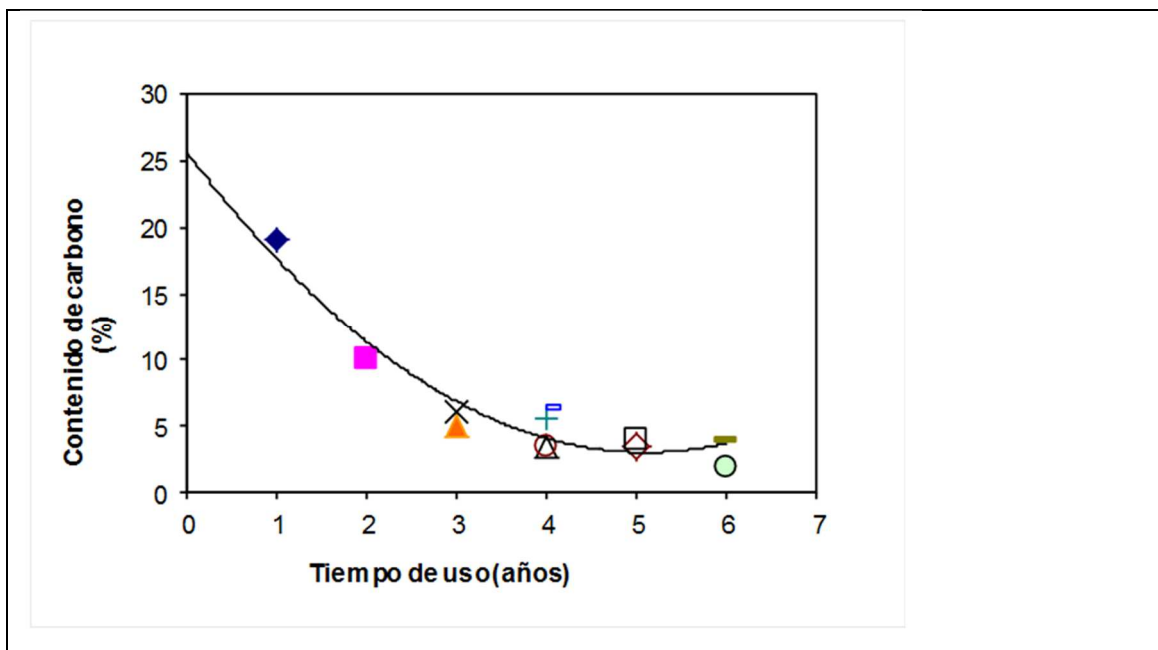
plaguicidas, sobre todo aquellos con anillos aromáticos, y porque desarrolla una población microbiana más robusta en comparación con biomezclas compuestas de otros tipos de materiales orgánicos (Coppola *et al.*, 2007; Vischetti *et al.*, 2007).

El período donde aparecen las concentraciones más altas de plaguicidas en la biobed es durante la época de aplicación de los plaguicidas, ej. cuando se usan más intensivamente (Torstensson, 2000, Torstensson y Castillo, 1997). Una vez ocurrido el derrame, los plaguicidas son retenidos en la parte superior de la biobed y la mayor parte de ellos son degradados dentro del lapso de un año (Figura 4). Niveles cercanos o por debajo del límite de detección son encontrados en las partes bajas lo que sugiere un transporte mínimo hacia el fondo de la biobed.



**Figura 4.** Desaparición de plaguicidas en una biobed sueca en el transcurso de un año.

Debido a la degradación de la paja, el contenido de carbono en el centro de la biobed disminuye con el tiempo a niveles similares a los encontrados en muchos suelos agrícolas (Figura 5). Cuando eso sucede la biomezcla debe ser totalmente removida y reemplazada por una mezcla nueva. En Suecia se recomienda que esta remoción se haga cada 6 a 8 años.



**Figura 5.** Contenido de carbono (%) en doce biobeds. Todas fueron muestreadas en el año 1999, después de 1 a 6 años de haberse construido.

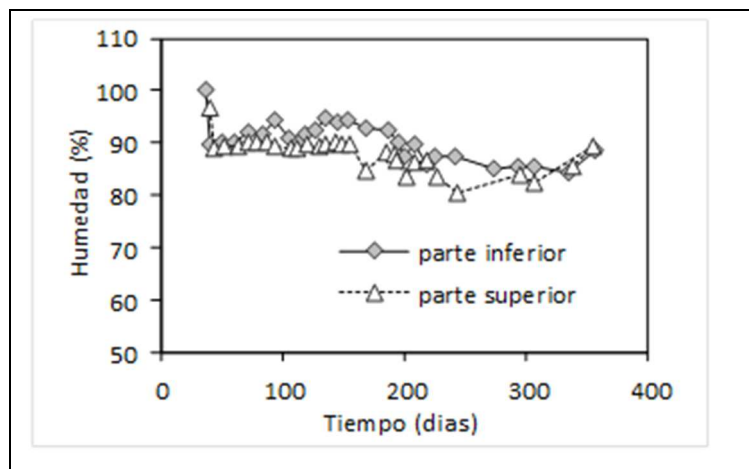
La biomezcla removida puede contener niveles bajos de los plaguicidas aplicados recientemente o de aquellos que son degradados lentamente. Por lo tanto, se recomienda que el material removido se someta a un proceso de post-compostaje por un período de un año. Luego de ese proceso los niveles de los plaguicidas bajan por debajo del límite de detección (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Un proceso de post-compostaje de la biomezcla removida reduce los niveles de los pesticidas a por debajo del límite de detección. Datos de una cama biológica en el sur de Suecia. Los residuos detectados están expresados en  $g^{-1}$  materia seca.

Plaguicida	Abril	Agosto	Octubre	Diciembre	Límite de detección
Diflufenican	0,30	0,07	<0,05	<0,05	0,05
Esfenvalerato	0,16	0,11	0,06	<0,02	0,02
Fenpropimorfo	0,10	0,04	<0,04	<0,04	0,04
Isoproturon	0,07	<0,01	<0,01	<0,01	0,01
Metazaclor	0,08	<0,04	<0,04	<0,04	0,04
Metabenzthiazuron	0,10	<0,05	<0,05	<0,05	0,05
Pirimicarb	0,07	0,03	<0,02	<0,02	0,02
Propiconazol	0,12	0,06	<0,05	<0,05	0,05
Terbutylazina	0,11	0,08	0,04	<0,04	0,04

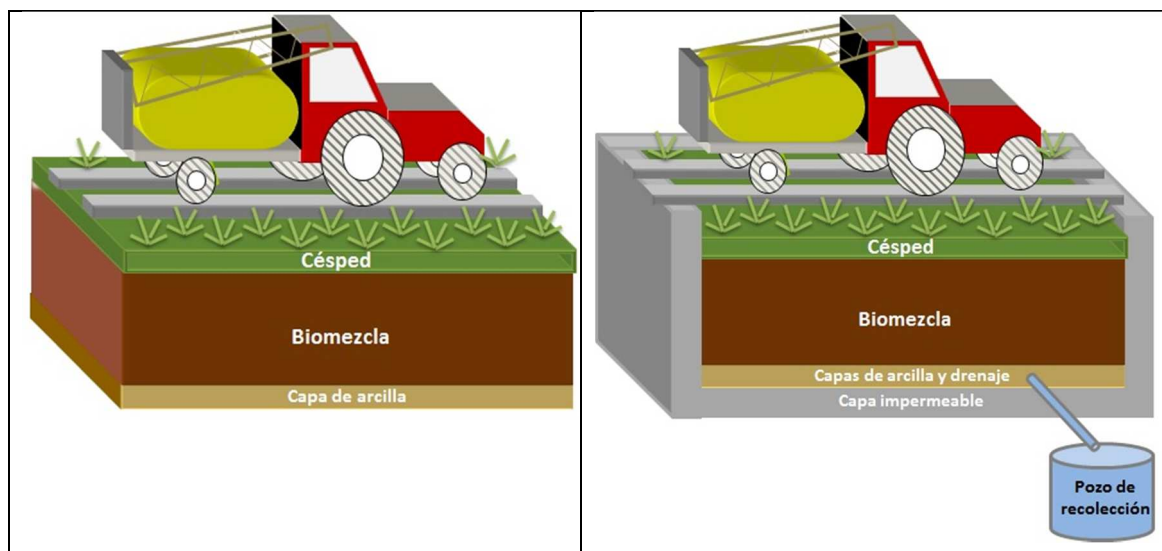
Debido al clima de Suecia la actividad de la biobed está limitada a las épocas de primavera, verano y parte del otoño. Las temperaturas más altas observadas en las biobeds se dan en el sur de Suecia, donde pueden llegar a 20 °C en el verano mientras que en el invierno fluctúan entre 2–4 °C. Las temperaturas más bajas se dan en el norte de Suecia donde incluso parte de la biomezcla se congela durante el invierno (Torstensson, 2000).

Por un lado, el balance de agua en una biobed tiene un efecto importante en la retención y degradación de los plaguicidas. Condiciones de no saturación son importantes dado que los procesos de degradación de la mayor parte de los plaguicidas en la biobed son aeróbicos (Castillo y Torstensson, 2007). Por otro lado, además de generar tasas de degradación lentas, las condiciones cercanas a la saturación no son recomendables porque aumentan el riesgo de transporte de los plaguicidas fuera de la biobed. Para evitar este riesgo las biobeds no están recomendadas para el tratamiento de grandes cantidades de aguas, como por ejemplo las que provienen del lavado interno de los equipos de aspersión. Esta actividad deberá ser hecha en el campo. Para las condiciones suecas la humedad en las biobeds se mantiene en niveles óptimos para la actividad microbiana si solo reciben el agua de las lluvias y del lavado externo del equipo de aspersión (Figura 6).



**Figura 6.** Humedad en una biobed en el sur de Suecia. Las mediciones fueron hechas a dos niveles, uno en la parte superior (15 cm) y otro en la parte baja (40 cm) de la biobed (Torstensson, 2000).

**Tipos de biobeds.** Hay dos tipos de biobeds dependiendo de si el fondo está o no aislado de los alrededores: la biobed abierta y la biobed cerrada (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema de una biobed abierta (izquierda) y una biobed cerrada (derecha). La biobed abierta es la más usada en Suecia. Para otras condiciones climáticas y de uso se recomienda la biobed cerrada.

**Biobed abierta.** Este modelo no lleva ninguna capa impermeable sintética que permita aislarla completamente de los alrededores. El fondo de esta biobed se cubre con una capa de arcilla de 10 cm y no posee ningún sistema de colección del agua de drenaje. El modelo sueco original pertenece a este grupo y la mayor parte de las biobeds suecas pertenecen a este grupo.

**Biobed cerrada.** Esta biobed se asemeja a la biobed sueca original, pero está revestida por una capa impermeable sintética (plástico, hormigón, lona, etc.) que la aísla del suelo. Este diseño permite la colección del agua de drenaje en pozos especiales que se construyen al lado de la biobed. Se incluyen capas de drenaje (grava, macadam o arena) que se colocan debajo de la arcilla.

**Biobeds en el mundo.** Las biobeds han recibido una gran atención en otros países por lo sencillas y efectivas. Comenzaron a usarse primeramente en los países europeos, pero en los últimos años el sistema se ha difundido en países latinoamericanos. Uno de ellos es Guatemala. En este país Agrequima, la Asociación del Gremio Químico Agrícola, adaptó la tecnología, a la que denominó biodep (Figura 8d) y la orientó para el uso en la pequeña agricultura. Agrequima realiza además una efectiva campaña de capacitación y difusión. Se estima que hasta el año 2016 existen cerca de 2500 biodeps a lo largo de todo el país. Chile también está desarrollando una intensa actividad en torno a la biobed con trabajos a nivel de investigación académica, construcción de biobeds piloto en cooperación con diversas empresas agrícolas (Figura 8a), campañas de difusión a varios niveles, incluso el escolar. En otros países latinoamericanos (Brasil, México, Uruguay, Argentina, entre otros) hay diversas líneas de investigación sobre esta tecnología y existen algunas biobeds experimentales.

El modelo original sueco ha sido modificado y se ha adaptado a las condiciones climatológicas y a las prácticas agrícolas típicas de cada país y a los materiales orgánicos disponibles para preparar la biomezcla (Fogg 2004; Fogg y Boxall 2004; Fogg *et al.*, 2003a b; Coppola *et al.*, 2007; Vischetti *et al.*, 2004; Fournier *et al.*, 2005; Henriksen *et al.*, 2003; Spliid *et al.*, 2006).

Con respecto a la composición de la biomezcla, la paja de trigo se ha reemplazado por otros materiales lignocelulósicos como el bagazo de caña (De Roffignac *et al.*, 2008), chips de coco (De Wilde *et al.*, 2009), mazorcas y rastrojo de maíz (Lamar, 2001); residuos de girasol, hojas de olivo (Karanasios *et al.*, 2010) y tallos de vid (Vischetti *et al.*, 2008). En muchos países no es posible utilizar la turba, ya sea porque no está disponible, es muy costosa o porque su uso no está permitido. Generalmente se lo reemplaza con compost de distinto origen: de hojas de olivo, semilla de algodón o residuos de la cosecha de algodón (Karanasios *et al.*, 2010), de semillas y piel de uva (Omirou *et al.*, 2012) o de residuos de jardín (De Wilde *et al.*, 2009). Otra opción es el sustrato agotado proveniente del cultivo de hongos comestibles (Karanasios *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2015).

## **Algunas adaptaciones del sistema biobed**

**Biodep.** Como se mencionó anteriormente la biodep (biodegradación de plaguicidas) fue desarrollada en Guatemala por Agrequima ([www.agrequima.com.gt](http://www.agrequima.com.gt)). Está también inspirada en el concepto sueco de la biobed con una diferencia importante, el tamaño de este sistema es apreciablemente menor porque está ideado para el llenado de mochilas de aplicación (Figura 8d). Por lo tanto solo se necesita un área suficiente para que una persona esté parada en la biobed llenando la mochila. Es un buen ejemplo de un tipo de biobed para predios más pequeños.

**Biofiltro.** El biofiltro se originó en Bélgica. Este sistema consiste en una serie de recipientes de plástico, de 1 metro cúbico de volumen, apilados en forma vertical y conectados entre sí con tuberías y válvulas (Figura 8c). Cada recipiente se llena con la biomezcla. Antes y después de este sistema se incluyen tanques para el acumulado del agua contaminada con plaguicidas y para el almacenamiento y evaporación de los efluentes, respectivamente. El agua contaminada se bombea hacia los recipientes con la biomezcla para la retención y degradación de los plaguicidas. El efluente pasa luego al tanque final que suele tener plantas donde el agua es evaporada por evapotranspiración. El biofiltro puede constar de dos a tres unidades de 1 m<sup>3</sup>. La cantidad de unidades/recipientes está determinada por varios factores, pero por sobre todo depende de los volúmenes de agua para tratar.



**Figura 8.** Biobeds en el mundo: a) biobed experimental en la Universidad de Temuco, Chile. b) Phytobac, el modelo comercial de Bayer CropScience c) biofiltro con cuatro módulos en Holanda y d) biodep tipo mesa para mochilas en Guatemala.



**Phytobac.** Este es un sistema comercial, desarrollado por Bayer CropScience e inspirado en el concepto sueco de la biobed (Figura 8b). Consiste en un tanque de 60 cm de profundidad y construido de materiales impermeables para asegurar la retención completa de los contaminantes y de los efluentes. El tanque se rellena con la biomezcla que está constituida por tierra vegetal y paja picada. A diferencia de la biobed, la Phytobac no lleva una capa superior de césped, pero sí lleva una cubierta exterior que protege el lecho de la lluvia. La Phytobac está diseñada para tratar todos los volúmenes de agua contaminada procedentes de los residuos del tanque y derrames durante la mezcla/carga, enjuague y limpieza de los pulverizadores. Puede ser utilizada sola o conectada a la zona de mezcla/carga y limpieza. En este último caso, se conecta a un tanque de almacenamiento intermedio donde se recogen y se recirculan los efluentes a la Phytobac. El agua en la Phytobac está regulada solamente por evaporación.

## Conclusiones

La primera biobed fue construida en Suecia en 1993 y en la actualidad se estima que hay unas 1500 funcionando en todo el país. Esta difusión se debe principalmente a que la biobed es efectiva, económica y ha ganado el aprecio de los agricultores, quienes a su vez han desarrollado diferentes modelos dependiendo de los materiales disponibles en las fincas. Su uso, acompañado de otras buenas prácticas agrícolas durante la manipulación de plaguicidas, ayuda a disminuir notablemente los riesgos de contaminación de aguas y suelos.

Su adopción en países con distintas condiciones tanto climáticas como de producción hacen que el modelo original continúe desarrollándose y que siga generándose información. En este capítulo hemos brindado las generalidades del sistema. Para hacer un seguimiento del desarrollo de la biobed en el mundo se invita al lector visitar la página [www.biobeds.net](http://www.biobeds.net), disponible en español e inglés, donde nuestro instituto reúne las novedades sobre este sistema.

## Bibliografía

CASTILLO, M.D.P.; TORSTENSSON, L. 2007. Effect of biobed composition, moisture and temperature on the degradation of pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 5725-5733.

- CASTILLO, M.D.P. 1997. Degradation of pesticides by *Phanerochaete chrysosporium* in Solid Substrate Fermentation. Tesis doctoral, Universidad Sueca de Ciencias Agrarias, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae.
- CASTILLO, M.D.P.; ANDER, P.; STENSTRÖM, J. 1997. Lignin and manganese peroxidase activity in extracts from straw solid substrate fermentations. *Biotechnology Techniques*. 11, 701-706.
- CASTILLO, M.D.P.; ANDER, P.; STENSTRÖM, J.; TORSTENSSON, L. 2000. Degradation of the herbicide bentazon as related to enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in a solid substrate fermentation system. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 16, 289-295.
- CASTILLO, M.D.P.; VON WIRÉN-LEHR, S.; SCHEUNERT, I.; TORSTENSSON, L. 2001. Degradation of isoproturon by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biology and Fertility of Soils*. 33, 521-528.
- COPPOLA, L.; CASTILLO, M.D.P.; MONACI, E.; VISCHETTI, C. 2007. Adaptation of the biobed composition for chlorpyrifos degradation to southern Europe conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 396-401.
- DE ROFFIGNAC, L.; CATTAN, P.; MAILLOUX, J.; HERZOG, D.; LE BELLEC, F. 2008. Efficiency of a bagasse substrate in a biological bed system for the degradation of glyphosate, malathion and lambda-cyhalothrin under tropical climate conditions. *Pest Manag Sci* 64:1303.
- DE WILDE, T.; SPANOGHE, P.; MERTENS, J.; SNIEGOWSKI, K.; RYCKEBOER, J.; JAEKEN, P.; SPRINGAEL, D. 2009. Characterizing pesticide sorption and degradation in macro scale biopurification systems using column displacement experiments. *Environmental Pollution* 157: 1373-1381.
- DE WILDE, T.; SPANOGHE, P.; RYCKEBOER, J.; JAEKEN, P.; SPRINGAEL, D. 2009. Sorption characteristics of pesticides on matrix substrates used in biopurification systems. *Chemosphere* 75: 100-108.
- FISCHER, P.; HARTMANN, H.; BACH, M.; BURHENNE, J.; FREDE, H.G.; SPITELLER, M. 1998a. Gewässerbelastung durch Pflanzenschutzmittel in drei Einzugsgebieten. *Gesunde Pflanzen*. 50, 142-147.
- FISCHER, P.; HARTMANN, H.; BACH, M.; BURHENNE, J.; FREDE, H.G.; SPITELLER, M. 1998b. Reduktion des Gewässerreintrags von Pflanzenschutzmitteln aus Punktquellen durch Beratung. *Gesunde Pflanzen*. 50.
- FOGG, P.; BOXALL, A.B.A. 2004. Effect of different soil textures on leaching potential and degradation of pesticides in biobeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 5643-5652.
- FOGG, P. 2004. Mechanisms and dynamics within a biobed, In J. Husby, (ed.) *European Biobed Workshop*. Bayer CropScience, Malmö, Suecia.
- FOGG, P.; BOXALL, A.B.A.; WALKER, A. 2003a. Degradation of pesticides in biobeds: The effect of concentration and pesticide mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 5344-5349.
- FOGG, P.; BOXALL, A.B.A.; WALKER, A.; JUKES, A.A. 2003b. Pesticide degradation in a "biobed" composting substrate. *Pest Management Science*. 59, 527-537.

FOURNIER, J.-C.; MARTIN-LAURENT, F.; CATROUX, G. 2005. Detoxifying plant health product effluents from farms. Disponible en INRA [http://www.international.inra.fr/press/detoxifying\\_plant\\_health](http://www.international.inra.fr/press/detoxifying_plant_health). Visitado el 30 de marzo de 2016.

FREDE, H.G.; FISCHER, P.; BACH, M. 1998. Reduction of herbicide contamination in flowing waters. *Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*. 161, 395-400.

GAO, W.; LIANG, J.; PIZZUL, L.; FENG, X.M.; ZHANG, K.; CASTILLO, M.C. 2015. Evaluation of spent mushroom substrate as substitute of peat in Chinese biobeds. *International Biodeterioration & Biodegradation* 98:107-112.

HELWEG, A. 1994. Threats to water quality from pesticides—Case histories from Denmark. *Pesticide Outlook*. 5, 12-18.

HENRIKSEN, V.V.; HELWEG, A.; SPLIID, N.H.; FELDING, G.; STENVANG, L. 2003. Capacity of model biobeds to retain and degrade mecoprop and isoproturon. *Pest Management Science*. 59, 1076-1082.

KARANASIOS, E.; TSIROPOULOS, N.G.; KARPOUZAS, D.G. 2012. On-farm biopurification systems for the depuration of pesticide wastewaters: recent biotechnological advances and future perspectives. *Biodegradation* 23: 787-802.

KARANASIOS, E.; TSIROPOULOS, N.G.; KARPOUZAS, D.G.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. 2010. Novel biomixtures based on local Mediterranean lignocellulosic materials: Evaluation for use in biobed systems. *Chemosphere* 80: 914-921.

KREUGER, J. 1999. Pesticides in the environment - atmospheric deposition and transport to surface waters. Tesis doctoral, Universidad Sueca de Ciencias Agrarias, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae.

LAMAR, R.T. 2001. Biobeds for containment and destruction of pesticides at agricultural mixing and loading facilities. Final report, EPA Contract Number 68D00236.

OMIROU, M.; DALIAS, P. COSTA, C.; PAPASTEFANOU, C.; DADOS, A.; EHALIOTIS, C.; KARPOUZAS, D.G. 2012. Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide-contaminated wastewaters from the citrus production chain: Laboratory, column and field studies. *Environmental Pollution* 166: 31-39.

PIZZUL, L.; CASTILLO, M.D.P.; STENSTRÖM, J. 2009. Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. *Biodegradation* 20(6): 751-759.

SEEL, P.; KNEPPER, T.P.; GABRIEL, S.; WEBER, A.; HABER, K. 1966. Kläranlagen als Haupteintragspfad für Pflanzenschutzmittel in ein Fließgewässer - Bilanzierung der Einträge. *Vom Wasser*. 86, 247-262.

SPLIID, N.H.; BRÜSCH, W.; JACOBSEN, O.S.; HANSEN, S.U. 1999. Pesticide point sources and dispersion of pesticides from a site previously used for handling of pesticides. 16<sup>th</sup> Danish Plant Protection Conference, Side effects of pesticides, Weeds. DJF Report 9, 33-46.

SPLIID, N.H.; HELWEG, A.; HEINRICHSON, K. 2006. Leaching and degradation of 21 pesticides in a full-scale model biobed. *Chemosphere*. 65, 2223-2232.

- STENVANG, L.; HELWEG, A. 2000. Minimizing pollution risk at filling and washing sites for sprayers. 17<sup>th</sup> Danish Plant Protection Conference, Overview/environment/weeds. DJF report 23, 73-77.
- TORSTENSSON, L.; CASTILLO, M.D.P. 1997. Use of biobeds in Sweden to minimize environmental spillages from agricultural spraying equipment. *Pesticide Outlook*. 8, 24-27.
- TORSTENSSON, L. 2000. Experiences of biobeds in practical use in Sweden. *Pesticide Outlook*. 11, 206- 212.
- VISCHETTI, C.; MONACI, E.; CARDINALI, A.; CASUCCI, C.; PERUCCI, P. 2008. The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a biobed mixture. *Chemosphere* 72: 1739-1743.
- VISCHETTI, C.; CAPRI, E.; TREVISAN, M.; CASUCCI, C.; PERUCCI, P. 2004. Biomassbed: a biological system to reduce pesticide point contamination at farm level. *Chemosphere*. 55, 823-828.
- VISCHETTI, C.; COPPOLA, L.; MONACI, E.; CARDINALI, A.; CASTILLO, M.D.P. 2007. Microbial impact of the pesticide chlorpyrifos in Swedish and Italian biobeds. *Agronomy for Sustainable Development*. 27, 267-272.
- VON WIRÉN-LEHR, S.; CASTILLO, M.D.P.; TORSTENSSON, L.; SCHEUNERT, I. 2001. Degradation of isoproturon in biobeds. *Biology and Fertility of Soils*. 33, 535-540.

## CAPÍTULO 4

### Contaminación del aire y su efecto en plantas y suelo, descontaminación y restauración

Juan F. Gallardo Lancho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>C.S.I.C., IRNASa, Cordel de Merinas 40, Salamanca 37080 (España).  
E-mail: [juanf.gallardo@csic.es](mailto:juanf.gallardo@csic.es)

#### Introducción

La contaminación atmosférica es uno de los temas recurrentes en los medios de comunicación sociales. Las grandes ciudades están afectadas por dicha contaminación, la que es de intensidad gravísima en cuencas cerradas con inversión térmica. Ciudades iberoamericanas como Madrid, México D.F. o Santiago de Chile son paradigmáticas por sus altas contaminaciones atmosféricas (Onursal y Gautam, 1997). Sin embargo, es menos conocido (o solo reducido a los ámbitos científicos) el efecto que pudiera tener la contaminación atmosférica sobre suelos y plantas, o bien el efecto mixto de la contaminación por minería de escombreras y sus efectos al ser fuente de polvos contaminados (Navarro Segura *et al.*, 1975; Rodríguez Lara *et al.*, 2001). Ello en parte al decreciente interés ocurrido en los países industriales desde que las normativas ambientales obligaron a implementar medidas para la reducción de las emisiones industriales y un rígido control de estas, con registros automáticos, concentrándose más bien en el conocimiento de los efectos de la contaminación urbana sobre la salud (Ballester, 2005), o sobre los efectos que causan las plumas de humo de los grandes incendios (Pinilla Gil 2007; Sione *et al.*, 2009).

El principal vector hacia el suelo de los elementos que conlleva la contaminación atmosférica son las aguas atmosféricas. En sistemas oligotróficos la cantidad de bioelementos retenidos por el sistema es muy bajo (Moreno y Gallardo, 2002 a y b), por lo que la entrada al suelo de nuevos elementos con las aguas de lluvia permite la adsorción edáfica de estos (Menéndez *et al.*, 2001), mientras que en los sistemas eutróficos, en cambio, se produce un intercambio en el sistema entre los que están retenidos y los que vienen llegando (Michalzik *et al.*, 2003) a un ritmo que depende de la cantidad contaminante que llega y del vector hídrico. Por tanto, las condiciones climáticas y humedad edáfica (que oscila desde un sistema exudativo en sistemas

áridos a semiáridos hasta un sistema percolativo en sistemas muy lluviosos o hiperhúmedos) son cruciales en la efectividad de las interacciones contaminante-suelo. Esto exige un modelo de interacción (porciones y desorciones) en los primeros centímetros edáficos (Michalzik *et al.*, 2003).

Por una parte, la contaminación atmosférica forma parte de los flujos de los ciclos biogeoquímicos. Se pueden distinguir entre emisiones naturales (volcanes, humedales, pantanos, suelos, termitas, rumiantes, etc.) y aquellas de origen industrial. Igualmente pueden considerarse gases, aerosoles (suspensiones) y partículas suspendidas (las conocidas PM10, PM2,5 y PM0,1, valores de diámetro en micras; Querol *et al.*, 2008). Por otra parte, también pueden considerarse primarias y secundarias (en general, en las secundarias aparecen neoproductos resultantes de la oxidación atmosférica; (Domènech, 1991)).

Como consecuencia las lluvias ácidas europeas y norteamericanas son anécdotas del pasado, así como las fertilizaciones extras (nitrogenadas y azufradas) de amplias áreas internacionales. Es paradigmático las nuevas carencias de azufre en Alemania desde que se cortaron las emisiones azufradas (Schnug, 1998). Otro ejemplo, en Galicia (España) se encuentra que el Pb de sus turberas se corresponde cronológicamente con las actividades mineras (Otero *et al.*, 2012).

La contaminación atmosférica puede actuar sobre la vegetación (perennifolias) y sobre el suelo (degradación química del suelo). Ello obliga a distinguir netamente los procesos que afectan al suelo de los que afectan a las plantas (en especial coníferas perennifolias). Unas veces los efectos de la contaminación atmosférica son demasiado evidentes, otras no tanto. Por ejemplo, los huertos orgánicos de los alrededores del Gran Buenos Aires, del valle de México D.F., o del valle del Santiago de Chile deben estar contaminados, pues la contaminación por N y metales pesados no se ve necesariamente (pero se digiere; (Onursal y Gautam, 1997)). Algunas ciudades están tomando diversas medidas contra la contaminación atmosférica (Holman *et al.*, 2015). También es conocida la eficacia de los bosques como agente depurador ambiental (Bravo *et al.*, 2007).

La contaminación atmosférica puede proceder de vulcanismo, como es usual en los cinturones del Eje volcánico mejicano o del andino. Estos procesos de contaminación atmosférica de origen volcánicos son recurrentes en el oeste argentino (Fernández-Turiel *et al.*, 2014 y 2015); a veces estos fenómenos fueron pretéritos, escapan al paisaje, pero se vuelven activos cada vez que la erosión deja al descubierto los paquetes de cineritas que pueden redistribuirse incluso atmosféricamente; las contaminaciones volcánicas suelen ser poco conocidas, salvo algunos volcanes europeos o norteamericanos, ya muy estudiados.

Obviamente la contaminación atmosférica sigue un curso finalmente descendente a causa de las lluvias. Para esclarecer los impactos sobre el suelo (distinguiéndolos de los efectos directos sobre las plantas) hay que conocer los ciclos de elementos más importantes (o nocivos) y hacer un seguimiento de la evolución de estos o, bien, hacer un balance del sistema completo. El suelo puede actuar de depurador ambiental a veces sin contaminarse apreciablemente, adsorbiendo o absorbiendo los elementos que entran en el medio edáfico; por ello la medida de las salidas de elementos del sistema puede ser un indicador de la eficacia depuradora del suelo (Vicente *et al.*, 2001).

Si la contaminación aérea es, pues, una constante tanto en la naturaleza como en los países desarrollados y se incrementa en los que se acercan al desarrollo: ¿cuáles son las consecuencias sobre los ecosistemas?

El objetivo de esta comunicación es mostrar, basados en casos investigados precedentemente, el camino que sigue la contaminación aérea sobre el subsistema suelo y, en su caso, sobre la vegetación y las aguas circulantes (si las hubiere). Para ilustrarlo, se indican un caso estudiado por nuestro propio equipo de investigación (parcela forestal de Navasfrías, Oeste de España, frontera a Portugal).

También se muestra una aproximación metodológica para el estudio del problema; de esta manera se sigue el camino de la contaminación aérea hasta el subsistema suelo y, en su caso, sobre la vegetación y las aguas circulantes.

## **Material y métodos**

La parcela forestal estudiada se ubica en el centro-oeste de España (Fig. 1; (Gallardo, 2000)).

El material es Paleozoico, principalmente granitos, esquistos y grauvacas; localmente muestran una fuerte alteración pretérita, pero que en los sitios más erosionados el regolito ha desaparecido, vislumbrándose afloramientos rocosos (Menéndez *et al.*, 2001 y 2003).

El área tiene un clima mediterráneo, subhúmedo, templado (Moreno *et al.*, 2002 a y b). La pluviometría anual media es de 1580 mm año<sup>-1</sup>, con una variabilidad anual acusada; generalmente el otoño es la estación más lluviosa y es la que marca que haya exportación hídrica (aparición de arroyos).

El bosque climácico lo representa el rebollar caducifolio de roble rebollo (*Quercus pyrenaica*), especie marcescente y acidófila; como substrato arbustivo aparecen en los

claras especies, en general también acidófilas, de los géneros *Pteridium*, *Cytisus*, *Calluna*, etc. (Gallardo *et al.*, 1998c).

Los suelos dominantes son Cambisoles dísticos y Umbrisoles cámbicos, con inclusiones de Leptosoles; es decir, ácidos y ricos en materia orgánica edáfica (MOS), con profundidad variable (Gallardo *et al.*, 1980 a y b).

Se colocaron lisímetros de diferentes formas para atrapar los polvos atmosféricos, el agua de lluvia directa o el agua que atraviesa el dosel arbóreo (agua trascolada; Moreno *et al.*, 2001). Se monitoreó la evolución de la caída de agua de lluvia tras períodos secos (influencia de los polvos atmosféricos) en función de la cantidad acumulada de lluvia (mm) después de cada período seco (verano), siguiéndose el contenido de humedad del suelo con un medidor de humedad de tierra (TDR) y tubos de cerámica (Menéndez *et al.*, 2001 y 2003). Se colocaron diferentes lisímetros a diferentes profundidades del suelo (incluida escorrentía superficial), determinando el flujo de aguas en la parcela y cuenca (Menéndez *et al.*, 2001; Vicente *et al.*, 2003). Los datos recogidos permiten caracterizar los períodos de adsorción y los períodos de lixiviación; igualmente permiten comprobar si existen pulsos de calidad de agua de lluvia que, a su vez, determinen la calidad del agua del arroyo (cuando el suelo se satura de agua). Igualmente se construyó una presa para conocer las salidas de la microcuenca (Gallardo *et al.*, 1999 a y b).

## Resultados y discusión

### a. Balance de agua: lavado de la atmósfera

Las lluvias lavan la atmósfera, arrastrando la contaminación atmosférica al suelo (Gallardo, 2000).

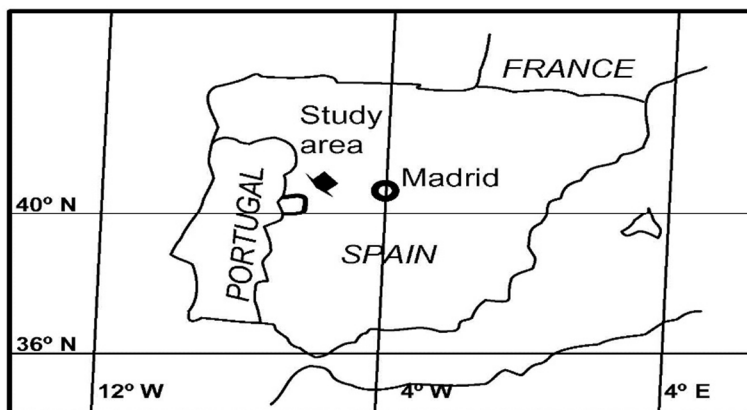
La pluviometría anual media del sitio estudiado (Navasfrías, NF) es 1580 mm a<sup>-1</sup>, con una variabilidad interanual acusada; generalmente el otoño es la estación más lluviosa y la que marca que haya exportación hídrica (arroyo); puede haber otro pico primaveral de lluvias que, en caso de que el suelo continúe saturado, origina la aparición de arroyos, pero con gran variación interanual (Gallardo *et al.*, 1998b). Esto significa que los polvos atmosféricos se acumulan mayormente en períodos secos, bien estivales (sequía mediterránea estival), bien invernales (anticiclón invernal).

Parte del agua no alcanza el suelo (evaporada por el dosel arbóreo); esta es proporcional usualmente a la cantidad de lluvia, por lo que es fácil calcular su cuantía (el porcentaje fue establecido en, al menos, un 20 % de la lluvia caída, pero



dependiente de la intensidad de lluvia); mediciones indicaron valores de 500 a 600 mm a<sup>-1</sup> los años lluviosos (Gallardo *et al.*, 1998 a y b), en especial si llueve abundantemente cuando las hojas ya se han desarrollado (primavera). Esta disminución de la cantidad de agua que cae realmente al suelo origina que los polvos atmosféricos se concentren en las soluciones hídricas, enriquecidas a su vez por el lavado de las hojas (aguas de transcolación), arrastrándose no solo el polvo atmosférico y depositado sobre estas, sino que también de elementos solubles (ej. potasio). La Tabla 1 indica un balance obtenido en la parcela de NF (Gallardo *et al.*, 1998 a y b; Gallardo y Moreno, 1999; Gallardo, 2000).

La escorrentía hídrica superficial es esporádica e igualmente variable debido a la alta permeabilidad de estos suelos forestales, bien provistos de materia orgánica edáfica (MOS), usualmente con valores inferiores a 5 mm a<sup>-1</sup> (Gallardo y Moreno, 1999), es decir, prácticamente despreciable. Esto implica que casi todo el agua que cae al suelo como agua de transcolación (más de escurrimiento cortical, poco a veces importante; Gallardo y Moreno, 1999) es la que conforma lo saturado y se drena (agua de drenaje profundo).



**Figura 1.** Ubicación de la parcela de estudio (Navasfrías, provincia de Salamanca, España).

		Gallardo Moreno 1999	y Gallardo 1998 a y b
Período		1990-93	1996-97
Lluvia total	mm/año	1057	1675
Intercepción	mm/año	151	632
Transcolación	mm/año	897	1043
Escurrimiento cortical	mm/año	9,5	N.d.
Escorrentía superficial	mm/año	4,0	N. d.
Entrada al suelo	mm/año	903	N.d.
Drenada a -15 cm	mm/año	N.d.	245
Drenada a -40 cm	mm/año	495	46
Drenada a -70 cm	mm/año	N.d.	95

**Tabla 1.** Balance hídrico de la parcela forestal de Navasfrías (provincia de Salamanca, España).

#### **b. Evolución de la composición química**

Para facilidad solo nos referiremos al C orgánico disuelto (COD), N y P totales en las aguas (Gallardo y Moreno, 1999). Respecto al pH se observa que la mayor acidez se da en el escurrimiento cortical (cuantitativamente poco importante; Tabla 1), dado que va disolviendo los ácidos orgánicos procedentes de la corteza, como se puede observar por el altísima relación C/N resultante (155, Tabla 2). La liberación de bases que se suceden en la capa de hojarasca (escorrentía superficial) y en los primeros centímetros del suelo (drenada superficialmente) hace elevar luego ligeramente el pH. Las aguas más ricas en bioelementos son evidentemente las corticales (Gallardo y Moreno, 1999). Las aguas más puras se dan precisamente en las aguas de lluvia antes de atravesar el dosel arbóreo y cuando han atravesado el suelo (drenaje profundo a -70 cm). Esto significa que las aguas se van impurificando a medida que atraviesa el dosel arbóreo, lavando las hojas de polvos y componentes foliares solubles, así como la hojarasca; pero a medida que atraviesa el suelo este funciona como un adsorbente de nutrientes (en el caso especial del carbono mineralizándolo a CO<sub>2</sub>), con los que se depuran las aguas.

Si en lugar de utilizar los parámetros anteriores nos referimos al C, N y P orgánicos disueltos (COD, NOD y POD respectivamente, dado que son las fracciones más

dinámicas y que pueden ser indicadores aceptables de calidad ambiental) se observan las mismas tendencias (Tabla 3), aunque existen diferencias entre estos valores y los anteriores dado que, aunque se trata del mismo sistema, son diferentes años y autorías (Gallardo *et al.*, 1998 a y b; Gallardo *et al.*, 1999 a y b; Gallardo y Moreno, 1999).

Otro índice usado para diagnosticar calidad de la MOS o el COD de las aguas es la relación C/N; valores entre 10 y 15 indican que se tratan de sustancias humificadas de tipo húmico, mientras superiores a 20 son de tipo fúlvico, mientras que entre 15 y 20 sustancias son mezclas de esas fracciones (Frimmel y Christman, 1988; Ghabbour y Davies, 2005). Se observa, como se dijo, que los compuestos orgánicos del escurrimiento cortical son ácidos carboxílicos sin humificar, mientras que, por lo general (a partir de los valores de C/N) deben dominar ácidos fúlvicos solubles (Tabla 2). Los muy bajos valores encontrados principalmente en aguas superficiales (arroyo y río Hondo; Tabla 3) indican que se tratan principalmente de material microbiológico, no de sustancias humificadas que quedan retenidas en el suelo.

**Tabla 2.** Composición química de las aguas en un rebollar de Navasfrías (Gallardo y Moreno, 1999).

	<b>pH</b>	<b>COD</b>	<b>N total</b>	<b>P total</b>	<b>C/N</b>
<b>Unidades</b>		mg C/L	mg N/L	mg P/L	(media)
<b>Lluvia total</b>	5,4	6,4	0,3	0,04	21
<b>Transcolación</b>	5,5	9,9	0,3	0,08	33
<b>Escurrecimiento cortical</b>	5,2	62	0,4	0,2	155
<b>Escorrentía superficial</b>	5,7	49	1,0	0,2	49
<b>Drenada a -15 cm</b>	5,7	21	0,6	0,04	35
<b>Drenada a -70 cm</b>	5,5	8,4	0,3	0,04	28

COD: carbono orgánico disuelto; N total: nitrógeno total; P total: fósforo total; C/N: relación carbono/nitrógeno.

**Tabla 3.** Composición química de las aguas en un rebollar de Navasfrías (Gallardo *et al.*, 1999 a y b).

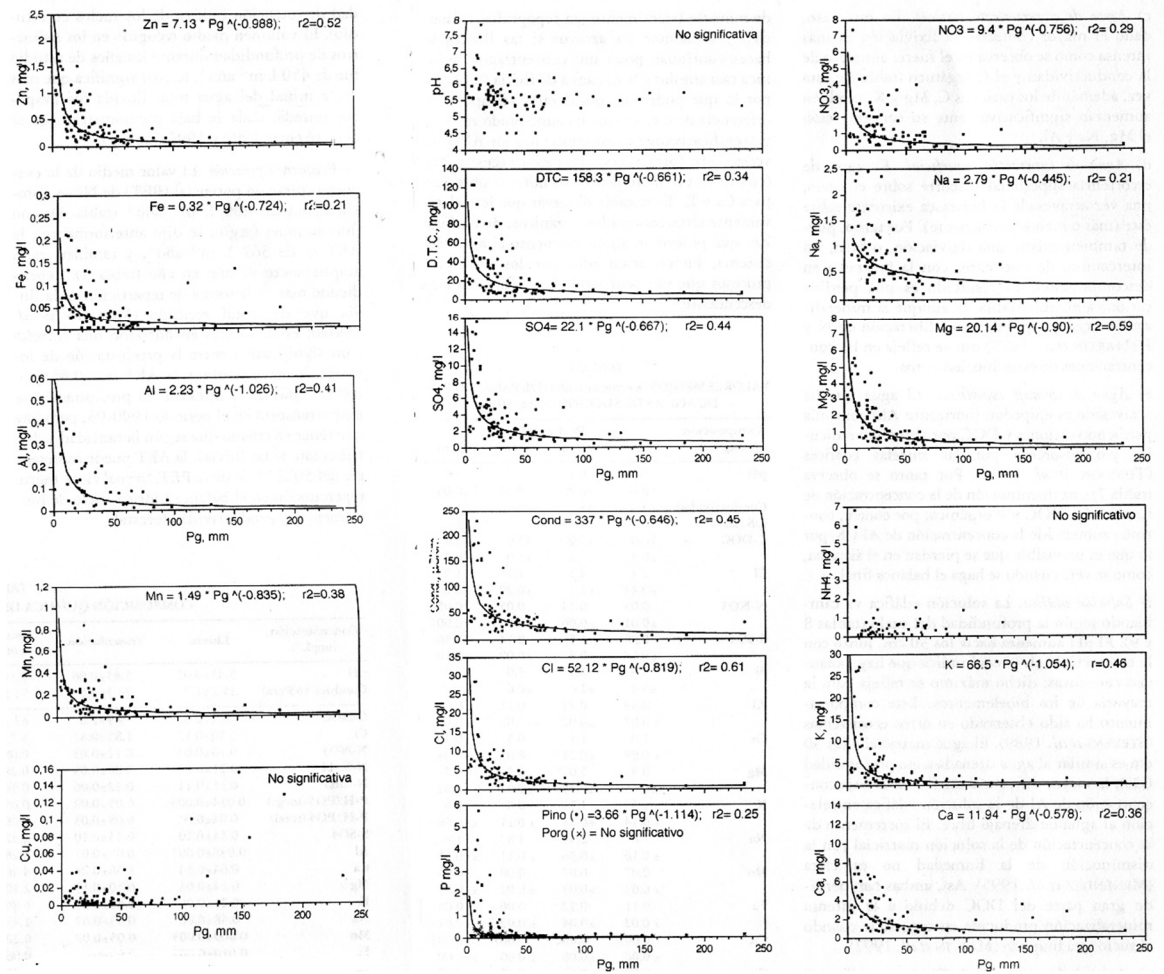
	<b>COD</b>	<b>NOD</b>	<b>POD</b>	<b>C/N</b>
<b>Unidades</b>	mg C/L	mg N/L	mg P/L	(media)
<b>Lluvia total</b>	9,4	0,9	0,01	10
<b>Transcolación</b>	16	1,1	0,04	15
<b>Escorrentía superficial</b>	47	1,6	0,05	29
<b>Drenada a -15 cm</b>	37	1,2	0,05	31
<b>Drenada a -40 cm</b>	25	N.d.	0,02	N.d.
<b>Drenada a -70 cm</b>	17	0,6	0,02	28
<b>Aguas arroyo</b>	2,4	0,5	trazas	5
<b>Río Hondo</b>	1,5	0,4	trazas	4

COD: carbono orgánico disuelto; NOD: nitrógeno orgánico disuelto; POD: fósforo orgánico disuelto; C/N: relación carbono/nitrógeno.

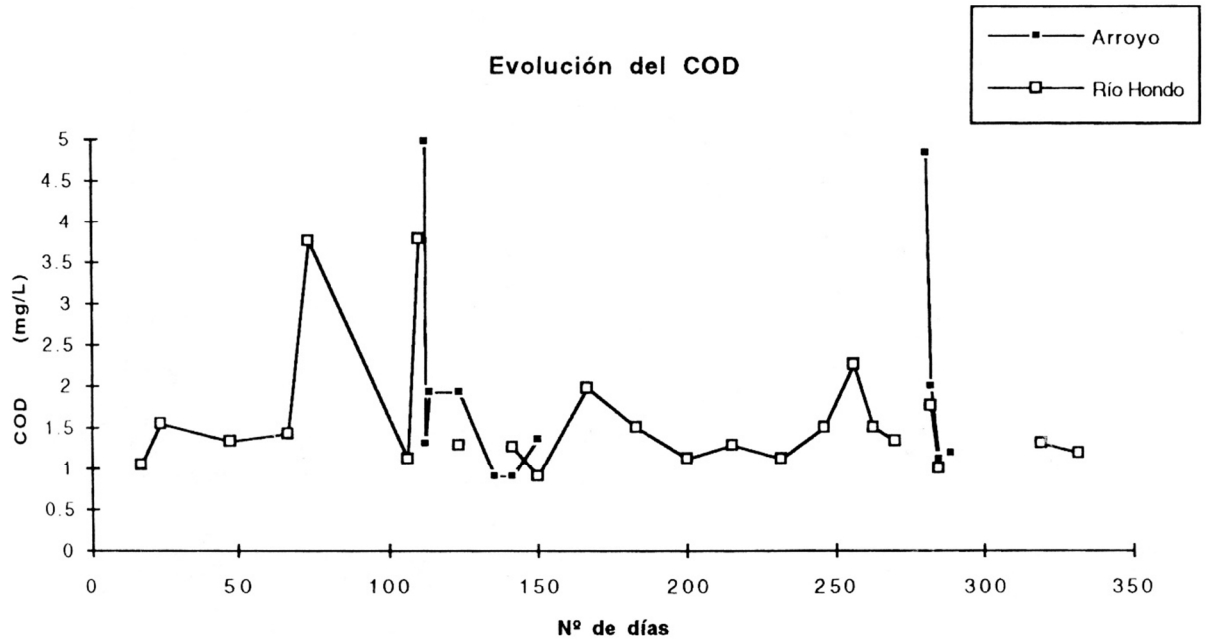
### **c. Arroyo**

Como suele ser general en la zona, el arroyo de evacuación de la microcuenca estudiada es intermitente y empieza a funcionar tras una lluvia acumulada (otoñal e invernal) superior a los 1000 mm aditivos de lluvia; es decir, equivale a indicar que el arroyo evacua agua los años que se superan los 1200 mm a<sup>-1</sup> de agua; este es más activo cuanto más alta es la pluviometría anual. La calidad del agua es tanto mayor cuanto mayor es el agua evacuada (por efecto de dilución). Tras la época de sequía la alta concentración de polvos atmosféricos ocasiona que las primeras aguas de lluvia tengan altas concentraciones de elementos (Fig. 2); ello se manifiesta fehacientemente en las aguas del arroyo, donde aparecen pulsos de altas concentraciones de elementos (contaminación natural) tal y como se denota en la Fig. 2 (Gallardo y Vicente, 1998; Gallardo y Moreno, 1999); se observa que a medida que sigue lloviendo las concentraciones bajan drásticamente y exponencialmente con el tiempo. Estos pulsos de “contaminación” que se suceden en el arroyo tienen consecuencias incluso sobre los ríos sobre los que vierten sus aguas, como puede evidenciarse en la Fig. 3 referido a solo al COD por simplicidad (Gallardo *et al.* 1998 b y c); un pulso del

arroyo de NF tiene consecuencias inmediatas sobre el río Hondo (principal sobre el que vierte).



**Figura 2.** Evolución de las concentraciones de lluvia tras un período seco en Navasfrías (provincia de Salamanca, España).



**Figura 3.** Pulsos de incremento de la concentración de COD (carbono orgánico disuelto) en el arroyo de la parcela de Navasfrías y el cercano Río Hondo (provincia de Salamanca, España).

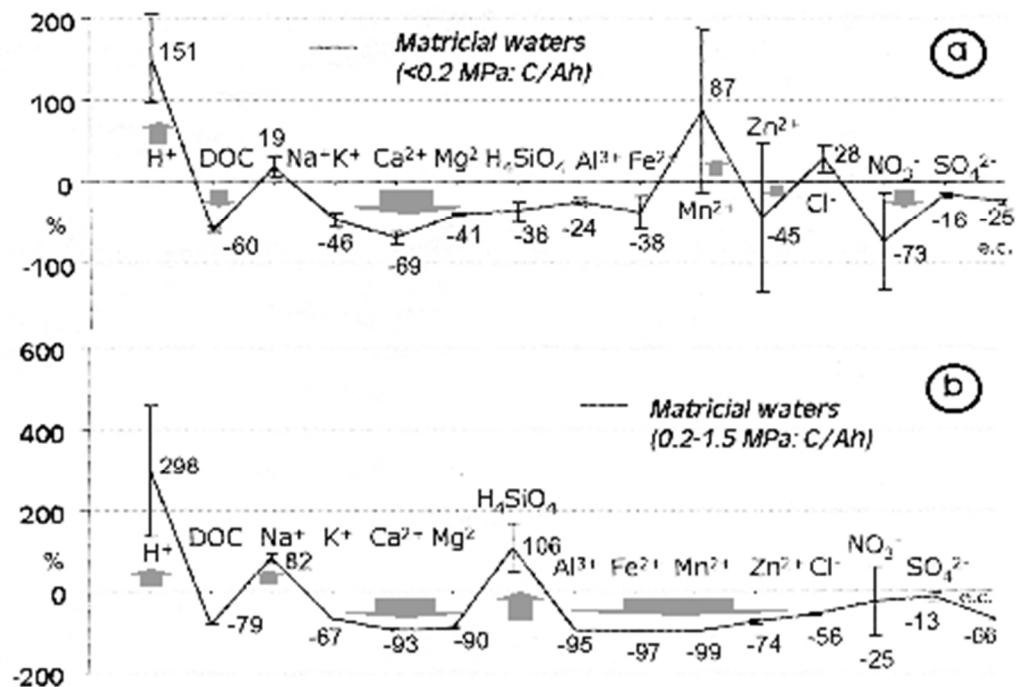
#### d. Suelos

Es claro el papel purificador del suelo de Navasfrías en años normales (no excesiva agua acumulada), dado que se producen adsorciones y absorciones de cationes (Gallardo *et al.*, 2000). La Fig. 4 indica cómo se producen tales procesos en las aguas matriciales a dos presiones (0,2 y 1,5 MPa) al comparar entre los valores obtenidos en los horizontes superficial y profundo edáficos (valores positivos implica pérdidas); se observa que hay una eliminación del exceso de acidez (esto es,  $H^+$ , ácido silícico a altas presiones y  $Mn^{2+}$  a bajas presiones; (Menéndez *et al.*, 2007)). Solo cuando hay exceso de lluvias (régimen fuertemente percolativo) las adsorciones son menos eficaces y las aguas del arroyo denotan las adsorciones incompletas (evidenciándose los pulsos de todos los elementos, diluyéndose y desapareciendo a medida que las lluvias continúan, como indicado anteriormente en la Fig. 2; (Gallardo y Moreno, 1999)).

Por tanto, en general el ecosistema estudiado (Navasfrías) funciona como un sistema de retención de nutrientes, resultando las aguas drenadas más limpias que las que entraron (lluvia). Ello se puede ver fehacientemente en la Tabla 4; se observa que los valores de COD van disminuyendo desde  $71 \text{ kg C ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  en superficie a solo  $1,0 \text{ kg C ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  (mineralizaciones y adsorciones); en el caso de NOD las disminuciones

van de 2,9 a 0,3 kg ha<sup>-1</sup> N año<sup>-1</sup> (absorciones y adsorciones); y en el caso de P los valores van desde 80 a 1,4 kg ha<sup>-1</sup> P año<sup>-1</sup> (adsorciones y absorciones); de ahí que las aguas del arroyo salgan prácticamente puras salvo los pulsos indicados tras los períodos secos (Gallardo *et al.*, 1999 b).

En este juego de adsorciones y desorciones los coloides (cantidad y calidad), entre ellos la abundante MOS en el suelo de NF, juegan un papel fundamental; de ahí su importancia y la necesidad de su conocimiento previo; lo mismo hay que indicar respecto a los coloides inorgánicos (sesquióxidos y arcillas), pocos importantes en NF en relación con los altos tenores de MOS (González *et al.*, 1977; Vicente *et al.*, 2001).



**Figura 4.** Comparación de aguas matriciales entre el horizonte superficial y el profundo a dos potenciales matriciales (0,2 y 1,5 MPa) del suelo de Navasfrías (provincia de Salamanca, España).

**Tabla 4.** Flujos y balance de bioelementos en un rebollar de Navasfrías (Gallardo *et al.*, 1999 b).

<b>Autores</b>	<b>COD</b>	<b>NOD</b>	<b>POD</b>	<b>C/N</b>
<b>Unidades</b>	kg C/ha (año)	kg N/ha (año)	g P/ha (año)	(media)
<b>Lluvia total</b>	94	37	300	3,0
<b>Transcolación</b>	94	11	90	9,0
<b>Drenada a -15 cm</b>	71	2,9	80	25
<b>Drenada a -40 cm</b>	9,4	N.d.	10	N.d.
<b>Drenada a -70 cm</b>	7,7	0,6	10	13
<b>Aguas arroyo</b>	1,0	0,3	1,4	3
<b>Balance (pérdidas)</b>	-1,0	-0,3	-1,4	N. p.
<b>Adsorciones + absorciones</b>	93	37	300	N. p.

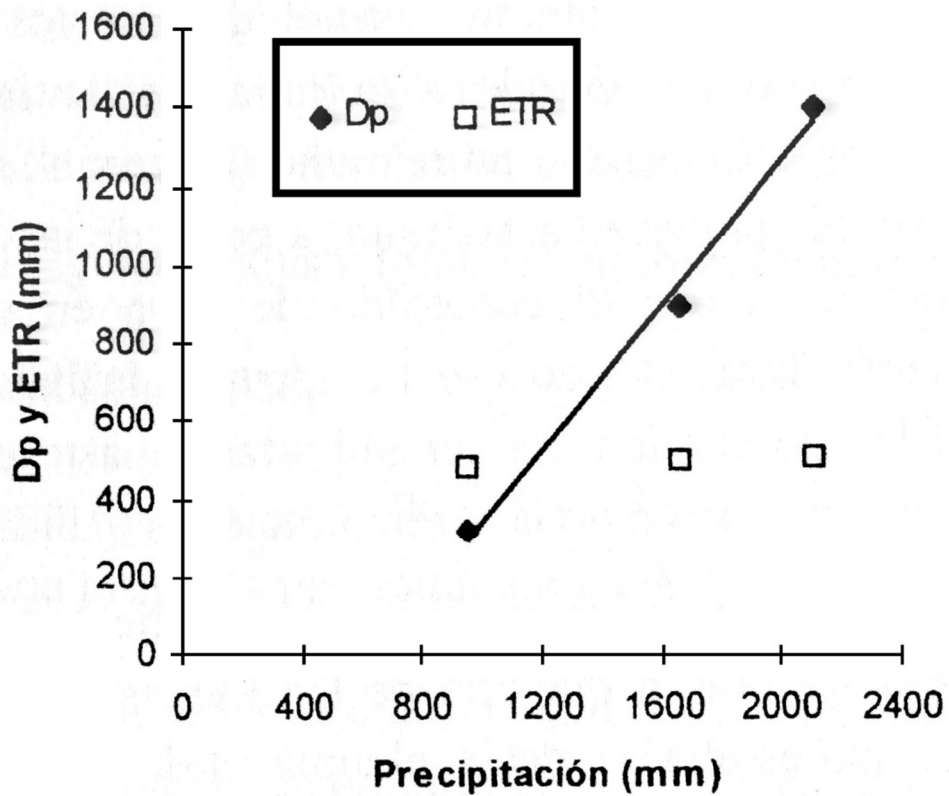
COD: carbono orgánico disuelto; NOD: nitrógeno orgánico disuelto; POD: fósforo orgánico disuelto ; C/N: relación carbono/nitrógeno.

#### **e. Balance y relaciones entre parámetros**

Por supuesto se encontraron relaciones entre la precipitación, transcolación, evapotranspiración real (ETR) y el drenaje profundo edáfico, existiendo una correspondencia temporal entre lluvia y humedad edáfica (Fig. 5; Gallardo *et al.*, 2000; Moreno *et al.* 2001; Moreno *et al.* 2011).

Obviamente al efectuarse un balance las aguas de lluvia cuantifican las entradas mientras que las aguas superficiales, las salidas (exportaciones), sean de escorrentía (que aquí son despreciables), o las del arroyo (que funciona intermitentemente). La Tabla 4 indica esas diferencias, indicando que prácticamente no se pierde C, N o P (Gallardo *et al.*, 1998 a y b); ello corrobora el poder depurador que ejerce el suelo.





**Figura 5.** Correlación entre la pluvimetría, la evapotranspiración real (ETR) y el drenaje profundo (Dp) en la parcela de Navasfrías (provincia de Salamanca, España).

## Conclusiones

Algunas conclusiones del trabajo son:

Las contaminaciones atmosféricas pueden ser de muy diverso origen y naturaleza.

Las aguas de lluvia suelen ser los vectores de tales contaminaciones atmosféricas hacia el suelo.

El suelo funciona mayormente como un sistema tamponado depurador y no siempre una contaminación atmosférica tiene efectos negativos sobre el suelo; es decir, que es necesario estudiar cada caso a través de los procesos que se dan en este (lixiviaciones, adsorciones, absorciones, desorciones y resorciones).

## Agradecimientos

Este trabajo era imposible realizar sin las múltiples ayudas obtenidas de la Unión Europea y diversos fondos españoles para la investigación; un papel crucial jugaron los numerosos doctorandos (que se citan), quienes invirtieron varios años de su vida en obtener numerosos y valiosos resultados, algunos de los cuales se exponen aquí.

## Bibliografía

- BALLESTER, F. 2005. Contaminación atmosférica, cambio climático y salud. *Revista española de salud pública*, 79: 159-175.
- BRAVO, F.; GALLARDO, J.F. 2007. El papel de los bosques en la mitigación del cambio climático. Fundación Gas Natural, Barcelona (I.S.B.N.: 978-84-611-6599-5). pp.320 Pp.
- DOMÈNECH, X. 1991. Química atmosférica: origen y efectos de la contaminación. Miraguano ediciones. ISBN: 84-7813-079-9. 174 pp.
- FERNÁNDEZ-TURIEL, J.L.; PÉREZ-TORRADO, F.J.; SAAVEDRA, J.; OSTERRIETH, M.; CARRIZO, J.I. 2014. Cerro Blanco originó la mayor erupción de los últimos 5000 años en el Noroeste de Argentina. En: Martino, R.D.; Lira, R.; Guerreschi, A.; Baldo, E.; Franzese, J.; Krohling, D.; Manassero, M.; Ortega, G.; Pinotti, L. (ed.). *Actas del XIX Congreso Geológico Argentino*, Córdoba, Argentina. pp. 1093-1094.
- FERNÁNDEZ-TURIEL, J.L.; SAAVEDRA, J.; PÉREZ-TORRADO, F.J.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, A.; CARRACEDO, J.C.; LOBO, A.; REJAS, M.; GALLARDO, J.F.; OSTERRIETH, M.; CARRIZO, J.I.; ESTEBAN, G.; MARTÍNEZ, L.D.; GIL, R.A.; RATTO, N.; BÁEZ, W. 2015. The ash deposits of the 4200 B.P. Cerro Blanco eruption: the largest Holocene eruption of the Central Andes. *Geophysical Research Abstracts*, E.G.U. General Assembly, 12-17 Abril 2015, Viena, Austria. Vol. 17: 3392.
- FRIMMEL, F.H.; CHRISTMAN, R.F. 1988. Humic substances and their role in the Environment. Wiley, Nueva York. pp. 271.
- GALLARDO LANCHO, J.F. 2000. Biogeochemistry of Mediterranean forest ecosystems: A case study. En: Bollag, J.M.; Stotzky, G. (Ed.). *Soil Biochemistry*. Marcel Dekker, Nueva York. 10: 423-460.
- GALLARDO, J.F.; VICENTE, M.A.; MORENO, G. 2000. Lluvia y bosque mediterráneo. *Investigación y Ciencia*, julio: 70-76.
- GALLARDO, J.F.; CUADRADO, S.; EGIDO, J.A. 1980a. Suelos forestales del El Rebollar (Salamanca). II: Propiedades y conclusiones. *Anu. Cent. Edaf. Biol. Apli.*, 6: 214-228.
- GALLARDO, J.F.; EGIDO, J.A.; GONZÁLEZ, M.I.; QUILCHANO, C.; VICENTE, M.A. INGELMO, F. 1998a. Dynamics and evolution of DOC, DON, and DOP in the Navasfrías experimental forest plot during 1996/97 cycle (province of Salamanca, Central-Western Spain). En: Mulder, J. (ed.).

PROTOS: Production and transport of organic solutes: Effects of natural climatic variation. N.I.S.K. (Oslo, Noruega). 1: 18-22.

GALLARDO, J.F.; EGIDO, J.A.; PRAT, L. 1980b. Suelos forestales de El Rebollar (Salamanca). I: Consideraciones generales. Anu. Cent. Edaf. Biol. Apli., 6: 193-213.

GALLARDO, J.F.; MARTÍN, A.; MORENO, G.; SANTA REGINA, I. 1998c. Nutrient cycling in deciduous forest ecosystems of the 'Sierra de Gata' mountains: Nutrient supplies to the soil through both litter and throughfall. Ann. Sci. For., 55: 771-784.

GALLARDO, J.F.; MORENO, G. 1999. Modificación de la composición química del agua de lluvia en un ecosistema mediterráneo (Monte de *Quercus pyrenaica*, Navasfrías, Oeste español). Ecología, 13: 3-23.

GALLARDO, J.F.; VICENTE, M.A. 1998. Compositional changes in incident water in a forest ecosystem of the 'Sierra de Gata' mountains (province de Salamanca, Spain) and comparison with stream-water composition. En: Tappeiner, U.; Ruffini, F.V.; Fumai, M. (ed.). Hydrology, water resources and ecology of mountain areas. Head-Water/'98, European Academy Bozen, Bolzano. pp. 205-208.

GALLARDO, J.F.; VICENTE, M.A.; GONZÁLEZ, M.I. 1998b. Flujos de C, N y P disueltos en un ecosistema forestal de la Sierra de Gata (provincia de Salamanca, España). En: Riccardi, A. (ed.). Actas del X Congreso Latinoamericano de Geología (Buenos Aires). Servicio Geológico y Minero Argentino, Buenos Aires (R. Argentina). 1: 405-411.

Gallardo, J.F.; Vicente, M.A.; González, M.I. 1999. Transfer of dissolved organic matter from the soil to a stream in a catchment located at the 'Sierra de Gata' mountains (Western Spain). En: Zaujec, A.; Bielek, P.; Gonet, S.S. (ed). Humic substances in Ecosystems. Soil Science Conservation Research Institute, Bratislava (Eslovaquia). 1: 167-172.

GONZÁLEZ, M.I.M.; GALLARDO, J.F.; EGIDO, J.A. 1977. Evolución de la materia orgánica de un suelo climax y de un suelo de repoblación de la Vertiente Norte de la Sierra de Gata (Salamanca). Anal. Edaf. Agrobiol., 1167-1186.

Ghabbour, E.A.; Davies, G. 2005. Humic substances. Taylor & Francis, Nueva York. pp. 268.

HOLMAN, C.; HARRISON, R. QUEROL, X. 2015. Review of the efficacy of low emission zones to improve urban air quality in European cities. Rev. Atmospheric Environ., 111: 161-169.

MENÉNDEZ, I.; GALLARDO, J.F.; VICENTE, M.A. 2003. Functional and chemical calibrates of ceramic cup water samplers in forest soils. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 34: 1153-1175.

MENÉNDEZ, I.; MORENO, G.; GALLARDO, J.F. 2001. Caracterización de aguas gravitacionales y matriciales en *Umbrisoles* forestales, Sierra de Gata, Sistema Central español. En: Sociedade Geológica de Portugal, 'Ambientes Quaternários: Intersecção entre geodinâmica, clima, biodiversidades e Homem', Lisboa (Portugal). 1: 121-124.

MICHALZIK, B.; TIPPING, E.; MULDER, J.; GALLARDO LANCHO, J.F.; MATZNER, E. 2003. Modelling the production and transport of dissolved organic Carbon in forest soils. Biogeochemistry, 66: 241-264.

- MORENO, G.; GALLARDO, J.F.; BUSSOTTI, F. 2001. Canopy modification of atmospheric deposition in oligotrophic *Quercus pyrenaica* forests of an unpolluted region (Central Western Spain). *For. Ecol. Manage.*, 149: 47-60.
- MORENO, G.; GALLARDO, J.F. 2002a. Atmospheric deposition in oligotrophic *Quercus pyrenaica* forests: Implications for forest nutrition. *For. Ecol. Manage.*, 171: 17-29.
- MORENO, G.; GALLARDO, J.F. 2002b. H<sup>+</sup> budget in oligotrophic *Quercus pyrenaica* forests: Atmospheric and management-induced soil acidification? *Plant & Soil*, 243:11-22.
- NAVARRO, L.; HERRERO, J.; GALLARDO, J.F.; SAAVEDRA, J. 1975. Empleo de la biogeoquímica como método de prospección: Aplicación a yacimientos de sulfuros de la Provincia de Huelva. II Cong. Ibero-Americano Geol. Económica, Buenos Aires. pp.: 171-188.
- ONURSAL, B.; GAUTAM, S. 1997. Contaminación Atmosférica por Vehículos Automotores: Experiencias recogidas en siete centros urbanos de América Latina. Documento técnico del Banco Mundial N.º. 373S. Banco Mundial; Washington D.C. pp. 337.
- OTERO, X.L.; ÁLVAREZ, E.; FERNÁNDEZ-SANJURJO, M.J.; MACÍAS, F. 2012. Micronutrients and toxic trace metals in the bulk and rhizospheric soil of the spontaneous vegetation at an abandoned copper mine in Galicia (NW Spain). *J. Geochem. Exploration*, 112: 84–92.
- PINILLA GIL, E. 2007. Riesgos laborales y ambientales por contaminantes atmosféricos generados en incendios forestales. En: Rodríguez Ramos, M.J.; Salas Trujillo, F. Prevención de riesgos laborales y ambientales en trabajos de extinción de incendios forestales. Tecnos, Madrid. pp. 195-218.
- QUEROL, X; ALASTUEY, A.; MORENO, T.; VIANA, M.M.; CASTILLO, S.; PEY, J.; RODRÍGUEZ, S.; ARTIÑANO, B.; SALVADOR, P.; SÁNCHEZ, M.; GARCÍA DOS SANTOS, S.; HERCE GARRALETA, M.D.; FERNÁNDEZ PATIER, R.; MORENO-GRAU, S.; NEGRAL, L.; MINGUILLÓN, M.C.; MONFORT, E.; SANZ, M.J.; PALOMO MARÍN, R.; PINILLA GIL, E.; CUEVAS, E.; DE LA ROSA, J.; SÁNCHEZ DE LA CAMPA, A. 2008. Spatial and temporal variations in airborne particulate matter (PM10 and PM2.5) across Spain 1999–2005. *Atmospheric Environ.*, 42(17): 3964–3979.
- QUILCHANO, C.; HANEKLAUS, S.; GALLARDO, J.F.; SCHNUG, E.; MORENO, G. 2002. Sulphur balance in a broadleaf, non-polluted, forest ecosystem (Central-western Spain). *For. Ecol. Manage.*, 161: 205-214.
- RODRÍGUEZ-LARA, L.; MURCIEGO, A.; RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, M.A.; PINILLA, E.; TORO GORDILLO, C.; OSTAPCZUK, P. 2001. Contaminación de suelos y vegetación en minas abandonadas de Sb en Extremadura. *Bol. Soc. Española Mineral.*, 24-A: 115-116.
- SCHNUG, E. 1998. Sulphur fertilization. En: Pedersen, C.A.; Knusen, L.; Schnug, E. (ed.). *Sulphur in Agroecosystems*. Springer Verlag, Berlín. pp.: 115-134.
- Sione, W.; Aceñolaza, P.; Zamboni, L.P.; Del Valle, H.F.; Serafini, M.C.; Gallardo, J.F. 2009. Aplicación de la teledetección en la estimación de las emisiones extraordinarias de CO<sub>2</sub> por quemas de áreas insulares en el complejo litoral de Río Paraná (R. Argentina). En: Gallardo, J.F.; Campo Alves, J.; Conti, M.E. (ed.). *Emisiones de gases con efecto invernadero en ecosistemas iberoamericanos*. S.i.F.y Q.A., Salamanca. pp.: 255-272.

VICENTE, M.A.; GALLARDO, J.F.; MORENO, G.; GONZÁLEZ, M.I. 2003. Comparison of soil water-contents as measured with a neutron probe and time domain reflectometry in a Mediterranean forest ('*Sierra de Gata*', Central Western Spain). *Ann. For. Sci.*, 60: 185-193.

VICENTE, M.A.; KARSTEIN, K.; GALLARDO, J.F. 2001. Evolution of DOM fraction across the different compartments of a forest ecosystem ('*Sierra de Gata*' mountains): Spectroscopical characterization. En: Zaujec, A.; Bielek, P.; Gonet, S.S. (ed.). *Humic Substances in Ecosystems*. Slovak Agricultural University, Nitra (Eslovaquia). 4: 147-152.

## CAPÍTULO 5

### **Propuesta de remediación con revegetación en área alterada por la actividad petrolera: desfiladero bayo, rincón de los sauces**

Renée H. Fortunato <sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Recursos Biológicos, CIRN, INTA.

<sup>2</sup> CONICET.

<sup>3</sup> Facultad de Agronomía y Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Morón.

e-mail: Fortunato.renee@inta.gob.ar

#### **Introducción**

La presente propuesta ha tenido como finalidad el desarrollo inicial de metodologías para la revegetación de áreas alteradas por la actividad petrolera. La zona de estudio posee características propias de ecosistemas áridos. El suelo, clima y vegetación constituyen un sistema altamente inestable, donde a los agentes naturales de erosión se suman las actividades antrópicas (fuego, sobrepastoreo, además de la explotación petrolera). Como consecuencia de estas acciones las comunidades vegetales se modifican tanto en estructura como en composición florística, constituyendo una sucesión regresiva.

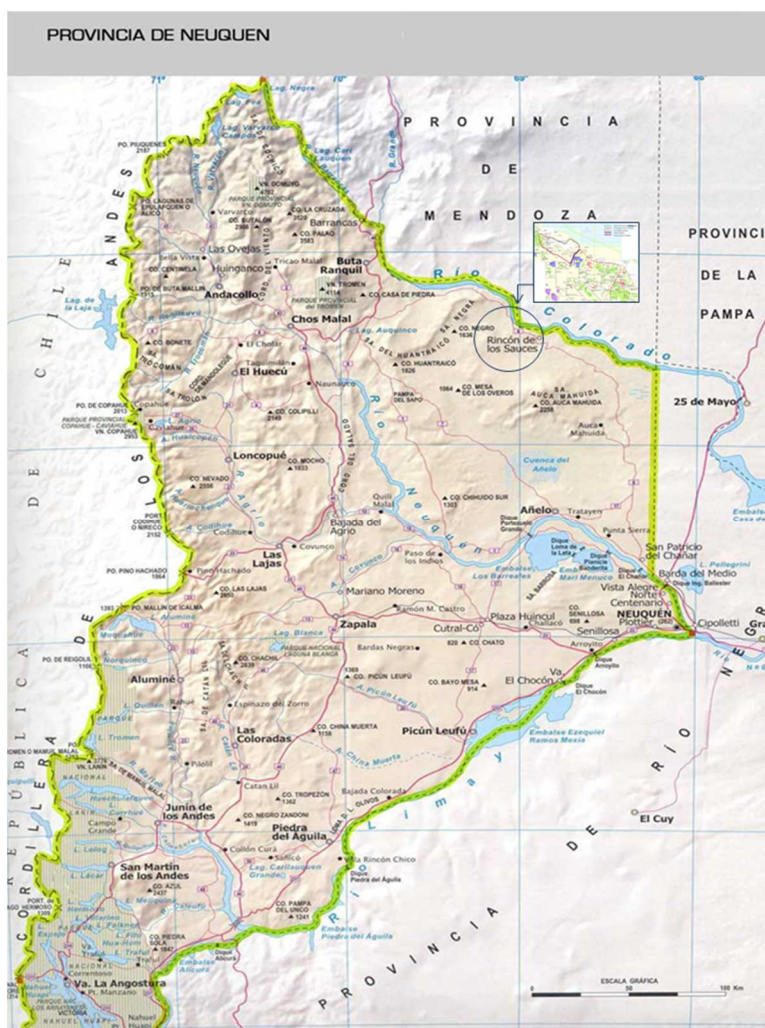
Toda destrucción regresiva actúa produciendo pérdida de biomasa, de riqueza florística, de estructura, etc. Estos procesos van acompañados a su vez de pérdida de suelo, aumento del escurrimiento y disminución de la infiltración que hacen aún más difícil la supervivencia de las plantas. Se debe tener en cuenta qué vegetación y qué suelo constituyen una unidad, destruida la primera, la segunda sufre consecuencias que pueden llevar hasta su desaparición.

El grado de alteración del ambiente condiciona la reversión del proceso de empobrecimiento y desaparición de especies vegetales, por lo que la sucesión de vegetales secundarios no restituyen las comunidades originales, sino que puede alcanzar solo un tipo de vegetación seminatural. Es posible a través de propuestas de intervención mediante el conocimiento del comportamiento de las especies, orientar las tareas de cultivo que favorezcan y acorten el tiempo de recuperación de los ecosistemas.

Los campos petroleros están ubicados en su totalidad en zonas desérticas o semidesérticas donde impactan negativamente las actividades, generándose zonas de

erosión y degradación de suelos. Las causales principales de estos estados de contaminación y perturbación se deben a derrames de hidrocarburos, aguas saladas y movimiento de tierra durante las tareas de la actividad. Estos efectos se suman aunque en pequeña escala a aquellos que provocan un mayor impacto, tal como el sobrepastoreo, especialmente ovino, recolección de leña, etc., los que incrementan la desertificación.

El área problema era un médano aplanado en sentido SO-NE, de 180 m de ancho y 400 m de largo: aprox. 7 ha. Se ubica en el O-SO de la planta de tratamiento de agua para recuperación secundaria de Desfiladero Bayo: a 1 km del Río Colorado y 15 km N de Rincón de los Sauces (Fig.1).



**Fig. 1.** Mapa Neuquén: detalle de Rincón de los Sauces, Desfiladero Bayo.

La región fitogeográfica a la que pertenece es el Dominio Chaqueño, prov. del Monte (Cabrera, 1994), que en condiciones naturales presenta una vegetación de jarilla (*Larrea nitida* Cav., *L. divaricata* Cav., *L. cuneifolia* Cav.), zampa (*Atriplex lampa*

(Moq.) D. Dietr.), olivillo (*Hyalis argentea* D. Don ex Hook. & Arn.), alpataco (*Prosopis alpataco* Phil.), vidriera (*Suaeda divaricata* Moq.) y otros representantes que protegen una baja densidad de cobertura (Figs. 2, 3).



**Fig. 2.** Zampa (*Atriplex lampa*): A. Planta, B. Detalle de rama y hojas.

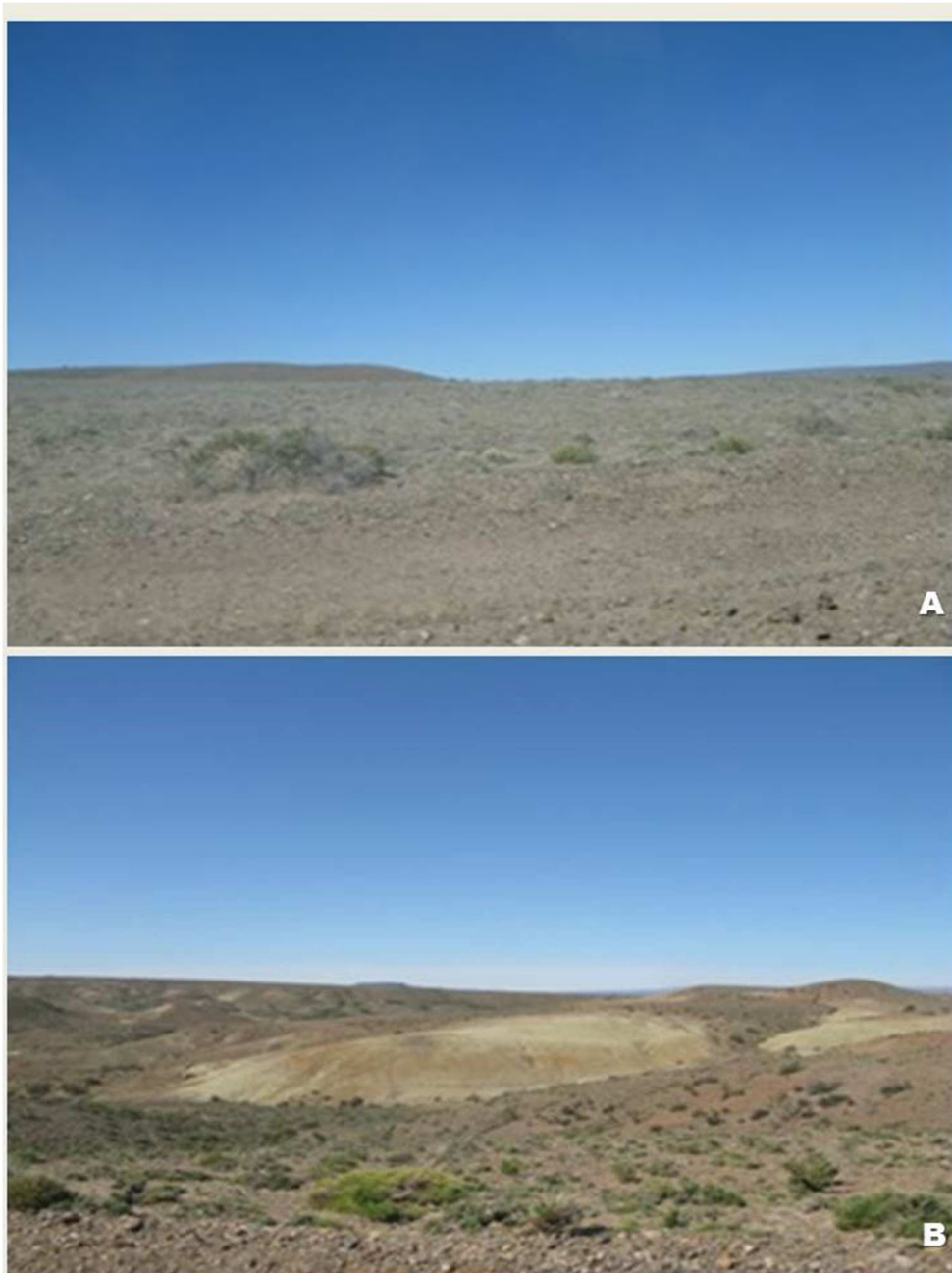


**Fig. 3.** Olivillo (*Hyalis argentea*): A. Planta con papus, B. Detalle de inflorescencia.

Las características comunes de estas especies están relacionadas directamente con el balance y con la economía del agua, encontrándose las que toleran las sequías y las



que la evitan. Los arbustos viven en una consolidación con subarbustos, suculentas, bulbosas, tuberosas, herbáceas perennes y anuales (efímeras). No obstante ante la intensa actividad antrópica, el material original se ha encontrado desagregado, movilizado por los vientos. Además, la acción ha generado río seco de régimen temporario con desplazamiento de sedimentos al médano. Sobre esa base el ambiente biofísico derivado se define como monte pobre, siendo hasta marginal el pastoreo caprino (Fig. 4).



**Fig. 4.** A-B. Monte seco: alrededores de Desfiladero Bay.

Esta región fue visitada durante el año 1995 por investigadores del INTA – CIRN y analizada en conjunto con técnicos de YPF S.A. Gracias a la evaluación se observó

que la zona poseía material de relleno de origen fluvial y eólico que estaba cubierto parcialmente por los afloramientos del grupo Neuquén (Doering, 1882; Groeber, 1918, 1929, 1931; Gerth, 1925; Herrero Ducloux, 1938, 1947; Holmberg, 1964; Stipanovic *et al.*, 1968; Digregorio, 1972; Cazau y Uliana, 1973; Ramos, 1981; Garrido, 2010). La vegetación en condiciones naturales está representada por jarilla (*Larrea cuneifolia*, *L. divaricata*, *L. nitida*), zampa (*Atriplex lampa*), olivillo (*Hyalis argentea*), alpataco (*Prosopis alpataco*) y otros representantes que protegen una baja densidad de cobertura (obs. Fortunato). No obstante ante la intensa actividad antrópica, el material original se encontraba desagregado, movilizado por los vientos. Además, la acción ha generado río seco de régimen temporario con desplazamiento de sedimentos al médano.

Es de señalar que el clima corresponde a la diagonal árida (Chiozza, 1977), dominada por el anticiclón del pacífico, con ambiente semiárido de montaña, donde los veranos son cálidos y los inviernos fríos a frescos (Fig. 5). Las temperaturas máximas alcanzan hasta 41,6 °C en verano y las mínimas a -10 °C en invierno, mientras que la media anual es de 10 °C. Los días con heladas alcanzan a 56 al año, quedan libre los meses de noviembre a marzo (Cabrera, 1994). Las lluvias están acondicionadas a la influencia del anticiclón del pacífico, que genera vientos a sotavento de la cordillera: secos y cálidos, con precipitaciones muy eventuales desde el oeste; las más frecuentes son cuando hay ingreso de vientos húmedos del Atlántico. No obstante el régimen de lluvias es regularmente de 10 mm mensuales durante todo el año, salvo en marzo, junio y septiembre, cuyos promedios están entre 23-33 mm (Promedio 1990-1996: Aerop. Neuquén). Los vientos son de mayor frecuencia del oeste, siguiendo los del sector sudoeste y este, con medias medidas en escala de 1000: 310, 132 y 110 e intensidades de 16 km/h, 21 km/h y 12 km/h, respectivamente.

Como antecedente se indica que la geomorfología del valle del río Colorado y las terrazas de gradación sobre el margen derecho e izquierdo está representada por coladas basálticas surmendocinas de edad terciaria (Silvestro y Atencio, 2009). Los niveles aterrizados de la margen derecha tienen su origen en sedimentos del Grupo Neuquén (edad Cretácica-Terciaria (Garrido, 2010), cuya granometría predominante es areniscas, linos y arcillas distribuidos en forma alternativa y dispuestos en forma pseudohorizontal, y a veces discordante erosiva visto el ambiente de corrientes fluviales y lagunas con procesos de deposición y erosión (Garrido, 2010). El color sedimentario evidenció que representaba un clima árido al momento de la deposición. Asimismo, la red de drenaje confluye múltiples tributarios al río Colorado, es de carácter dendrítico denso, con pendiente fuerte (promedio 5-10 %), genera severo proceso erosivo hídrico

e inhibición de infiltración de agua en el suelo. Es de indicar que el proceso se evidencia por la presencia de cárcavas y cañadones acentuados, los que han causado corte de caminos, arrastre de cañerías, etc., durante las crecidas del río en cercanías de Desfiladero Bayo (Fig. 5B). Gracias a observaciones macroscópicas se ha observado que está representado por Aridisoles, generado por sedimentos, con texturas medias de altos porcentaje de fracción gruesa: cuarzo, altamente friables y susceptibles a erosión hídrica y eólica.



**Fig. 5. A.** Sierra de Acua Mahuida, **B.** Río Colorado.

## **Materiales y Métodos**

Los trabajos fueron tomados a nivel de experimentación, por lo que las conclusiones extraídas tienen carácter provisorio, visto que el período evaluado comprende desde marzo de 1996 a diciembre de 1997.

Las líneas de trabajo seguidas incluyeron:

- Instalación de sistema de riego por aspersión automatizado en 7 ha con el objetivo de mantener humedad constante el médano y así se contener el terreno de los vientos. El agua de riego se obtuvo del río Colorado.
- Suavización del relieve (Fig. 6) y para evitar la erosión hídrica que podría generarse ante la implementación del sistema de riego.
- Reconocimiento de las especies en gabinete posterior al relevamiento florístico y evaluaciones de atributos cobertura absoluta y relativa de las especies, formas de vida, etc.
- Selección de las especies que mostraron comportamiento dominante, pionero o constructivas más adecuadas para la multiplicación.
- Plantación en otoño 1996 de las arbustivas/arbóreas selectas: en el sector O-NO, se trasplantó una cortina perimetral de cuatro hileras equidistantes 3x3 m de álamos (*Populus nigra* L.: especialmente cv Itálica y Chileno) y eucaliptos (*Eucalyptus viminalis* Labill.), y en el sector central a sotavento plantines de zampa (*Atriplex lampa*) sin haber alcanzado la justificación equidistantes 4x4 m (Fig. 2).
- Siembra de Agropiro criollo *Elymus scabrifolius* (Döll) J.H. Hunz. (Fig. 7) sobre surcos de 60 cm de ancho y 50 cm de profundidad, realizados en la zona central y en dirección perimetral al viento dominante. El distanciamiento fue entre hileras de 20 m cubriendo toda el área del médano.
- Implantación de hileras de tamarisco (*Tamarix gallica* L.), extraídos a raíz desnuda de la llanura de inundación del río Colorado, las que fueron plantadas equidistantes 10 x 10 m, en forma alternada a las hileras de Elimo. Tanto tamarisco como Elimo son especies fijadoras de médanos y este último es buena forrajera. Asimismo se introdujeron plantas de olivillo, especie es colonizadora de suelos arenosos. El olivillo fue implantado alternado al Elimo.



**Fig. 6.** A-B. Relleno y explanada.



**Fig. 7.** Agropiro criollo (*Elymus scabrifolius*): A. Planta, B. Detalle de espiga.

## Resultados

En de junio de 1996 se sufrió en la región severos vientos (huracandados) que ocasionaron movilidad parcial del médano en el sector distal hacia el NE, mientras que en el sector O-SO tuvo mínimo desplazamiento, gracias a la fijación de mojado del terreno; asimismo el material abrasivo al ras del suelo provocó abrasión en la implantación, quedando evidenciado la magnitud que pueden provocar los eventos incontrolados. De acuerdo a lo informado por la empresa YPF se reiniciaron en parte las labores señaladas en Materiales y Métodos, reimplantando algunas de las especies citadas, y realizando en cada planta un hoyo  $\pm$  por debajo del nivel del suelo, agregando entre 7-9 g de polímero de alta capacidad de hidratación, fertilizante: NPK y fitohormona de desarrollo radicular. Desde el punto de vista observacional, el desarrollo vegetativo de zampa y elimo, y las arbustivas/arbóreas fue considerado bueno gracias a las condiciones de humedad registradas, mientras que la emergencia de flora espontánea fue muy baja. Es de destacar que visto el período de análisis, no fue posible contar con datos para cubrir porcentaje de plantas vivas en la reimplantación de las especies.

## Conclusiones

Si bien esta evaluación solo incluye el período de marzo de 1996 a diciembre de 1997, por un lado, se puede señalar como conclusión preliminar que el desarrollo vegetativo de zampa, olivillo y elimo, y de las arbustivas/arbóreas implantadas tienen un producto de revegetación relativamente bueno gracias a las condiciones de humedad previamente prestadas al inicio de la propuesta preliminar de remediación, y por otro lado la baja emergencia registrada de la flora espontánea se podría explicar por las modificaciones a las que fuera sometido el terreno.

## Agradecimientos

Esta evaluación inicial con posterior informe preliminar ha sido posible por interés de la empresa YPF, la cual invitó en 1995 a especialistas del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales para que efectuaran un análisis y elevaran una propuesta de remediación. Cabe indicar que los contactos se generaron gracias a los estudios florísticos que se realizaron en la región (especialmente en la zona de la Sierra Acua Mahuida) través del proyecto Flora Patagónica, (Instituto de Recursos Biológicos, CIRN-INTA).

## Bibliografía

- CABRERA, A.L. 1994. Regiones Fitogeográficas Argentinas. En: Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Primera reimposición. Tomo II. Editorial ACME S.A.C.I., Bs. As., Argentina, pp. 85.
- CHIOZZA, E.O. 1977. El país de los argentinos (1.º ed.). Buenos Aires: Centro Editor de América Latina.
- CAZAU, L.B.; ULIANA, M.A. 1973. El Cretácico superior continental de la Cuenca Neuquina. V Congreso Geológico Argentino. Actas 3: 131-163.
- DIGREGORIO, J.H. 1972. Neuquén. En: Leanza, A.F. (Ed.). Geología Regional Argentina. Centenario Academia Nacional de Ciencias: 439-506. Córdoba.
- DOERING, A. 1882. Geología. En: Informe oficial de la Comisión agregada al Estado Mayor General de la Expedición al Río Negro (Patagonia) realizada en los meses de abril, mayo y junio de 1879, bajo las órdenes del General Julio A. Roca. III Parte, Geología: 299-530. Buenos Aires.

- GARRIDO, A. 2010. Estratigrafía del Grupo Neuquén, Cretácico Superior de la Cuenca Neuquina (Argentina): nueva propuesta de ordenamiento litoestratigráfico. *Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat.* 12 (2): 121-177.
- GERTH, F. 1925. Estratigrafía y distribución de los sedimentos mesozoicos en los Andes argentinos. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias* 9: 1-56. Córdoba.
- GROEBER, P. 1918. Edad y extensión de las estructuras de la cordillera entre San Juan y Nahuel Huapí. *Physis* 4(17): 208-240.
- GROEBER, P. 1929. Líneas fundamentales de la geología del Neuquén, sur de Mendoza y regiones adyacentes. Dirección General de Minería, Geología e Hidrología. Publicación 58: 1-109. Buenos Aires.
- GROEBER, P. 1931. El doctor Richard Wichmann y su obra científica. *Physis* 10(36): 267-278.
- HERRERO DUCLOUX, A. 1938. Reconocimiento de la zona situada entre la vía férrea, el río Neuquén y el meridiano de Plaza Huincul. *Yacimientos Petrolíferos Fiscales*. pp. 23.
- HERRERO DUCLOUX, A. 1947. Los depósitos terrestres del Cretácico medio y superior del Neuquén y sur de Mendoza. *Boletín de Informaciones Petroleras* 24(271): 171-178. Buenos Aires.
- HOLMBERG, E. 1964. Descripción Geológica de la Hoja 33d, Auca Mahuida, Provincia del Neuquén. Dirección Nacional de Geología y Minería, Boletín N.º 94: 1-112. Buenos Aires.
- RAMOS, V.A. 1981. Descripción Geológica de la Hoja 33c, Los Chihuidos Norte. Provincia del Neuquén. Servicio Geológico Nacional. Boletín 182: 1-103. Buenos Aires.
- SILVESTRO, J.; ATENCIO, M. 2009. La cuenca cenozoica del río Grande y Palauco: edad, evolución y control estructural, faja plegada de Malargüe (36°S). *Rev. Asoc. Geol. Argent.* 65 (1): 154-169.
- STIPANICIC, P.N.; RODRIGO, F.; BAULIES, O.L.; MARTÍNEZ, C.G. 1968. Las formaciones presenonianas en el denominado Macizo Nordpatagónico y regiones adyacentes. *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 23(2): 67-98.



## CAPÍTULO 6

### **Ecología microbiana de la rizósfera de ryegrass utilizado para fitorremediar suelo contaminados con PAHs**

Luciana Paula Di Salvo<sup>1</sup>, Inés Eugenia García de Salamone<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Av. San Martín 4453, Buenos Aires 1417, Argentina

e-mail: [disalvol@agro.uba.ar](mailto:disalvol@agro.uba.ar)

#### **Introducción**

El fenantreno y el antraceno son hidrocarburos aromáticos formados por tres anillos bencénicos condensados. A los compuestos de este tipo se los denomina comúnmente hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs, por su sigla en inglés). La utilización de combustibles fósiles, la quema de bosques y los desechos o derrames de algunas actividades industriales son fuente de contaminación por PAHs (Dean *et al.*, 2001; Corgié *et al.*, 2004). Los PAHs tienen baja solubilidad en agua y son altamente recalcitrantes en el ambiente. Poseen, además, alta toxicidad (Schwartz *et al.*, 2002) y potencial cancerígeno (IARC, 1983).

Las propiedades físicas del suelo tales como la estructura, la retención hídrica y la saturación de bases se afectan notablemente por la contaminación con hidrocarburos. Con ellas, las propiedades biológicas se ven seriamente modificadas así como también la fertilidad del suelo (Pérez Vargas *et al.*, 2002). Estudios realizados en suelos agrícolas determinaron no solo mermas en los rendimientos, dependiendo del tipo de cultivo (Leyval y Binet, 1998), sino también se registró absorción de PAHs por parte de cultivos de repollo (Tao *et al.*, 2006a), arroz (Tao *et al.*, 2006b; Jiao *et al.*, 2007) y maíz (Lin *et al.*, 2007).

En un suelo sin disturbar, las sustancias biodegradables son mineralizadas bajo condiciones predisponentes. Por el contrario, en un suelo disturbado por agregado de una sustancia contaminante, esta puede biodegradarse pero a una tasa más lenta, derivando en una concentración de la sustancia, que puede inhibir o interferir en el normal funcionamiento del ecosistema. Un suelo que requiere ser biorremediado puede representarse como un ecosistema en el cual la comunidad biológica ha interrumpido su funcionalidad (Tate, 2000).

La degradación biológica de contaminantes es el principal mecanismo de disipación de estos (Dean *et al.*, 2001). De hecho, en todos los ecosistemas existen microorganismos heterótrofos capaces de utilizar los hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono y energía para su crecimiento, produciendo anhídrido carbónico, agua, biomasa y otros productos parcialmente oxidados (Davis, 1967). La mayor parte de la biorremediación del suelo se puede lograr mediante la actividad de la comunidad microbiana nativa del suelo (Madigan *et al.*, 2006). Sin embargo, es conocido que el potencial de biodegradación depende de la capacidad de los microorganismos para adaptarse a las nuevas condiciones ambientales (Zucchi *et al.*, 2003). A pesar de ello, la literatura presenta escasa información referida a los efectos de las propiedades físico-químicas sobre la persistencia o cambios en el contenido de PAHs de los suelos (Oleszczuk y Baran, 2007). Dichas condiciones deben ser predisponentes para la biodegradación, vinculadas a la disponibilidad de nutrientes, pH, humedad del suelo, y disponibilidad de oxígeno. La biodegradación de los contaminantes es altamente dependiente de los niveles de macro y micronutrientes, requiriendo el agregado de nitrógeno y fósforo para aumentar las tasas metabólicas, en especial cuando la disponibilidad de sustratos carbonados aumenta (Tate, 2000; Joner *et al.*, 2002).

Los exudados radicales, restos vegetales y tejidos vegetales vivos son las principales fuentes de carbono para los microorganismos en los ecosistemas terrestres (Kanopka *et al.*, 1998). Exudados radicales es el nombre genérico dado a un conjunto de ácidos orgánicos, azúcares y aminoácidos, entre otros componentes, provenientes de las raíces de todas las especies vegetales. Estas generan un ambiente favorable para la colonización y proliferación de los microorganismos (Hynes *et al.*, 2004). La biodegradación en la rizósfera depende, principalmente, de la cantidad de carbono proveniente de los exudados radicales o de componentes específicos de dichos exudados (Corgié *et al.*, 2004). Junto con la exudación de compuestos, estos autores sugieren que el aumento de la actividad metabólica es producto también de una mayor aerobiosis dado por mayor porosidad debida a la presencia de raíces en el suelo. Además de lo ya mencionado, el crecimiento vegetal implica un mayor uso del agua disponible en el suelo, disminuyendo la lixiviación de contaminantes (Tate, 2000). Es importante tener en cuenta que las probabilidades de pérdida de contaminantes tales como fenantreno y antraceno por lixiviación de aguas es baja, dada la baja solubilidad de estos en ella (Binet *et al.*, 2000a; Chiapusio *et al.*, 2007). Por todo lo antes mencionado, la biodegradación de hidrocarburos en la rizósfera es estimulada por la presencia de raíces vegetales (Günther *et al.*, 1996; Reilley *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2008). Los sistemas radicales más apropiados para un proceso de fitorremediación son los muy densos y ramificados, con mayor superficie de contacto con el suelo,

propio de los pastos (Tesar *et al.*, 2002; Krutz *et al.*, 2005; Larenas Parada y De Viana, 2005; Rivera-Cruz *et al.*, 2006). Estos exudan gran cantidad de compuestos orgánicos solubles (Corgié *et al.*, 2003). Entre ellos, el ryegrass (*Lolium perenne* L.) libera una muy alta cantidad de exudados a la rizósfera (Meharg y Killham, 1995), y por ello ha sido considerado como especie fitorremediadora (Günther *et al.*, 1996; Vouillamoz y Milke, 2001; Corgié *et al.*, 2003).

Durante mucho tiempo, los estudios de comunidades microbianas estuvieron basados en metodologías de aislamientos y análisis taxonómico. Estas metodologías excluyen la mayoría de los microorganismos presentes en la muestra (Paul y Clark, 1996). El hecho de considerar solo algunos grupos microbianos tiene como limitante la imposibilidad de conocer la funcionalidad de la comunidad microbiana en su conjunto. Sin embargo, la presencia o ausencia de ciertos tipos de microorganismos no necesariamente modifica la funcionalidad de la comunidad microbiana (Garland y Mills, 1991). Los perfiles de uso de fuentes carbonadas (CLPP, del inglés sigla de Carbon Level Physiological Profiles) posibilitan el crecimiento y la manifestación de ciertos microorganismos que normalmente no sobreviven con otros métodos de cultivo (Preston-Mafham *et al.*, 2002). Dicha técnica ha sido detallada por Di Salvo y García de Salamone (2012). Las modificaciones de las comunidades microbianas podrían generar improntas en los distintos procesos del ecosistema edáfico (Garland, 1997). Entre estos procesos, se encuentra la oxidación de compuestos orgánicos y dentro de ellos, la reducción de la biodisponibilidad de sustancias orgánicas potencialmente nocivas para la salud. Los CLPP constituyen una herramienta para determinar diferencias entre distintas comunidades microbianas o bien, entre la misma comunidad pero sometida a distintos tratamientos (Di Salvo y García de Salamone, 2012; García de Salamone *et al.*, 2010; 2012; Grayston *et al.*, 1998; Lupwayi *et al.*, 1998; Naiman *et al.*, 2009; Semmartin *et al.*, 2010). El objetivo del trabajo que se presenta a continuación fue evaluar el efecto de los contaminantes antraceno y fenantreno sobre las comunidades microbianas del suelo en interacción con la presencia de ryegrass y el agregado de un fertilizante mineral.

## **Materiales y Métodos**

Se realizaron dos ensayos para evaluar el efecto de la contaminación de antraceno y fenantreno en forma independiente. Para ambos ensayos, se utilizó suelo proveniente de la localidad de Carlos Casares, provincia de Buenos Aires, correspondiente a un Hapludol típico. Antes de ser colocado en las macetas de 250 gramos, se tamizó para

homogeneizar el tamaño de las partículas y para eliminar restos vegetales. Luego de la aplicación de los tratamientos correspondientes, las macetas fueron colocadas en condiciones estables de luz y temperatura, además de ser provistas de riego periódico para el mantenimiento del suelo en el 80 % de capacidad de campo.

Se realizaron tres repeticiones para cada uno de los tratamientos de ambos ensayos. La descripción de los tratamientos para cada uno de los ensayos se detalla en las Tablas 1 y 2.

**Tabla 1.** Descripción de los tratamientos utilizados en el ensayo de contaminación con antraceno.

Abreviatura	Descripción
T	Suelo testigo (sin contaminar)
T+N	Suelo testigo con agregado de fertilizante
T+RG	Suelo testigo sembrado con ryegrass
T+RG+N	Suelo testigo sembrado con ryegrass y con agregado de fertilizante
A	Suelo contaminado con antraceno
A+N	Suelo contaminado con antraceno y con agregado de fertilizante
A+RG	Suelo contaminado con antraceno y sembrado con ryegrass
A+RG+N	Suelo contaminado con antraceno, sembrado con ryegrass y con agregado de fertilizante

**Tabla 2.** Descripción de los tratamientos utilizados en el ensayo de contaminación con fenantreno.

Abreviatura	Descripción
T	Suelo testigo (sin contaminar)
T+N	Suelo testigo con agregado de fertilizante
T+RG	Suelo testigo sembrado con ryegrass
T+RG+N	Suelo testigo sembrado con ryegrass y con agregado de fertilizante
F	Suelo contaminado con fenantreno
F+N	Suelo contaminado con fenantreno y con agregado de fertilizante
F+RG	Suelo contaminado con fenantreno y sembrado con ryegrass
F+RG+N	Suelo contaminado con fenantreno, sembrado con ryegrass y con agregado de fertilizante

Los suelos destinados a los tratamientos contaminados con fenantreno o antraceno se contaminaron de forma artificial mediante el agregado de cristales a razón de 1 g de contaminante  $\text{kg}^{-1}$  de suelo húmedo. Se homogenizaron mediante un intensivo proceso de mezclado con cuchara (Ruberto *et al.*, 2006). Se dejaron estabilizar durante dos meses, manteniéndose a 80 % de capacidad de campo. Ambos contaminantes, marca Fluka de laboratorios Sigma-Aldrich, presentaban valores de pureza del 90 %.

La siembra de ryegrass se realizó con 0,4 g de semilla por maceta para cada uno de los tratamientos con vegetación. El muestreo se realizó a los dos meses de la

emergencia de plántulas. Para los tratamientos con fertilización, se utilizó 3 ml de una solución conteniendo 1 g L<sup>-1</sup> de fertilizante NPK (15:15:15), dos veces por semana a partir de la emergencia de las plántulas. Al finalizar el ensayo, se realizó la determinación de peso seco de biomasa aérea, cortando las plantas de ryegrass a la altura de su cuello. Estas se secaron en estufa a 65 °C y, posteriormente, se determinó el peso para estimar la biomasa aérea. Luego de retirar la biomasa, se tomaron muestras de suelo de cada maceta en el total de la profundidad mediante un sacabocado. Debido al pequeño tamaño de las macetas y a la estructura radical en forma de cabellera de la especie vegetal que ocupaba el total del volumen, se consideró que todo el suelo muestreado en aquellas macetas que fueron sembradas con RG correspondía a suelo rizosférico, de acuerdo con otros autores (Binet *et al.*, 2000b; Chiapusio *et al.*, 2007). A partir del suelo muestreado se realizaron las determinaciones microbiológicas y del contenido remanente de hidrocarburos.

Las determinaciones microbiológicas se realizaron mediante diluciones seriadas en solución fisiológica (NaCl 9 g L<sup>-1</sup>) y siembra en medio de cultivo para recuento de bacterias totales y hongos (Alef y Nannipieri, 1998). Para el recuento de bacterias totales se utilizó el medio de cultivo agar triptona de soja (Oxoid<sup>®</sup>) y para el recuento de hongos se utilizó el medio de cultivo agar extracto de malta (Oxoid<sup>®</sup>). Las placas se incubaron a 28 °C durante siete días, luego se realizó el recuento de colonias (Alef y Nannipieri, 1998). Asimismo, se realizaron recuentos de microorganismos con capacidad de desarrollar en medios de cultivos con fenantreno o antraceno como únicas fuentes carbonadas. Los medios de cultivo se formularon con sales minerales con el agregado de 10 ml L<sup>-1</sup> de fenantreno en solución acuosa (10 mg L<sup>-1</sup>) o 10 ml L<sup>-1</sup> de antraceno en solución de kerosene (200 mg L<sup>-1</sup>). Dada la necesidad de solubilizar el antraceno en kerosene se realizaron recuentos en el mismo medio mínimo, pero con agregado de 10 ml L<sup>-1</sup> de kerosene como única fuente carbonada para ser usado como blanco en los recuentos. La composición de sales minerales del medio de cultivo fue: NH<sub>4</sub>Cl al 0,03 %, NaNO<sub>3</sub> al 0,05 %, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 0,1 %, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O al 0,03 %, CaCl<sub>2</sub> al 0,01 % y FeCl<sub>3</sub> al 0,005 % (Alef y Nannipieri, 1998). Las placas de todos los recuentos se incubaron a 28 °C durante cuatro días, luego se realizó el recuento de colonias.

Se estudiaron los CLPP de las comunidades de hongos filamentosos y de bacterias presentes en los suelos mediante el uso de microplacas FFMicroplates<sup>®</sup> y EcoPlates<sup>®</sup> de Biolog<sup>®</sup>, respectivamente. Estas microplacas fueron sembradas con 150 µl de la dilución 10<sup>-4</sup> de cada una de las muestras, siguiendo las indicaciones del marbete. La incubación se realizó en estufa a 30 °C y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro Multiskan EX<sup>®</sup> (Labsystems, Finlandia) en cuatro oportunidades, a las 24, 48, 72 y 96 horas. Finalmente, se realizó la determinación de PAHs al final del proceso de

fitorremediación. Para ello, se utilizaron 40 g de cada una de las muestras de suelo. La extracción de PAHs se realizó por ultrasonido y diclorometano, según protocolo EPA 3550. Dichas extracciones fueron sometidas a cromatografía líquida de alta resolución, según protocolo EPA 8310.

Los datos obtenidos en los recuentos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANVA), y comparación de medias mediante test de Tukey ( $P < 0,05$ ). Los CLPP de cada muestra se obtuvieron mediante análisis discriminante a partir de los valores de absorbancia de cada una de las celdas. Con el objetivo de maximizar la varianza total explicada, los análisis de ambos tipos de microplacas EcoPlates<sup>®</sup> y FFPlates<sup>®</sup> se realizaron agrupando las fuentes carbonadas incluidas según los criterios presentados por otros autores (Mills y Garland, 2002; Zak *et al.*, 1994; Preston-Mafham *et al.*, 2002). Los grupos determinados para las EcoPlates<sup>®</sup> fueron: ácidos orgánicos, alcoholes, aminoácidos, azúcares simples, ácidos orgánicos hidroxilados, tween, polisacáridos, y las fuentes carbonadas putrescina y ácido itacónico, estas dos últimas quedaron sin agrupar. Los grupos determinados para las FFPlates<sup>®</sup> fueron: monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, misceláneas, amidas, ácidos carboxílicos, alcoholes, ésteres, aminoácidos, aminas y compuestos aromáticos (adenosina, arbutina, uridina). A partir de los valores de absorbancia, también se realizó el cálculo del Índice de Diversidad de Shannon-Weaver ( $H'$ ) para determinación de diversidad funcional, según metodología descrita por Di Salvo y García de Salamone (2012). Para todos los análisis mencionados se utilizó el programa estadístico INFOSTAT/Profesional<sup>®</sup> (Di Rienzo *et al.*, 2011).

## Resultados y discusión

Un buen indicador de la toxicidad por la presencia de los contaminantes en el suelo, como así también de los resultados alcanzados con los tratamientos de remediación, es la biomasa aérea de la especie responsable de la fitorremediación (Larenas Paredes y de Viana, 2005; Tesar *et al.*, 2002; Vouillamoz y Milke, 2001). El análisis realizado con los valores de biomasa aérea, cosechada luego de dos meses desde emergencia no mostró diferencias significativas entre tratamientos en ninguno de los dos ensayos. En promedio, la biomasa aérea fue de 390 y 370 mg por maceta, para el ensayo de antraceno y fenantreno, respectivamente. Otros autores tampoco encontraron diferencias significativas en la biomasa aérea debida a la contaminación por fenantreno (Chiapusio *et al.*, 2007). Estos autores explican que dicha falta de diferencias entre tratamientos puede estar dada por la disminución en la disponibilidad

del contaminante o por el aumento en la resistencia a la biodegradación debidas al tiempo transcurrido entre los momentos de contaminación y la utilización del suelo contaminado para el ensayo, que fue de dos meses al igual que en este trabajo. Otros autores también encontraron una ausencia de diferencias significativas en la biomasa de ryegrass, entre tratamientos contaminados con PAHs y sin contaminar (Xu *et al.*, 2006; Gao y Zhu, 2004). Es importante destacar, sin embargo, que todos los autores coinciden en que un incremento en la concentración de los contaminantes en los suelos respecto a la concentración utilizada en sus ensayos, impactaría negativamente sobre la biomasa de la especie vegetal analizada.

En este trabajo se realizó la determinación del contenido de PAHs únicamente al final del proceso de fitorremediación debido a que se ha demostrado que durante la estabilización de los suelos luego de la contaminación y antes de la aplicación de los tratamientos respectivos, con agregado recurrente de agua, la concentración de PAHs en el suelo fue similar a la cantidad inicial agregada (Amellal *et al.*, 2006; Sheng y Gong, 2006; Chiapusio *et al.*, 2007). Así, las determinaciones de los contenidos de fenantreno y antraceno en los suelos mostraron que las concentraciones finales de estos (Tabla 3) fueron significativamente menores que la cantidad de contaminante agregado a los suelos (1 g/kg suelo húmedo). La ausencia de contaminantes en los tratamientos testigo, así como la ausencia del otro contaminante que no fue agregado al tratamiento, concuerdan con el tratamiento de contaminación aplicado (Tabla 3).

Es importante tener en cuenta que la metodología de incorporación de contaminantes orgánicos a los suelos es clave al momento de diseñar un ensayo. Debido a la baja solubilidad de los PAHs, usualmente se utilizan solventes orgánicos para el agregado de estos a los suelos. Algunos autores han analizado y discutido sobre el efecto negativo de la presencia del solvente sobre la microflora en el suelo bajo estudio (Brinch *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2002; Ruberto *et al.*, 2006). Por el contrario, un mezclado mecánico, como fue aplicado en este trabajo, garantiza la supervivencia de la microflora (Ruberto *et al.*, 2006).

Para determinar el porcentaje de degradación microbiana de los contaminantes es necesario conocer la biodisponibilidad de estas sustancias. Los PAHs poseen alta afinidad por el carbono orgánico, por lo que se encuentran fuertemente adsorbidos a las partículas del suelo y por lo tanto son poco biodisponibles (Coppotelli *et al.*, 2007). Según el protocolo de extracción aplicado en este trabajo, EPA 3550C, por Soxhlet con diclorometano se recupera parte del contaminante presente en el suelo. Sin embargo, este no es uno de los métodos de extracción más rigurosos debido al limitado tiempo de contacto entre el solvente y la muestra. Por lo tanto, es esperable que parte del contaminante quede retenido en la matriz sólida del suelo. A pesar de

ello, mediante la extracción pudo determinarse, en parte, la concentración final de contaminante luego del proceso de fitorremediación, aunque no pudo ser determinada la cantidad de PAHs disponible para degradación biológica. Las tendencias encontradas en el análisis del contenido de PAHs remanentes en los suelos (Tabla 3) evidencian el efecto fitorremediador del ryegrass. La disminución del contenido de contaminantes en las muestras del suelo al final del proceso de fitorremediación puede adjudicarse, en parte, a la degradación por actividad microbiana. En otros trabajos, se observó que la degradación de contaminantes orgánicos en la cercanía inmediata de la raíz de ryegrass es mayor, disminuyendo progresivamente a medida que aumenta la distancia a esta (Corgié *et al.*, 2003; 2004). Estos resultados coinciden con los encontrados por otros autores en suelos contaminados con PAHs y fitorremediados con ryegrass y otros pastos (Reilly *et al.*, 1996; Muratova *et al.*, 2003; Maila *et al.*, 2005).

**Tabla 3.** Valores de contenido de fenantreno y antraceno recuperados mediante la extracción por ultrasonido con diclorometano y cromatografía líquida al final de los ensayos para cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Fenantreno (mg kg <sup>-1</sup> ss <sup>a</sup> )	Antraceno (mg kg <sup>-1</sup> ss <sup>a</sup> )
T	0,0	0,0
T+N	0,0	0,0
T+RG	0,0	0,0
T+RG+N	0,0	0,0
A	0,0	8,4
A+N	0,0	8,6
A+RG	0,0	7,6
A+RG+N	0,0	6,9
F	1,5	0,0
F+N	1,6	0,0
F+RG	0,5	0,0
F+RG+N	0,3	0,0

<sup>a</sup>ss: suelo seco.

Junto con la degradación microbiana, la presencia del vegetal contribuye a la degradación de los contaminantes orgánicos en el suelo a través de procesos de absorción y acumulación en tejidos vegetales (Ling y Gao, 2004), los cuales dependen del contenido de materia orgánica del suelo (Binet *et al.*, 2000a). Al respecto, se demostró que la cantidad de fenantreno y pireno absorbida por plantas de ryegrass representó menos del 0,01 % del total de la degradación de los contaminantes (Gao y Zhu, 2004). Esto es coincidente con lo encontrado en otros trabajos realizados con

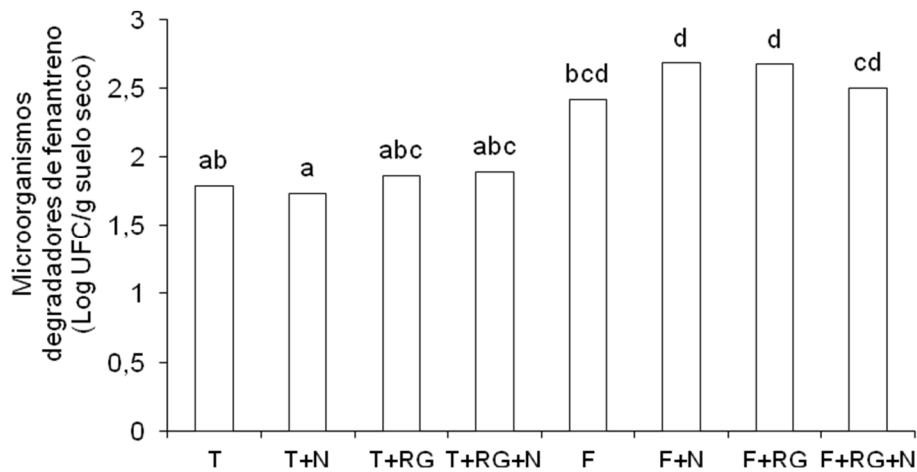


distintos PAHs (Binet *et al.*, 2000a; He *et al.*, 2005). Además, se ha informado que las plantas son capaces de sintetizar PAHs (O'Connor *et al.*, 1991), lo que podría estar afectando la determinación de PAHs absorbido por el vegetal. Por estas razones, en el presente trabajo no se realizó la determinación de contenido de fenantreno y antraceno en tejidos vegetales.

El recuento de microorganismos en medios de cultivo generales representa una herramienta muy útil para conseguir información de las comunidades microbianas de los sitios bajo estudio (Alef y Nannipieri, 1998). En este trabajo, los recuentos de bacterias totales y hongos en medios de cultivo sólidos mostraron valores promedio de 9,06 y 7,52 Log UFC g<sup>-1</sup> de suelo seco para el ensayo de fenantreno y 9,03 y 7,73 Log UFC/g de suelo seco para el ensayo de antraceno, respectivamente. Además de los altos recuentos observados, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Los niveles altos en los recuentos de bacterias totales y hongos para cada una de las muestras indicarían una estabilización en el desarrollo de las poblaciones luego de la contaminación, favorecida por el estacionamiento de los suelos luego de la contaminación con PAHs. El suelo de este ensayo fue estacionado y mantenido a 80 % de capacidad de campo, durante dos meses luego de la contaminación. Varios autores destacan la importancia del estacionamiento de los suelos luego de la contaminación con PAHs para reestablecer las poblaciones microbianas, como un período de adaptación al contaminante (Chaineau *et al.*, 1995; Binet *et al.*, 2000b; Chiapusio *et al.*, 2007). En concordancia, otros autores mostraron que luego de dos semanas desde el agregado de suelos contaminados con hidrocarburos, las comunidades de sus muestras presentaron una estabilización en los recuentos (Zucchi *et al.*, 2003), en valores similares a los presentados en este trabajo. La falta de diferencias observadas en ambos recuentos entre los tratamientos aplicados podría explicarse por el tipo de fuente carbonada y nitrogenada disponible en los medios de cultivo utilizados para bacterias totales y hongos. Dichas fuentes son de uso generalizado por cada uno de los grupos microbianos por lo que no permite evidenciar diferencias en las comunidades presentes en el suelo de cada uno de los tratamientos. La fisiología de degradación de hidrocarburos es mucho más compleja comparada con la degradación de compuestos como extracto de malta y peptona o triptona y peptona de soja, dentro de los medios de cultivos para hongos y bacterias totales respectivamente, razón por la cual podría representar una desventaja en términos de competencia ecológica. Los medios de cultivo, ricos y generales, posibilitan el desarrollo rápido de un amplio número de microorganismos comúnmente encontrado en los suelos, en detrimento de los microorganismos de desarrollo más lento, o que se encuentran en un número menor (Madigan *et al.*, 2006).

El recuento del número de microorganismos con capacidad de degradar fenantreno (Figura 1) mostró que existió una mayor cantidad de estos en los suelos contaminados con este PAH, respecto a los suelos sin contaminar. Esto puede deberse a la presencia del contaminante como aporte de sustrato carbonado para el desarrollo de dichas poblaciones microbianas. Otros autores demostraron que el recuento de degradadores fue mayor en los tratamientos contaminados con fenantreno respecto a los testigos no contaminados (Corgié *et al.*, 2003). Este efecto que se demostró mediante el agregado de fenantreno a los suelos, no se comprobó con la contaminación con antraceno. Por el contrario, el recuento de microorganismos con capacidad de degradar antraceno o kerosene no mostró diferencias significativas entre tratamientos y presentó valores promedio de 2,47 y 1,68 Log UFC g<sup>-1</sup> de suelo seco, respectivamente. Esta falta de diferencias en este recuento podría explicarse por la presencia del kerosene como fuente carbonada, el cual está compuesto por distintas sustancias con variadas resistencias a la degradación y estuvo presente en ambos medios de cultivo. Esto demuestra la necesidad de implementar otras técnicas de cultivo de degradadores, como por ejemplo podría ser un medio basal con agregado de PAHs cuya baja solubilidad vuelva necesaria la agitación constante, que además permitiría incorporar oxígeno al medio de cultivo (Alef y Nannipieri, 1998).

La degradación biológica de PAHs depende de numerosos factores tales como la temperatura del suelo, disponibilidad de oxígeno y disponibilidad del contaminante (Amellal *et al.*, 2001), tipo de contaminante (White *et al.*, 2006), disponibilidad de agua y nutrientes, presencia de especies vegetales, cantidad y calidad de exudados radicales (Corgié *et al.*, 2004, Joner *et al.*, 2001; 2002) y de las características del suelo tales como tamaño y distribución de partículas (Margesin y Schinner, 1997). En relación con la presencia y la actividad de los microorganismos del suelo, es importante destacar que en este trabajo se encontró un alto número de microorganismos con capacidad de degradación, independientemente de los tratamientos aplicados y de las diferencias observadas o no en los recuentos en medios sólidos. Esto confirma que en la naturaleza siempre existen microorganismos capaces de degradar sustancias complejas, aún las más recalcitrantes (Leahy y Colwell, 1990; Sugiura *et al.*, 1997; Ércoli *et al.*, 2000).



**Figura 1.** Recuento de microorganismos con capacidad de degradar fenantreno. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos, mediante test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

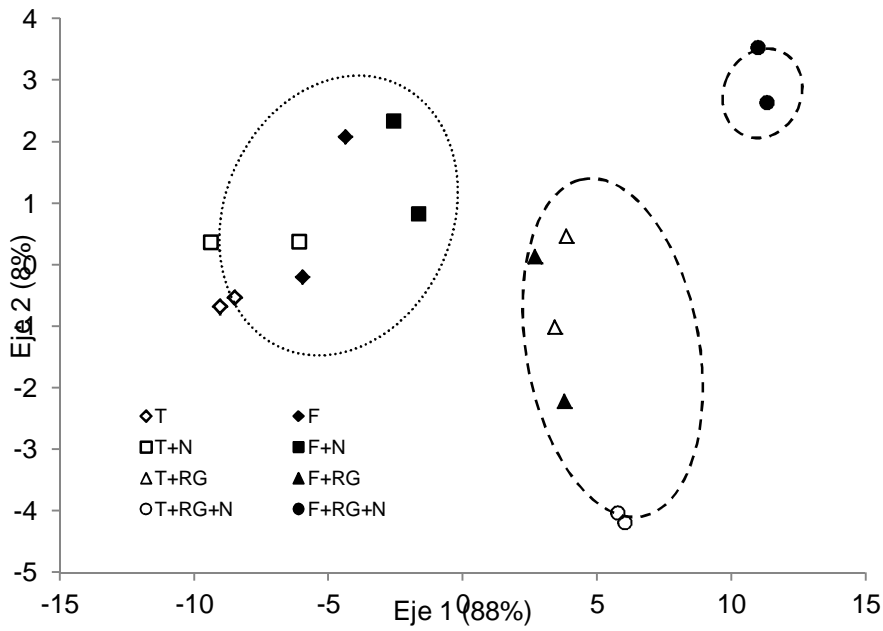
Algunos autores encontraron que suelos con vegetación e inoculados con microorganismos degradadores de fenantreno presentaron un mayor recuento comparado con los sistemas inoculados, pero sin vegetación (Hynes *et al.*, 2004). Sin embargo, en este trabajo no se observaron diferencias entre suelos biorremediados con ryegrass y los suelos sin presencia de este. Esto coincide con lo demostrado por otros autores, quienes señalan que la presencia del vegetal no genera diferencias en el número de microorganismos presentes, sino en la diversidad de la comunidad microbiana (Binet *et al.*, 2000b; Rugh *et al.*, 2005; Chiapusio *et al.*, 2007). En cuanto a esto, los resultados presentados posteriormente, en relación con los perfiles fisiológicos de uso de fuentes carbonadas, posibilitan comprobar lo mencionado con anterioridad.

Los recuentos de microorganismos en medios de cultivos sólidos no tienen en cuenta la estructura de las comunidades presentes, que sí pueden diferir entre tratamientos (Corgié *et al.*, 2003). Es por ello que resulta muy útil el estudio de la actividad potencial de las comunidades mediante herramientas como CLPP, o el estudio de las estructuras de las comunidades mediante técnicas independientes del cultivo, tales como perfiles de ácidos grasos (Joner *et al.*, 2001) o extracciones de ADN (Corgié *et al.*, 2004). Si bien el uso de este tipo de técnicas dejaría de lado el sesgo impuesto por el cultivo de microorganismos en el laboratorio (Dos Santos Teixeira *et al.*, 2007), en este trabajo no se utilizaron estas técnicas debido a que son mucho más complejas que las técnicas de cultivo (Ellis *et al.*, 2003). Varios autores encontraron que las diferencias entre tratamientos de suelos contaminados con metales pesados determinadas mediante técnicas independientes del cultivo fueron mucho menores que aquellas diferencias determinadas mediante técnicas de cultivo microbiano. A

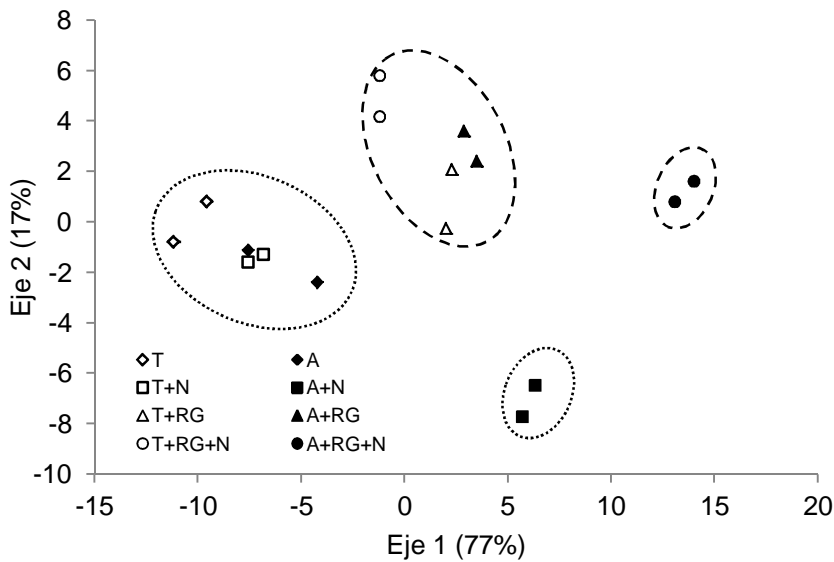
pesar de que las técnicas de cultivo son criticadas por su acción selectiva, dicha discriminación puede ser la forma de determinar impactos dados por la actividad antropogénica sobre la salud del suelo (Bakken, 1997; Ellis *et al.*, 2003).

El análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas obtenidos mediante las microplacas EcoPlates<sup>®</sup> para el ensayo de contaminación con fenantreno se presenta en la Figura 2. Ambos ejes explicaron el 96 % de la varianza total de los datos. El CP1 estuvo conformado, principalmente, por el grupo de fuentes carbonadas de los alcoholes. El CP2 estuvo conformado, principalmente, por los grupos de ácidos orgánicos hidroxilados y de aminoácidos. Este análisis se realizó con los valores obtenidos a las 96 h de incubación y permitió determinar que la fisiología de las comunidades microbianas de los suelos biorremediados con ryegrass fue diferente a la fisiología de las comunidades microbianas de los suelos sin ese tratamiento. Asimismo, la fisiología de las comunidades microbianas de los suelos F+RG+N fue diferente a las otras (Figura 2). El Índice H' mostró que la diversidad funcional de las comunidades microbianas de los suelos T y T+N fue menor respecto a la diversidad funcional de las comunidades microbianas de los suelos F+RG y F+RG+N, con valores promedio de 2,21 y 3,12, respectivamente.

El análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas obtenidos mediante las microplacas EcoPlates<sup>®</sup> para el ensayo de contaminación con antraceno se presenta en la Figura 3. Ambos ejes explicaron el 94 % de la varianza total de los datos. El CP1 estuvo conformado, principalmente, por el grupo de fuentes carbonadas de los ácidos orgánicos, aminoácidos y alcoholes. El CP2 estuvo conformado, principalmente, por los grupos de polisacáridos y de aminoácidos. Este análisis se realizó con los valores obtenidos a las 96 h de incubación y permitió determinar que la fisiología de las comunidades microbianas de los suelos biorremediados con ryegrass fue diferente a la fisiología de las comunidades microbianas de los suelos sin ese tratamiento. Asimismo, la fisiología de las comunidades microbianas de los suelos A+RG+N y de los suelos A+N fueron diferentes a las otras (Figura 3). El Índice H' mostró que la diversidad funcional de las comunidades microbianas de los suelos T y T+N fue menor respecto a la diversidad funcional de las comunidades microbianas de los suelos A+RG y A+RG+N, con valores promedio de 2,21 y 3,25, respectivamente.



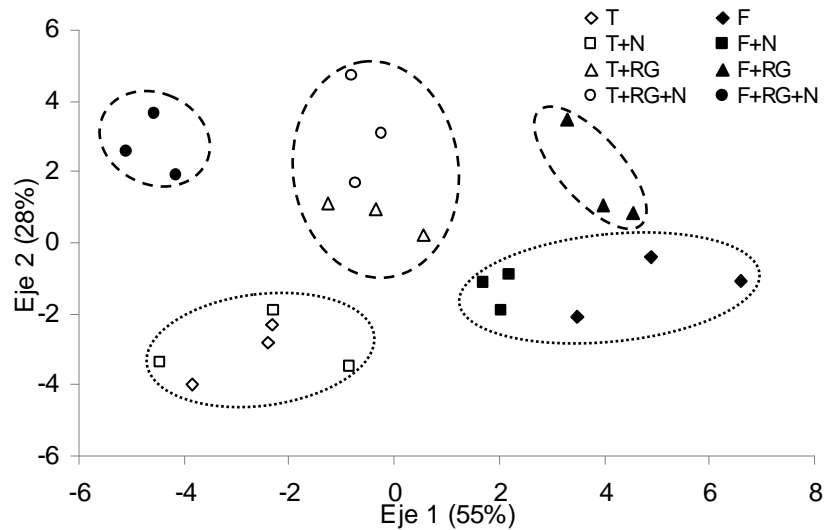
**Figura 2.** Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas obtenidos mediante las microplacas EcoPlates® del ensayo de contaminación con fenantreno. Entre paréntesis se expresa la varianza explicada por cada uno de los ejes. Suelos biorremediados con ryegrass (encerrados en círculo de línea en guion); suelos sin ese tratamiento (encerradas en círculo de línea de puntos).



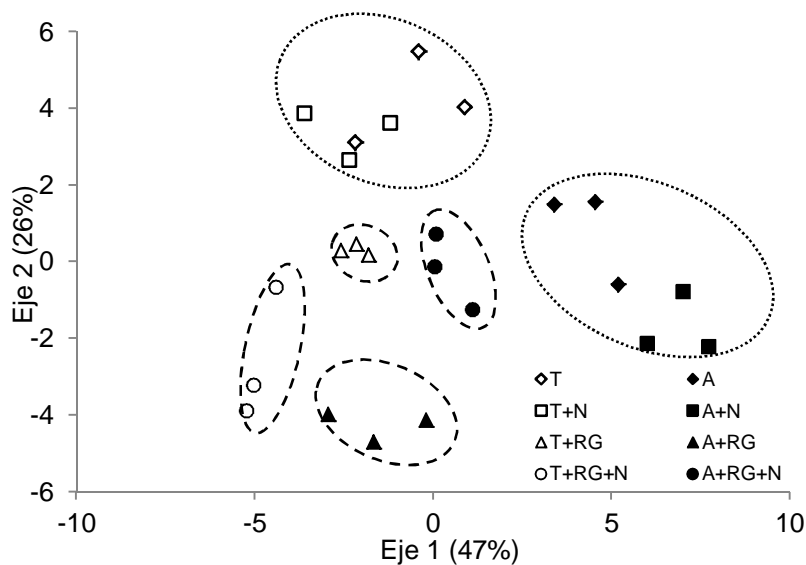
**Figura 3.** Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas obtenidos mediante las microplacas EcoPlates® del ensayo de contaminación con antraceno. Entre paréntesis se expresa la varianza explicada por cada uno de los ejes. Suelos biorremediados con ryegrass (encerrados en círculo de línea en guion); suelos sin ese tratamiento (encerradas en círculo de línea de puntos)..

El análisis discriminante de los CLPP de las comunidades microbianas de hongos filamentosos obtenidos mediante las microplacas FFPlates® para el ensayo de contaminación con fenantreno se presenta en la Figura 4. Ambos ejes explicaron el 83 % de la varianza total de los datos. El CP1 estuvo conformado, principalmente, por el grupo de fuentes carbonadas de los alcoholes. El CP2 estuvo conformado, principalmente, por el grupo de misceláneas. Este análisis se realizó con los valores obtenidos a las 72 h de incubación y determinó que la fisiología de estas comunidades microbianas de los suelos biorremediados con ryegrass fue diferente a la fisiología de las comunidades microbianas de los suelos sin ese tratamiento. Asimismo, la fisiología de las comunidades microbianas de los suelos contaminados con fenantreno fue diferente a la fisiología de las comunidades microbianas de los suelos testigo (Figura 4). El Índice H' mostró que la diversidad funcional de los hongos filamentosos de los suelos T y T+N fue menor respecto a la diversidad funcional de las comunidades microbianas de los suelos F+RG+N, con valores promedio de 3,21 y 4,14, respectivamente.

El análisis discriminante de los CLPP de los hongos filamentosos obtenidos mediante las microplacas FFPlates® para el ensayo de contaminación con antraceno se presenta en la Figura 5. Ambos ejes explicaron el 73 % de la varianza total de los datos. El CP1 estuvo conformado, principalmente, por los grupos de fuentes carbonadas de las misceláneas y de los disacáridos. El CP2 estuvo conformado, principalmente, por los grupos de oligosacáridos y de las misceláneas. Este análisis se realizó con los valores obtenidos a las 72 h de incubación y determinó que la fisiología de este tipo de comunidad microbiana de los suelos biorremediados con ryegrass fue diferente a la fisiología de aquellas de los suelos sin ese tratamiento. Asimismo, la fisiología de las comunidades microbianas de los suelos contaminados con antraceno fue diferente a la fisiología de las comunidades microbianas de los suelos testigo (Figura 5). El Índice H' mostró que la diversidad funcional de las comunidades microbianas de los suelos T y T+N fue menor respecto a la diversidad funcional de las comunidades microbianas de los suelos A+RG+N, con valores promedio de 3,21 y 4,12, respectivamente.



**Figura 4.** Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas obtenidos mediante las microplacas FFPlates® del ensayo de contaminación con fenantreno. Entre paréntesis se expresa la varianza explicada por cada uno de los ejes. Suelos biorremediados con ryegrass (encerrados en círculo de línea en guión); suelos sin ese tratamiento (encerradas en círculo de línea de puntos).



**Figura 5.** Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de las comunidades microbianas obtenidos mediante las microplacas FFPlates® del ensayo de contaminación con antraceno. Entre paréntesis se expresa la varianza explicada por cada uno de los ejes. Suelos biorremediados con ryegrass (encerrados en círculo de línea en guión); suelos sin ese tratamiento (encerradas en círculo de línea de puntos).

La falta de diferencias significativas en los recuentos en medios de cultivo y la menor diferenciación en los perfiles fisiológicos relacionados con los tratamientos con agregado de fertilizante se debieron, muy probablemente, a las características físico-químicas del suelo utilizado para este ensayo, el cual no poseía restricción alguna de nutrientes. Además, según los resultados encontrados, pareciera que los nutrientes agregados mediante fertilización han sido inmovilizados en la biomasa microbiana. Se debe tener en cuenta de que la fuente nitrogenada del fertilizante utilizado es urea. Este compuesto se degrada a amonio, oxidándose luego a nitratos (Rodríguez, 2007), proceso llevado a cabo por microorganismos del suelo. Por una parte, el amonio generado es fuente de nitrógeno para dichos microorganismos que puede ser inmovilizado en la biomasa de estos. Esto coincide con los altos recuentos microbianos obtenidos mediante siembra en medios de cultivo sólidos. Por otra parte, la fuente nitrogenada más favorable para la absorción vegetal son los nitratos. Esto podría explicar también la falta de respuesta de la biomasa de ryegrass a la fertilización.

Numerosos trabajos han demostrado que las EcoPlates<sup>®</sup> de Biolog<sup>®</sup> son muy útiles para determinar diferencias en la fisiología de comunidades de distinto origen o sometidas a distintos tratamientos (Garland y Mills, 1991; Zak *et al.*, 1994; Preston-Mafham *et al.*, 2002). En este trabajo, los perfiles fisiológicos de las comunidades bacterianas analizados mediante los CLPP de las EcoPlates<sup>®</sup> mostraron que, en primer lugar, la fitorremediación con ryegrass generó modificaciones en estas respecto a las comunidades bacterianas del suelo sin la presencia de la planta. En segundo lugar, se observó que las comunidades bacterianas diferían según si el suelo había sido contaminado con antraceno o fenantreno y si había recibido adición de fertilizante como estrategia de biorremediación (Figuras 2 y 3).

Respecto a las microplacas FFPlates<sup>®</sup>, estas han sido reportadas en la bibliografía como muy útiles para la identificación taxonómica de hongos filamentosos aislados de diferentes comunidades microbianas, mediante la comparación con bases de datos existentes (Truu *et al.*, 1999; Classen *et al.*, 2003). El presente trabajo es uno de los primeros en utilizar este tipo de microplacas para el análisis de comunidades microbianas provenientes de muestras ambientales. Así, los perfiles fisiológicos de las comunidades de hongos filamentosos analizados mediante los CLPP de las FFPlates<sup>®</sup> mostraron que una mayor interacción entre la contaminación con antraceno o fenantreno y la fitorremediación con ryegrass (Figuras 4 y 5).



## Conclusiones

Los resultados encontrados en el análisis del contenido de PAHs remanentes en los suelos evidencian el efecto fitorremediador del ryegrass. La disminución del contenido de contaminantes en las muestras del suelo al final del proceso de fitorremediación puede adjudicarse, en gran parte, a la degradación microbiana.

Los resultados para los análisis de biomasa aérea de ryegrass revelaron que la contaminación no generó diferencias significativas de biomasa entre los suelos contaminados y no contaminados. Sin embargo, los resultados pueden variar ante mayores contenidos de los contaminantes en los suelos.

Los altos recuentos de bacterias totales y hongos obtenidos para cada una de las muestras indicarían una estabilización en el desarrollo de las poblaciones luego de la contaminación, favorecida por el estacionamiento del suelo luego de la contaminación con PAHs. La ausencia de diferencias significativas entre tratamientos, para cada uno de los recuentos, podría explicarse por la composición de los medios de cultivo sólidos, complejos y generales, utilizados para la determinación.

Los recuentos de microorganismos con capacidad de degradación de fenantreno mostraron diferencias entre los tratamientos aplicados, fue mayor el recuento en los suelos contaminados. Esto se debe, probablemente, a la presencia del contaminante como sustrato carbonado para el desarrollo de estas poblaciones durante el ensayo.

La ausencia de diferencias entre tratamientos en los restantes recuentos de microorganismos en medio de cultivo sólidos no significó que las comunidades no presenten diferencias entre sí, tal como se pudo comprobar mediante la metodología del análisis de los perfiles fisiológicos.

A partir de los análisis de los perfiles fisiológicos se pudo determinar que la presencia del contaminante y de la planta genera diferencias en la fisiología de las comunidades microbianas tanto bacterianas como fúngicas, a la vez que estimula la diversidad de estas. En forma similar, pero en menor magnitud, se pudieron observar diferencias fisiológicas y estimulación de la diversidad debidas al agregado de fertilizante. Los mismos resultados se pudieron determinar con los análisis del Índice de Diversidad de Shannon-Weaver.

## Bibliografía

- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. 1998. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, pp. 420-421, Academic Press, Londres.
- AMELLAL, N.; PORTAL, J.M.; VOGEL, T.; BERTHELIN, J. 2001. Distribution and location of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-degrading bacteria within polluted soil aggregates. *Biodegradation*, 12:49-57.
- AMELLAL, N.; BOIVIN, A.; PERRIN GANIER, C.; SCHIAVON, M. 2006. High sorption of phenanthrene in agricultural soils, *Agronomy for Sustainable Development*, 26:99-106.
- BAKKEN, L.R. 1997. Culturable and nonculturable bacteria in soil. En: Elsas, J.D.; Trevors, J.T.; Wellington, E.M.H. (ed.), *Modern Soil Microbiology*, Marcel Dekker, Nueva York, Estados Unidos de América.
- BINET, P.; PORTAL, J.M.; LEYVAL, C. 2000a. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass, *Plant and Soil*, 227:207-213.
- BINET, P.; PORTAL, J.M.; LEYVAL, C. 2000b. Dissipation of 3-6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass, *Soil Biology and Biochemistry*, 32:2011–2017.
- BRINCH, U.C.; FLEMMING, E.; CARSTEN, S.J. 2002. Method for spiking soil samples with organic compounds, *Applied and Environmental Microbiology*, 68:1808-1816.
- CHANEAU, C.H.; MOREL, J.L.; Oudot, J. 1995. Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings, *Environmental Science and Technology*, 29:1615-1621.
- CHIAPUSIO, G.; PUJOL, S.; TOUSSIAIT, M.L.; BADOT, P.M.; BINET, P. 2007. Phenanthrene toxicity and dissipation in rhizosphere of grassland plants (*Lolium perenne* L. and *Trifolium pratense* L.) in three spiked soils, *Plant and Soil*, 294:103-112.
- CLASSEN, A.T.; BOYLE, S.I.; HASKINS, K.E.; OVERBY, S.T.; HART, S.C. 2003. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils, *FEMS Microbiology Ecology*, 44:319-328.
- COPPOTELLI, B.M.; MORELLI, I.S.; BERTHE CORTI, L. 2007. Estudio de propiedades promotoras de la biodisponibilidad de hidrocarburos policíclicos aromáticos de la cepa *Shingomonas paucimobilis* 20006FA, XI Congreso Argentino y Latinoamericano de Microbiología, del 10 al 12 de octubre, Córdoba, Argentina, Vol. 39 Supl. 1, ISSN: 0325-7541.
- CORGIÉ, S.C.; JONER, E.J.; LEYVAL, C. 2003. Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots, *Plant and Soil*, 257:143-150.
- CORGIÉ, S.C.; BEGUIRISTAIN, T.; LEYVAL, C. 2004. Spatial distribution of bacterial communities an phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L., *Applied and Environmental Microbiology*, 70:3552-3557.
- DAVIS, J.B. 1967. *Petroleum Microbiology*, Elsevier, Londres, Inglaterra.
- DEAN, S.M.; JIN, Y.; CHA, D.K.; WILSON, S.V.; RADOSEVICH, M. 2001. Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenanthrene-degrading and biosurfactant-producing bacteria, *Journal of Environmental Quality*, 30:1126-1133.

DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W. 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. (Disponible: <http://www.infostat.com.ar>).

DI SALVO, L.P.; GARCÍA DE SALAMONE, I.E. 2012. Evaluation of soil-microbial communities by their CLPP. Standardization of a laboratory technique to replace commercial available microplates, *Ecología Austral* 22(2):129-136.

DOS SANTOS TEIXEIRA, K.; GARCÍA DE SALAMONE, I.E.; ESCOBAR ORTEGA, J.; BOA SORTE, P. 2007. Efecto de la inoculación de PGPR sobre las comunidades microbianas de plantas de arroz, XI Congreso Argentino y Latinoamericano de Microbiología, del 10 al 12 de octubre, Córdoba, Argentina, Vol. 39 Supl. 1, ISSN: 0325-7541.

ELLIS, R.J.; MORGAN, P.; WEIGHTMAN, A.J.; FRY, J.C. 2003. Cultivation-dependent and – independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soils, *Applied and Environmental Microbiology*, 69:3223-3230.

ÉRCOLI, E.; VIDELA, C.; CALLEJAS, C.; GÁLVEZ, J.; VIDELA, S.; CANTERO, J.; MEDAURA, C.; DI PAOLA, M. 2000. Biorremediación por técnica de acumulación aireada, IV Jornadas de Preservación de aguas, aire y suelos en la industria de petróleo y gas. Tomo 2.

GAO, Y.; ZHU, L. 2004. Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils, *Chemosphere*, 55:1169-1178.

GARCÍA DE SALAMONE, I.E.; DI SALVO, L.P.; ESCOBAR ORTEGA, J.S.; BOA SORTE, M.P.; URQUIAGA, S.; DOS SANTOS TEIXEIRA, K.R. 2010. Field response of rice paddy crop to inoculation with *Azospirillum*: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants, *Plant and Soil*, 336:351-362.

GARCÍA DE SALAMONE, I.E.; FUNES, J.M.; DI SALVO, L.P.; ESCOBAR ORTEGA, J.S.; D'AURIA, F.; FERRANDO, L.; FERNANDEZ SCAVINO, A. 2012. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact of plant genotypes on the rhizosphere microbial communities and field crop production, *Applied Soil Ecology*, 61:196-204.

GARLAND, J.L. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology, *FEMS Microbiology Ecology*, 24:289-300.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization, *Applied and Environmental Microbiology*, 57:2351-2359.

GÜNTHER, T.; DORNBERGER, U.; FRITSCH, W. 1996. Effects of Ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil, *Chemosphere*. 33:203-215.

GRAYSTON, S.J.; WANG, S.; CAMPBELL, C.D.; EDWARDS, A.C. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere, *Soil Biology and Biochemistry* 30:369-378.

HE, Y.; XU, J.; TANG, C.; WU, Y. 2005. Facilitation of pentachlorophenol degradation in the rhizosphere of ryegrass (*Lolium perenne* L.), *Soil Biology and Biochemistry*, 37:2017-2024.

HYNES, R.K.; FARRELL, R.E.; GERMIDA, J.J. 2004. Plant-assisted degradation of phenanthrene as assessed by Solid-Phase Microextraction (SPME), *International Journal of Phytoremediation*, 6:253-268.

- IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER). 1983. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Polynuclear aromatic compounds. Part I, chemical, environmental and experimental data, Vol 32, Lyon, Francia.
- JIAO, X.C.; XU, F.L.; DAWSON, R.; CHEN, S.H.; TAO, S. 2007. Adsorption and absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to rice roots, *Environmental Pollution*, 148:230-235.
- JONER, E.J.; JOHANSEN, A.; LOIBNER, A.P.; DE LA CRUZ, M.A.; SZOLAR, O.H.; PORTAL, J.M.; LEYVAL, C. 2001. Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil, *Environmental Science and Technology*, 35:2773-2777.
- JONER, E.J.; CORGIÉ, S.C.; AMELLAL, N.; LEYVAL, C. 2002. Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere, *Soil Biology and Biochemistry*, 34:859-864.
- KANOPKA, A.; OLIVER, L.; TURCO, R.F.JR. 1998. The use of carbon substrate utilization patterns in environmental and ecological microbiology, *Microbial Ecology*, 35:103-115.
- KRUTZ, L.J.; BEYROUTY, C.A.; GENTRY, T.J.; WOLF, D.C.; REYNOLDS, C.M. 2005. Selective enrichment of a pyrene degrader population and enhanced pyrene degradation in Bermuda grass rhizosphere, *Biology and Fertility of Soils*, 41:359-364.
- LARENAS PARADA, G.; DE VIANA, M.L. 2005. Germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, *Ecología Austral*, 15:177-181.
- LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 54:305-315.
- LEE, S-H.; LEE, W-S.; LEE, C-H.; KIM, J.G. 2008. Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes, *Journal of Hazardous Materials*, 153:892-898.
- LEYVAL, C.; BINET, P. 1998. Effect of polyaromatic hydrocarbons in soil on arbuscular mycorrhizal plants, *Journal of Environmental Quality*, 27:402-407.
- LIN, H.; TAO, S.; ZUO, Q.; COVENEY, R.M. 2007. Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by maize plants, *Environmental Pollution*, 148:614-619.
- LING, W.; GAO, Y. 2004. Promoted dissipation of phenanthrene and pyrene in soils by amaranth (*Amaranthus tricolor* L.), *Environmental Geology*, 46:553-560.
- LUPWAYI, N.Z.; RICE, W.A.; CLAYTON, G.W. 1998. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation, *Soil Biology and Biochemistry* 30:1733-1741.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. 2006. Brock. *Biología de los Microorganismos*, 10ma edición, Prentice-Hall International.
- MAILA, M.P.; RANDIMA, P.; CLOETE, T.E. 2005. Multispecies and monoculture rhizoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from the soil, *International Journal of Phytoremediation*, 7:87-98.

- MARGESIN, R.; SHINNER, F. 1997. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3127-3133.
- MEHARG, A.A.; KILLHAM, K. 1995. Loss of exudates from the roots of perennial ryegrass inoculated with a range of micro-organisms, *Plant and Soil*, 170:345-349.
- MILLS, A.L.; GARLAND, J.L. 2002. Application of physiological profiles to assessment of community properties. En: Hurst, C.J.; Crawford, R.L.; Knudsen, D.R.; McInerney, M.J. (ed.). *Manual of environmental microbiology*, ASM Press, Washington D.C pp 135-146.
- MURATOVA, A.; HÜBNER, T.; TISCHER, S.; TRUKOVSKAYA, O.; MÖDER, M.; KUSCHK, P. 2003. Plant-rhizosphere-microflora association during phytoremediation of PAH-contaminated soil, *International Journal of Phytoremediation*, 5:137-151.
- NAIMAN, A.D.; LATRÓNICO, A.; GARCÍA DE SALAMONE, I.E. 2009. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and culturable rhizosphere microflora, *European Journal of Soil Biology*, 45:44-51.
- O'CONNOR, G.A.; CHANEY, R.L.; RYAN, J.A. 1991. Bioavailability to plants of sludge-borne toxic organics, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 121:129-155.
- OLESZCZUK, P.; BARAN, S. 2007. Polyaromatic hydrocarbons in rhizosphere soil of different plants: effect of soil properties, plant species, and intensity of anthropogenic pressure, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38:171-188.
- PAUL, E.A.; CLARK, F.E. 1996. *Soil microbiology and biochemistry*, Academic Press, Inc., San Diego, California, pp.273.
- PÉREZ VARGAS, J.; GARCÍA ESQUIVEL, G.; ESPARZA GARCÍA, F. 2002. Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación, *Avance y Perspectiva*, 21:297-301.
- PRESTON-MAFHAM, J.; BODDY, L.; RANDERSON, P.F. 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles – a critique, *FEMS Microbiology Ecology*, 42:1-14.
- REILLEY, K.A.; BANKS, M.K.; SCHWAB, A.P. 1996. Organic chemicals in the environment: Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere, *Journal of Environmental Quality*, 25:212-219.
- RIVERA-CRUZ, M.C.; TRUJILLO-NARCÍA, A.; FERRERA-CERRATO, R.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; VOLKE-HALLER, P.; SÁNCHEZ-GARCÍA, P.; FERNÁNDEZ-LINARES, L. 2006. Fitorremediación de suelos con benzo(a)pireno mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc., *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*, 22:1-12.
- RODRÍGUEZ, M. 2007. Caracterización de fertilizantes: propiedades determinantes de su calidad agronómica. En: Prystupa, P. (ed.). *Tecnología de la fertilización de cultivos extensivos en la Región Pampeana*, Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires. pp 224.
- RUBERTO, L.A.M.; VAZQUEZ, S.C.; CURTOSI, A.; MESTRE, M.C.; PELLETIER, E.; MAC CORMACK, W.P. 2006. Phenanthrene biodegradation in soils using an Antarctic bacterial consortium, *Bioremediation Journal*, 10:191-201.

- RUGH, C.L.; SUSILAWATI, E.; KRAVCHENKO, A.N.; THOMAS, J.C. 2005. Biodegrader metabolic expansion during polyaromatic hydrocarbons rhizoremediation, *Z Naturforsch*, 60:331-339.
- SEMMARTIN, M.; DI BELLA, C.; GARCÍA DE SALAMONE, I.E. 2010. Grazing-induced changes in plant species composition affect plant and soil properties of grassland mesocosms, *Plant and Soil*, 328:471-481.
- SCHWARTZ, E.; TRINH, S.V.; SCOW, K.M. 2002. Impact of methylene chloride on microorganisms and phenanthrene mineralization in soil, *Journal of Environmental Quality*, 31:144-149.
- SHENG, X.F.; GONG, J.X. 2006. Increase degradation of phenanthrene in soil by *Pseudomonas* sp. GF3 in the presence of wheat, *Soil Biology and Biochemistry*, 38:2587-2592.
- SUGIURA, K.; ISHIHARA, T.; SHIMAUCHI, T.; HARAYAMA, S. 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil, *Environmental Science and Technology*, 31:45-51.
- TAO, S.; JIAO, X.C.; CHEN, S.H.; XU, F.L.; LI, Y.J.; LIU, F.Z. 2006a: Uptake of vapor and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons by cabbage, *Environmental Pollution*, 140:13-15.
- TAO, S.; JIAO, X.C.; CHEN, S.H.; LIU, W.X.; COVENEY, R.M.JR; ZHU, L.Z.; LUO, Y.M. 2006b. Accumulation and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice (*Oryza sativa*), *Environmental Pollution*, 140:406-415.
- TATE, R. L.2000. *Soil microbiology*, Wiley, 2.<sup>a</sup> Ed., Nueva York, EUA.
- TESAR, M.; REICHENAUER, T.; SESSITSCH, A. 2002. Bacterial rhizosphere populations of black poplar and herbal plants to be used for phytoremediation of diesel fuel, *Soil Biology and Biochemistry*, 34:1883-1892.
- TRUU, J.; TALPSEP, E.; HEINARU, E.; STOTTMEISTER, U.; WAND, H.; HEINARU, A. 1999. Comparision of API 20NE and Biolog GN identification systems assessed by techniques of multivariate analyses, *Journal of Microbiological Methods*, 36:193–201.
- VOUILLAMOZ, J.; MILKE, M.W. 2001. Effect of compost in phytoremediation of diesel-contaminated soils, *Water Science and Technology*, 43:291-295.
- WHITE, P.M.JR.; WOLF, D.C.; THOMA, G.J.; REYNOLDS, C.M. 2006. Phytoremediation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in a crude oil-contaminated soil, *Water, Air and Soil Pollution*, 169:207-220.
- XU, S.Y.; CHEN, Y.X.; WU, W.X.; WANG, K.X.; LIN, Q.; LIANG, X.Q. 2006. Enhanced dissipation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by combined plants cultivation, *Science of the Total Environment*, 363:206-215.
- ZAK, H.C.; WILLIG, M.R.; MOORHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach, *Soil Biology and Biochemistry*, 26:1101-1108.
- ZUCCHI, M.; ANGIOLINI, L.; BORIN, L.; DIETRICH, N.; GINGIOTTI, C.; BARBIERI, P.; SORLINI, C.; DAFFONCHIO, D. 2003. Response of bacterial community during bioremediation of an oil-polluted soil, *Journal of Applied Microbiology*, 94: 248-257.

## CAPÍTULO 7

### **Electrobiorremediación de hidrocarburos en suelos insaturados de la Patagonia argentina**

Adrián J. Acuña<sup>2\*</sup>, Oscar H. Pucci<sup>1</sup>, Graciela N. Pucci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada (CEIMA), Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Ciudad Universitaria, Comodoro Rivadavia, Chubut.

<sup>2</sup>Grupo de Estudios Ambientales, Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Santa Cruz. Los Inmigrantes 555, Río Gallegos, Santa Cruz.

\* E-mail: adrianjacuna@yahoo.com.ar

#### **Introducción**

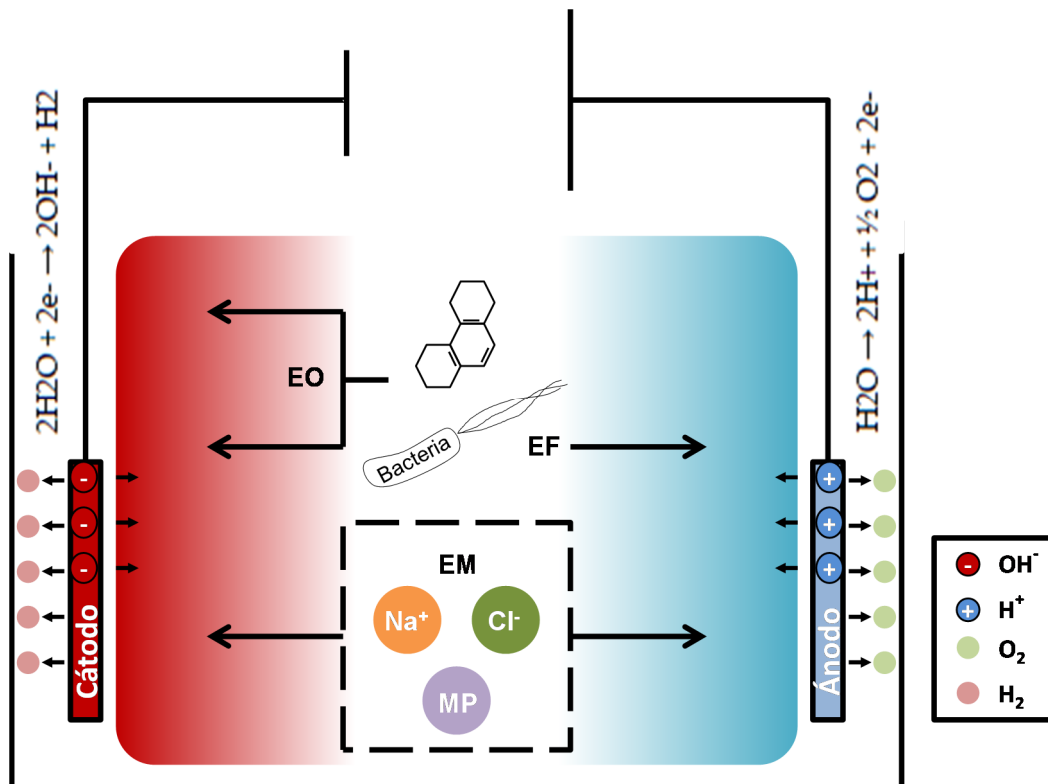
La contaminación de suelos por hidrocarburos suele generar una matriz poco homogénea respecto a la distribución del contaminante con muchas interacciones entre el hidrocarburo y las partículas de suelo. Estas interacciones suelen ser función de las características físicas y químicas del hidrocarburo, como densidad, solubilidad, polaridad etc., junto con las características físicas y químicas del suelo como permeabilidad, estructura, edafología (Ortiz *et al.*, 2007). Muchas veces no es la toxicidad del hidrocarburo la que limita la biodegradación de este, sino su biodisponibilidad. El tiempo de contaminación de los suelos empetroados es un factor para tener en cuenta ya que las contaminaciones recientes son más factibles de ser biorremediadas que las antiguas.

En la región del Golfo San Jorge, Argentina, se realiza una gran actividad industrial dedicada a la explotación de petróleo. Esta actividad se realiza desde hace más de cien años y durante este período se fueron modificando las legislaciones ambientales nacionales y provinciales, haciéndose más exigentes para lograr una mejor calidad de los ambientes contaminados con hidrocarburos. El tratamiento de los pasivos ambientales llevó a desarrollar diferentes técnicas para eliminar los hidrocarburos presentes en los suelos de la Patagonia. Muchos de estos pasivos poseen años de contaminación y degradación de hidrocarburos, sin ningún tipo de asistencia y control, lo que, con modificaciones, hoy se denomina atenuación natural. En la región actualmente se utilizan las técnicas de biodegradación (landfarming, biopilas) para resolver los problemas de suelos contaminados con hidrocarburos. Las técnicas dan

excelentes resultados en los suelos patagónicos cuando se aplican con rigurosidad y un monitoreo constante. Hay numerosos trabajos sobre biodegradación de hidrocarburos que demuestran la importancia y aplicabilidad de la técnica con cualquiera de sus variaciones, biorremediación *in situ*, landfarming, biopilas, etc., en suelos patagónicos (Acuña *et al.*, 2008; Acuña *et al.*, 2009; Pucci y Pucci, 2003; Pucci 1998). En estos trabajos, en general, se llega a la conclusión de que es una tecnología aplicable sobre su ecuación costo beneficio conveniente (Maila y Cloete 2004). Los hidrocarburos alifáticos se eliminan con mayor velocidad, mientras que los hidrocarburos aromáticos y polares se eliminan más lentamente (Pucci y Pucci 2003). Uno de los inconvenientes de estos últimos es la baja biodisponibilidad que poseen, lo que ha tratado de resolverse agregando surfactantes que, en la mayoría de los casos, pueden producir lixiviados importantes.

La electrorremediación es una tecnología para restaurar suelos contaminados por la acción de un campo eléctrico a partir de la aplicación de corriente directa (De la Rosa-Pérez *et al.*, 2007). Los mecanismos de remoción principales son la electromigración, la electroósmosis y la electroforesis (Fig. 1). La electroósmosis es el movimiento del agua a través del suelo desde el ánodo hacia el cátodo en una celda electrolítica, la electromigración es el transporte de iones y complejos iónicos al electrodo de carga opuesta y la electroforesis es el transporte de partículas cargadas o coloides, bajo la influencia de un campo eléctrico. La electroósmosis se produce en función del grado de saturación del suelo, por ello, es un actor primordial en la electrobiorremediación. En estos sistemas se observa una distribución anormal en la humedad del suelo, ya que el agua se mueve en dirección de uno de los electrodos, el cátodo, aumentando la humedad de este y disminuyendo la del ánodo. Esta disminución se encuentra asociada con el desarrollo de poros con presión negativa, variación del pH y fuerza del campo eléctrico, lo cual resulta en una tasa de flujo electroosmótico irregular (Laurson, 1997; Lindgren *et al.*, 1994).





**Figura 1.** Electrobioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en la Patagonia, Argentina. (Adaptado de Acuña, A.J; Pucci, O.H.; Pucci, G.N. 2012. *New Technologies in the Oil and Gas Industry*. Editorial Intech. Croacia. ISBN 980-953-307-363-2. Chapter 2. Pág. 29-48).

La electroremediación ha demostrado su capacidad para remover algunos contaminantes orgánicos, como tricloroetileno e hidrocarburos en estudios de laboratorio y en campo (Martinez Gilbon, 2001; Moleina Díaz *et al.*, 2004). La aplicación que se ha comunicado con más frecuencia es la recuperación de suelos contaminados con metales pesados como Cr, Cd, Hg, Pb, Mn, Zn y As (Acar y Alshawabkeh, 1993; Acar *et al.*, 1995; Kim y Kim, 2001; Reddy y Parupudi, 1997; Suer *et al.*, 2003). Actualmente se está avanzando en el desarrollo de una nueva tecnología denominada electrobioremediación, que combina la biorremediación con la electroremediación. La aplicación de esta nueva tecnología aumenta la biodisponibilidad de los hidrocarburos favoreciendo la posterior biodegradación de los mismos por microorganismos (Wick *et al.*, 2007). Esta técnica ha sido ensayada en laboratorios y existen numerosas publicaciones con suelos saturados contaminados solo con un hidrocarburo puro.

A la electrobioremediación se la ha denominado también bioelectrocínética o bioelectrorremediación. Se combina la aplicación de corriente eléctrica directa con técnicas de biorremediación asistida con nutrientes, aireación y humidificación. Se busca estimular la biodegradación de contaminantes orgánicos al introducir nutrientes para las bacterias dentro del suelo, de manera que el campo eléctrico acelere la

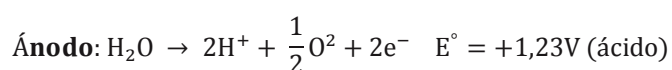
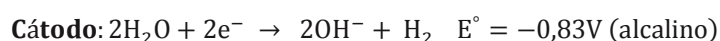
desorción de los contaminantes desde las partículas de suelo, incrementando su biodisponibilidad para que los microorganismos los incorporen a su metabolismo.

La complejidad de las cargas superficiales que poseen las membranas bacterianas hace difícil predecir el comportamiento de estas con los parámetros biofísicos (Bayer y Sloyer 1990). Los polímeros de membrana de las bacterias contienen grupos carboxílicos, sulfatos, fosfatos o aminos, por lo que poseen grupos ácidos y básicos dando así, una superficie anfotérica con carga negativa a pH alto y carga positiva a pH bajo. Esto hace que los microorganismos de un suelo migren en diferentes direcciones bajo la influencia de un campo eléctrico, siempre dependiendo del pH del mencionado suelo.

Los factores más relevantes que influyen el proceso de electrobiorremediación son la naturaleza química del contaminante y humedad, el pH, y el potencial zeta ( $\zeta$ ) del suelo (Virkytyte *et al.*, 2002).

La humedad es importante porque actúa como disolvente de sales que forman los electrolitos. La migración de los electrolitos produce un incremento en el mismo sentido de la humedad, disminuyéndola en el polo contrario, siendo la dirección del agua, desde ánodo hacia el cátodo. La sequedad del suelo en la región del ánodo también puede deberse al calentamiento por el simple paso de la corriente, o por reacciones exotérmicas que puedan producirse en el suelo (Shapiro y Probststein, 1993). Debe establecerse un equilibrio entre la migración electroosmótica, la evaporación por calentamiento y reacciones exotérmicas y el aporte de agua en el ánodo.

El pH promueve interacciones entre metales y otros compuestos que forman parte natural del suelo, esto regula la disponibilidad de los contaminantes (Acar *et al.*, 1995; Virkytyte, *et al.*, 2002). El paso de corriente directa en un suelo con agua produce la electrólisis de esta, generando iones hidrógeno en el ánodo e hidroxilos en el cátodo, según las siguientes ecuaciones:



La aplicación de un campo eléctrico a un suelo, induce a un gradiente de pH (Wick *et al.*, 2007) debido a la electrólisis del agua que produce protones en el ánodo, haciendo que se forme un frente ácido que avanza hacia el cátodo. La naturaleza química del contaminante y su estado tienen influencia en el desarrollo de la electroremediación por electromigración. La situación ideal se presenta cuando el contaminante se

mantiene disuelto en el agua y no precipita por cambios de pH, cuando no se producen cambios por contacto con los electrodos ni interacciona con las partículas del suelo. Esta consigna es parcialmente cumplida por los metales pesados y algunos compuestos orgánicos, como fenoles u otros con carga eléctrica. Los hidrocarburos presentes en el petróleo no cumplen con estas condiciones, ya que en general no tienen carga eléctrica o, si la poseen, es de muy baja intensidad, se adsorben sobre las partículas del suelo y son escasamente solubles en agua. En estas condiciones, tiene importancia la electroósmosis, ya que permite la migración de este tipo de compuestos por arrastre en el mismo sentido que el agua.

El  $\zeta$  es la propiedad que determina la carga de un coloide en función de la superficie cargada y del medio en que se encuentra. Las sales totalmente ionizables no son coloides, por lo que su  $\zeta$  es muy pequeño. El  $\zeta$  en la mayoría de los suelos es negativo. Con el aumento de la acidez disminuye la negatividad de  $\zeta$ , pudiendo alcanzar valores positivos (Virkyte *et al.*, 2002). El aumento del valor de  $\zeta$  afecta el flujo electroosmótico.

Las características de los suelos, como capacidad de absorción, intercambio iónico, capacidad buffer (pH) y carga superficial, tienen marcada influencia en la electrobiorremediación. Esta presenta resultados exitosos en suelos arcillosos, de granulometría fina y permeabilidad baja. Los suelos arenosos deben tener una estructura impermeable a una profundidad razonable que permita un elevado grado de humedad o saturación (Virkyte *et al.*, 2002).

El tratamiento de un suelo por aplicación de corriente directa puede producir cambios en su granulometría, su contenido en materia orgánica y su cantidad de sales solubles. Estos parámetros, a su vez, modifican las posibilidades de la electrobiorremediación. Normalmente, el diseño de la célula electrocinética en los experimentos de laboratorio consiste en un arreglo de los electrodos que permita la inyección del fluido del proceso en el medio poroso, con la evacuación en el otro electrodo, del fluido contaminado (Reddy y Chinthamreddy 1999, Reddy y Parupudi 1997, Sogorka *et al.*, 1998).

La imposición de un gradiente eléctrico entre dos electrodos inertes produce un flujo electroosmótico hacia el cátodo. Algunos autores proponen que introducir directamente los electrodos en el suelo húmedo, produce el efecto más deseable (Reddy y Chinthamreddy, 1999; Sogorka *et al.*, 1998). Otros autores prefieren no introducir directamente los electrodos en el suelo mojado, sino que lo hacen en un electrolito separado por membranas u otros materiales semiporosos que permitan el paso de la corriente (Van Hamme *et al.*, 2003). Durante el proceso de remediación deben utilizarse electrodos inertes a la disolución anódica. Los electrodos más utilizados para los propósitos de investigación incluyen grafito, platino, oro y plata. Sin

embargo, para estudios piloto es más apropiado utilizar electrodos de menor costo, aunque también fiables, como los de acero inoxidable.

La finalidad del presente capítulo es mostrar, mediante diferentes experiencias de laboratorio, lo positivo de la utilización de la electrobiorremediación para aumentar la biodisponibilidad de hidrocarburos, como así también los inconvenientes para su aplicación.

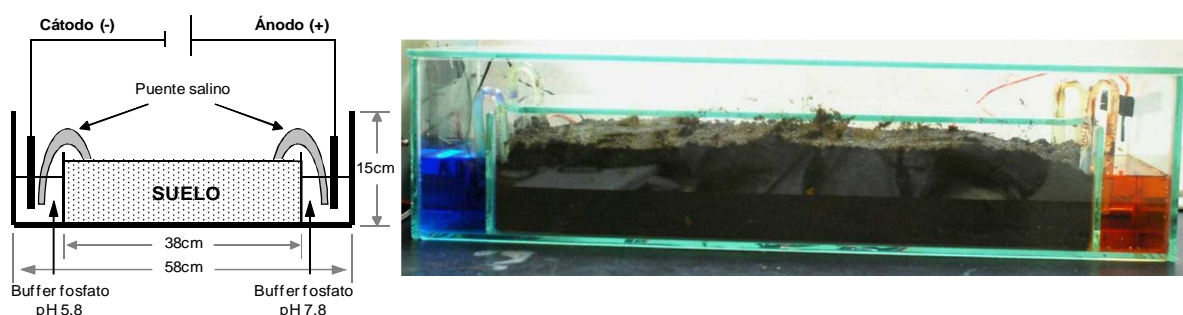
## **Materiales y Métodos**

Se trabajó con muestras de suelo contaminado con residuos de la actividad petrolera, proveniente de un landfarming. Estas se obtuvieron a partir de la toma de 20 submuestras del sitio a una profundidad comprendida entre los 10 y 30 cm, que se mezclaron, tamizaron y redujeron por cuarteos sucesivos. Las muestras se obtuvieron a la profundidad indicada debido a que en esta se encuentra la mayor actividad microbiana (Atlas y Bartha, 2002).

### **Experiencia de electrobiorremediación**

Para los ensayos se utilizaron tres cubas de vidrio de 58 cm de largo, 15 cm de alto y 15 cm de ancho. El interior de estas estuvo dividido por vidrio en tres compartimientos, dos de ellos de 10 cm de largo, 15 cm de alto y 15 cm de ancho, ubicados uno a cada extremo de las cubas en donde se colocaron las soluciones buffer. El tercer compartimiento fue el central, de 38 cm de largo, 15 cm de alto y 15 cm de ancho, donde se colocó el suelo (Fig. 2). La experiencia de electrobiorremediación consistió en la colocación de buffer fosfato de potasio 1 M en los compartimientos de los extremos. El buffer a pH 5,8 se colocó en el compartimiento correspondiente al cátodo y el de pH 7,8 en el correspondiente al ánodo. En estas soluciones fueron sumergidos los electrodos de platino y el paso de corriente a través del suelo se logró por la unión de las soluciones buffer con el suelo, utilizando puentes salinos de buffer fosfato. Para los ensayos se utilizaron 4 kg de suelo fertilizado con nutrientes para corregir su relación C:N:P. La humedad del suelo utilizado fue de 12 a 15 % (Acuña *et al.*, 2010, 2011) y el voltaje aplicado fue de  $0,5 \text{ V.cm}^{-1}$ . Como control se utilizaron dos sistemas sin aplicación de corriente. Uno con iguales características respecto al contenido de nutrientes y humedad (NH) y otro solo con respecto a la humedad (H). Al inicio y al final de la experiencia se realizó un análisis físico, químico, bacteriológico y

aislamiento e identificación de cepas bacterianas. Todos los sistemas fueron incubados a 24 °C durante 120 días.



**Figura 2.** Esquema del sistema utilizado para la experiencia de electrobiorremediación.

### Enumeración de microorganismos

El número de microorganismos fue determinado por la técnica de conteo en placa. Se utilizó una suspensión de 10 g de suelo en 90 mL de solución fisiológica estéril que se agitó 30 minutos a 150 r.p.m. Para bacterias totales se utilizó agar nutritivo (AN) (5 g peptona de carne, 3 g extracto de levadura, 12 g de agar, 1000 mL de agua destilada, pH 7,2); para bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) se utilizó un medio mineral (solución I: cloruro de calcio 0,235 g, nitrato de potasio 0,427 g, sulfato de amonio 5 g, cloruro de magnesio hexahidratado 1 g, bicarbonato de potasio 1,2 g. Solución II: fosfato ácido di sódico dihidratado 0,5 g, fosfato monopotásico 0,5 g. Solución III: EDTA-Na 800 g, cloruro ferroso 300 g, cloruro de calcio hexahidratado 4 g, cloruro de manganeso tetrahidratado 10 g, sulfato cúprico 1 g, permanganato de potasio dihidratado 3 g, cloruro de zinc 2 g, cloruro de litio 0,5 g) al cual se le agregó 30  $\mu$ L de una mezcla de petróleo y gasoil 1:1 por diseminación en superficie que se denominó MM-PGO (Pucci y Pucci, 2003).

### Análisis de hidrocarburos

Determinación de hidrocarburos por Cromatografía Gaseosa (GC). Para determinar la composición de los hidrocarburos presentes en la muestra se mezcló 2 g de la muestra, 1 g  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  y 10 ml de hexano, la cual se filtró para separar la fase sólida y líquida. Seis mililitros del filtrado se evaporó cuidadosamente hasta sequedad, se enfrió y retomó con 50  $\mu$ L de hexano. Para la cuantificación se utilizó un cromatógrafo de gases Varian 3800 GC, con detector FID y una columna capilar VF-5 ms (30 m;

0,25 mm; 0,2523  $\mu\text{m}$ ). La temperatura del inyector fue de 200 °C y la del detector FID 300 °C, se inyectó 1  $\mu\text{L}$ . Los parámetros de corrida de la columna fueron las siguientes: 45 a 100 °C con un aumento de 5 °C/min y una segunda rampa de 100 a 275 °C a 8 °C/min. La temperatura final de 275 °C se mantuvo por 5 minutos.

### **Aislamiento e identificación de cepas bacterianas**

A partir de las placas de MM-PGO utilizadas para conteo de bacterias, se aislaron e identificaron 90 cepas por metil ésteres de ácidos grasos (FAMES) según el método Sherlock MIDI versión 6.0. La extracción de ácidos grasos de membrana se realizó sobre 40 mg de masa celular comenzando con una saponificación con alcohol metílico, hidróxido de sodio y agua (150 mL: 45 g: 150 mL). Posteriormente se realizó una metilación con ácido clorhídrico 6 N y alcohol metílico (325 mL: 275 mL), seguido de una extracción con n-hexano y metil terbutil éter (1:1). Finalmente se realizó un lavado con hidróxido de sodio y agua (10,8 g en 900 mL) de acuerdo a lo propuesto por el sistema de identificación (MIDI Newark, Del., EUA).

Los ácidos grasos obtenidos se determinaron como metil ésteres por cromatografía gaseosa. Para tal fin se utilizó una columna capilar Ultra 2 de 25 m de longitud y 0,2 mm de diámetro. El análisis se llevó a cabo con un cromatógrafo HP 6890 series II GC (inyección splitless, presión inicial 10 psi, programa de temperatura: 170-288 °C a 28 °C.min<sup>-1</sup>, 288-310 °C a 60 °C.min<sup>-1</sup>, 1,5 min de permanencia a 310 °C, detector por ionización de llama). La integración de los picos se efectuó mediante el programa HP 10,01 Chem Station.

Los ácidos grasos fueron identificados utilizando el sistema Sherlock (versión 6.0) con el estándar Agilent "Calibration standards kit for the microbial identification system". La composición en ácidos grasos fue calculada como porcentaje del área de pico (MIDI).

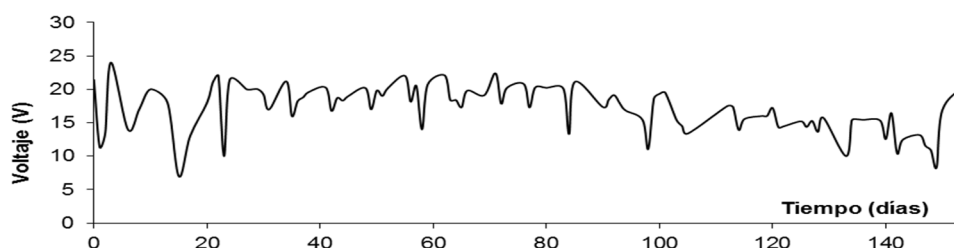
### **Análisis de resultados**

Los valores de hidrocarburos y recuentos bacterianos se analizaron por análisis de la varianza (ANOVA) mediante el programa BIOM (Applied Biostatistics INc 3 Heritage Setauket NY 11711 EUA). Para el estudio de la comunidad bacteriana se realizó un análisis de componentes principales utilizando el programa PAST.

## Resultados

### Campo eléctrico: mantenimiento durante la experiencia e importancia de la humedad

La electroósmosis en un suelo se encuentra en función del grado de saturación, por ello es un factor primordial en la electrobiorremediación (Lindgren *et al.*, 1994). Uno de los mayores inconvenientes en los sistemas insaturados es el mantenimiento de un voltaje, o amperaje, dentro del sistema. Al no estar el sistema saturado, se encontró que como mínimo la humedad del suelo en las celdas debe estar entre 10-15 % (Acuña *et al.*, 2009, 2010). Esto también permite a los microorganismos el desarrollo de su metabolismo por períodos más prolongados (Acuña *et al.*, 2011), y para mantener el voltaje dentro de estas en 0,5V/cm (Vazquez *et al.*, 2004). En una experiencia que duró 150 días (Fig. 3) se observó la variación de voltaje que se registró estuvo entre 0,4 a 1 V/cm (Pucci *et al.*, 2012). La humedad también se incorporó en pequeñas cantidades por los puentes salinos que se deshidrataban con el paso del tiempo, perdiendo aniones y agua.



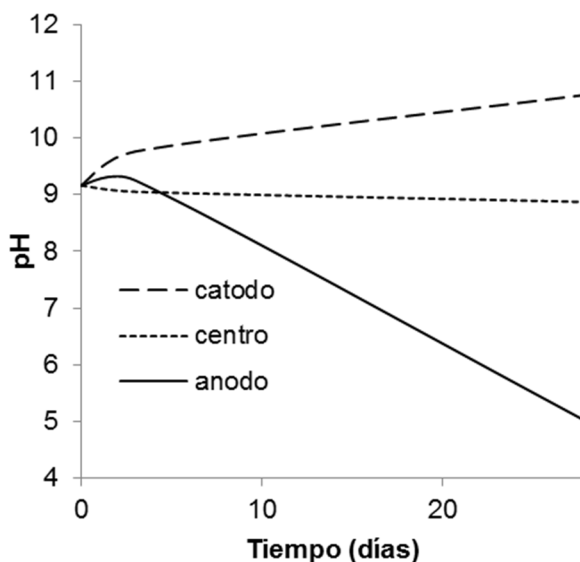
**Figura 3.** Variaciones del voltaje en suelo durante una experiencia de 150 días.

### Mantenimiento de la humedad y del pH

Una de las ventajas de trabajar en sistemas no saturados es que no se producen lixiviados, aunque el mantenimiento de la humedad de las cubas conlleva a un trabajo de seguimiento semanal para mantener el valor de esta entre 12-15 %. La caída de los valores de humedad implica un aumento del voltaje que se debe aplicar a los electrodos para mantener su valor constante en el suelo. Esto lleva a un mayor gasto de energía y menor rendimiento del sistema. La disminución de la humedad del sistema de electrobiorremediación también pudo deberse a factores de calentamiento o al desarrollo de reacciones químicas exotérmicas (Shapiro y Probst, 1993).

Harbottle *et al.*, 2009 concluyeron que la aplicación de un campo eléctrico en suelos

no saturados produce mayores cambios en sus propiedades, produciendo un mayor impacto sobre la actividad microbiana y la biodegradación. Los puentes salinos mantuvieron el pH de suelo en forma aceptable (Fig. 4) durante los primeros 30 días.



**Figura 4.** pH durante 30 días de experimentación.

En los segundos 30 días se observó un aumento de pH en las tres regiones estudiadas en la experiencia de electrobiorremediación. Este aumento pudo estar asociado al ingreso de amonio al suelo, desde el puente salino, en la región del ánodo y su posterior transformación a gas amoníaco por efecto de la corriente aplicada. Sin embargo, este aumento de pH no provocó modificaciones en el número de bacterias degradadoras de petróleo (BDH), como se verá más adelante, responsables de metabolizar el hidrocarburo contaminante. El número de bacterias heterótrofas y de BDH se corresponde con los valores obtenidos para suelos patagónicos estudiados anteriormente por este grupo. El voltaje y las modificaciones de pH no presentaron impacto en los recuentos bacterianos manteniéndose en los valores iniciales y en un valor aceptable para la degradación bacteriana de hidrocarburos (Pucci y Pucci, 2003; Riis *et al.*, 2003). Los cambios de pH de los suelos generan carga en la membrana de las bacterias que, de esta manera, migran hacia uno de los electrodos dependiendo del valor de pH (Suní y Romantshuk 2007). A pH 7 o mayor se genera una carga negativa en la membrana que produce una migración de los microorganismos en dirección al ánodo (Deflaum y Condee 1997), si bien la velocidad en medios acuosos es rápida,  $5 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$ , en suelos es menor, cayendo este valor a 5 cm cada 6 h. Cuando el pH es de 5,5 o menor, se modifica la carga de la membrana, que es positiva, produciéndose un cambio de dirección hacia el cátodo. La complejidad de las cargas



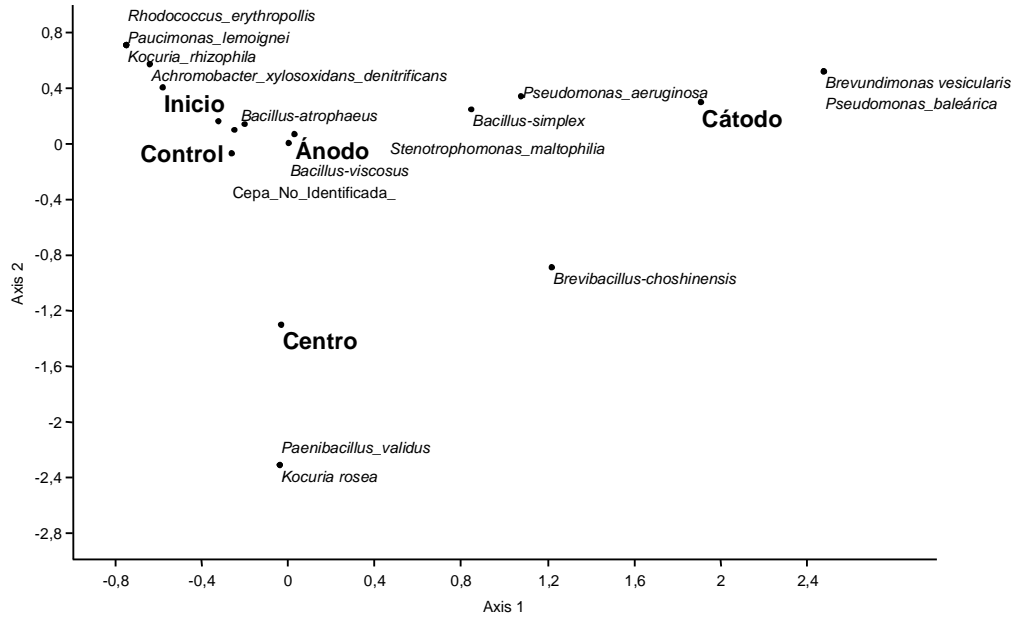
superficiales que poseen las membranas bacterianas hace difícil poder predecir el comportamiento de estas con los parámetros biofísicos (Bayer y Sloyer, 1990). Esto se explica porque la composición de los polímeros de las bacterias contiene grupos carboxílicos, sulfatos, fosfatos o aminos, por lo que posee grupos ácidos y básicos dando una superficie anfotérica que posee carga negativa a pH alto y carga positiva a pH bajo.

### **Temperatura del suelo**

La temperatura del suelo se mantuvo en  $24,3 \pm 1$  °C durante todo el ensayo, observándose una diferencia de 0,4 °C entre la región del ánodo y la del cátodo, con una temperatura ambiental de  $24 \pm 2$  °C y una temperatura en el suelo del control de  $23,2 \pm 1$  °C. Esto indica que los cambios en la humedad en el sistema de EBR se debieron principalmente al flujo electroosmótico, concordando esto con otros autores que trabajaron con un voltaje de 0,3 V/cm (Schmidt *et al.*, 2007).

### **Movilidad de bacterias**

La identificación de las bacterias por Sherlock MIDI analizados por análisis de componentes principales (Fig. 5) mostró que el inicio, control y centro se encuentran más cerca, con identificaciones bacterianas en común. Los microorganismos identificados ya han sido estudiados por su capacidad de degradar hidrocarburos. Los microorganismos encontrados con mayor frecuencia fueron *Achromobacter xylooxidansdenitrificans*, *Bacillus simplex* y *Stenotrophomonasmaltophilia*, microorganismos frecuentes de suelos patagónicos (Acuña *et al.*, 2012).

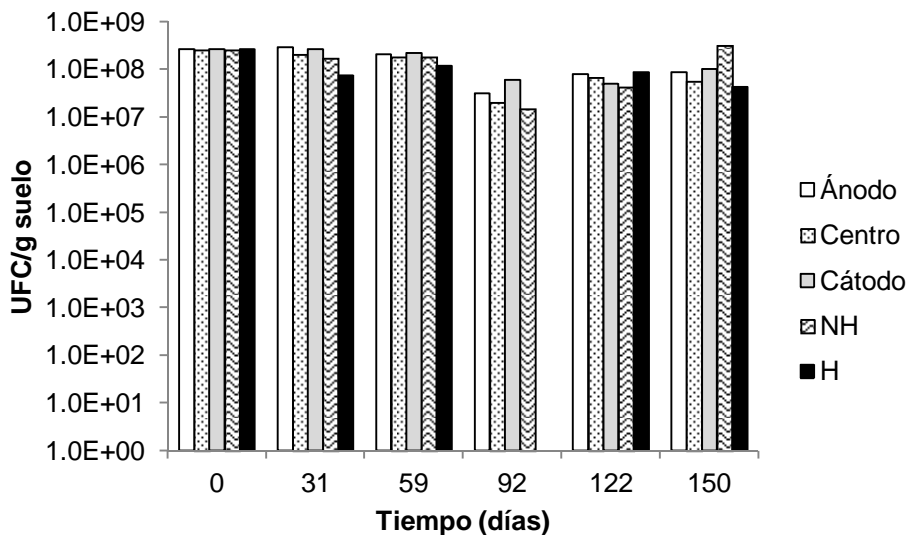


**Figura 5.** Análisis de componentes principales de la distribución de los microorganismos del suelo.

### Recuentos bacterianos

Los valores de voltaje y de pH, que se mantuvieron, no produjeron un impacto en el desarrollo bacteriano. Los valores de pH observados son compatibles con la viabilidad de los microorganismos (Dibble y Batha, 1979), por eso los recuentos bacterianos se mantuvieron durante el tiempo que duró el experimento. Estos valores son los que se encuentran en suelos patagónicos (Peressutti *et al.*, 2003; Pucci *et al.*, 2011; Acuña *et al.*, 2012).

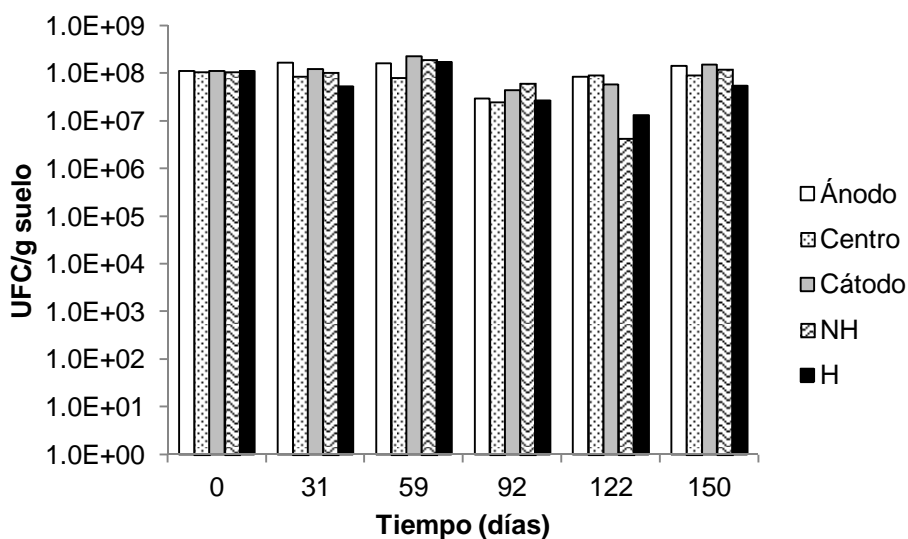
Los valores de los recuentos bacterianos son los que frecuentemente se encuentran en suelos patagónicos contaminados que favorecen la biodegradación de hidrocarburos provenientes de la industria petrolera. El mantenimiento del pH en valores aptos para los microorganismos produjo que los valores de los recuentos bacterianos no presentaran modificaciones, en todos los casos la caída de un logaritmo está dentro del error del método utilizado (Fig. 6 y 7). No se presentó una acumulación de las bacterias en la zona de uno de los electrodos como otros autores mencionan cuando son suelos saturados (Suni y Romantschuk, 2004).



**Figura 6.** Recuentos de bacterias heterótrofas totales en medio AN.

### Biodisponibilidad de hidrocarburos y degradación

La aplicación del campo eléctrico en sistemas saturados acelera la biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos (PAH) como el fenantreno, debido a la movilización de los fluidos asociados a la electroósmosis. La mayor disminución de los hidrocarburos alifáticos se observó en el suelo cercano al ánodo, mientras que la mayor disminución de PAH se observó en la región cercana al cátodo (Tablas 1 y 2).



**Figura 7.** Recuentos de bacterias degradadoras de hidrocarburos en medio MM-PGO.

Los PAH suelen representar un problema en los sistemas de biorremediación. El

campo eléctrico utilizado fue capaz de aumentar la biodisponibilidad de los PAH (Wick *et al.*, 2004) y de esta forma aumentó su biodegradación debido a que se metabolizan por oxidación. La aplicación de corriente directa aumentó de forma significativa estos valores, siendo mayor su efecto en el suelo cercano al cátodo. Las diferencias observadas en los porcentajes de biodegradación de PAH totales en el cátodo, centro y ánodo pueden deberse a que el flujo electroosmótico generado en el suelo no sea uniforme, siendo esto el resultado de que algunas secciones pueden presentar una presión en los poros variables, probablemente como resultado de la naturaleza compleja de los factores que controlan el flujo electroosmótico como ser el potencial zeta y el gradiente eléctrico (Niqui-Arroyo *et al.*, 2006).

Los hidrocarburos adheridos al suelo mostraron una mayor migración a la fase acuosa por la aplicación de corriente de baja intensidad (Marinez-Prado *et al.*, 2014). Esto se condice con los resultados encontrados en donde se observa una mayor degradación de hidrocarburos poliaromáticos.

**Tabla 1.** Análisis de hidrocarburos alifáticos antes y después de la experiencia, el sistema control es el sistema sin diferencia de potencial.

<b>Inicial</b>	<b>Control</b>	<b>Ánodo</b>	<b>Centro</b>	<b>Cátodo</b>
Decano (n-C10) 545	0	0	0	0
Undecano(n-C11) 1507	503	336	0	325
Dodecano (n-C12) 2743	1591	1103	0	1269
Tridecano(n-C13) 4191	2411	2003	2470	2054
Tetradecano(n-C14) 5274	1906	1670	2022	1738
Pentadecano(n-C15) 730	418	454	1456	1229
Hexadecano(n-C16) 1149	1644	826	0	915
Heptadecano(n-C17) 9235	1270	1878	0	887
Octadecano(n-C18) 10414	1754	1293	3127	1391

Nonadecano(n-C19) 21441	2327	2179	4805	2194
Eicosano(n-C20) 21347	2039	1659	0	1768
Pristano 30386	4366	670	5119	3300
Fitano 28570	2680	1592	5334	2382
Heneicosano(n-C21) 13268	1726	3493	2438	1382
Docosano(n-C22) 14613	0	655	2870	632
Tricosano(n-C23) 23642	2338	1567	5980	462
Tetracosano(n-C24) 18737	5284	2714	8537	1106
Pentacosano(n-C25) 13899	1777	1144	2998	729
Hexacosano(n-C26) 14322	523	399	0	0
Heptacosano(n-C27) 9100	1464	0	2068	0
Octacosano(n-C28) 2121	0	0	0	0
Nonacosano(n-C29) 66	1504	0	0	0
Triacotano(n-C30) 5154	1073	0	0	0
Alcanos Totales 252454	38598	25635	49224	23763

---

**Tabla 2.** Análisis de cromatografía gaseosa de los hidrocarburos poliaromáticos de las muestras al inicio y el final de la experiencia, el control es el sistema sin diferencia de potencial.

<b>Inicial</b>	<b>Control</b>	<b>Ánodo</b>	<b>Centro</b>	<b>Cátodo</b>
Naftaleno 1275	596	0	0	0
2-Metilmaftaleno 471	283	0	0	0
Acenaftileno 4279	1441	1519	1184	790
Acenaftaleno 576	663	0	0	0
Fluoreno 12913	598	0	0	0
Fenantreno 15011	1175	883	1053	742
Antraceno 0	1580	1454	2790	727
Fluorantreno 21497	1309	970	2056	484
Pireno 7478	1417	1185	4557	1490
Benzo(a)antraceno 3068	2669	1887	4661	1350
Criseno 30036	668	0	885	0
Benzo(k)fluorantreno 4640	824	0	0	0
Benzo(a)pireno 371	1495	0	0	0
PAH Totales 102142	14718	9035	18227	5583

## Conclusión

Por un lado, la electrocinética es un método que permite el aumento de la degradación de compuestos aromáticos y poliaromáticos. La utilización de puentes salinos resolvió el problema de las modificaciones de pH, manteniendo este en el suelo en valores compatibles con la viabilidad de la comunidad bacteriana presente.

Por otro lado, la aplicación de corriente directa en el suelo produjo movimientos de los géneros bacterianos en los electrodos, aumentando la velocidad de utilización hidrocarburos.

Por los costos que el sistema posee, se recomendaría esta técnica para los suelos patagónicos después de una biodegradación previa por métodos convencionales en la que no se alcancen los niveles fijados por la reglamentación. La optimización de este proceso para la eliminación de los hidrocarburos poliaromáticos y alifáticos pesados *in situ* está sujeta a estudios posteriores.

## Bibliografía

- ACAR, Y.; ALSHAWABKEH, A. 1993. Principles of electrokinetic remediation. Environ. Sci. Technol. 27: 2638-2647.
- ACAR, Y.; GALE, R.; ALSHAWABKEH, A.; MARKS, R.; PUPPALA, S.; BRICKA, M.; PARKER, R. 1995. Electrokinetic remediation: basics and technology status. J. Hazard. Mater. 40: 117-137.
- ACUÑA, A.; PUCCI, O.; PUCCI, G. 2008. Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de la Patagonia Argentina. Ecosistemas. 17: 85-93.
- ACUÑA, A.; PUCCI, O.; PUCCI, G.N. 2011. Biodegradación de hidrocarburos en la meseta patagónica, un resumen de la optimización de los parámetros a tener en cuenta. Rev. Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 115: 36-41.
- ACUÑA, A.J.; PUCCI, O.H.; PUCCI, G.N. 2012. Electrobioremediation of hydrocarbon contaminated soil from Patagonia Argentina. En: New Technologies in the Oil and Gas Industry. J.D. Gomez (Ed.). INTECH. pp. 29-48.
- ACUÑA, A.J.; TONÍN, N.L.; DÍAZ, V.; PUCCI, G.N.; PUCCI, O.H. 2012. Optimización de un sistema de biorremediación de hidrocarburos a escala de laboratorio. Ingeniería, investigación y tecnología. 13: 105-112.
- ACUÑA, A.J.; TONÍN, N.L.; WICK, L.; PUCCI, G.N.; PUCCI, O.H. 2009 Electrobioremediación. Una tecnología en desarrollo para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos. Rev. Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 105: 80-85.
- ACUÑA, A.J.; TONÍN, N.L.; WICK, L.; PUCCI, G.N.; PUCCI, O.H. 2010. Electrobioremediation of an unsaturated soil contaminated with hydrocarbon after landfarming treatment. Portugaliae Electrochimica Acta. 28: 253-263.
- ATLAS, R.; BARTHA, R. 2002. Los microorganismos en sus hábitat naturales: microbiología del aire, del agua y del suelo. Ecología Microbiana, Microbiología Ambiental. pp. 329-380.
- BAYER, M.; SLOYER, J. 1990. The electrophoretic mobility of gram-negative and gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis. J. Gen. Microbiol. 136: 867-874.

- DE LA ROSA-PÉREZ, D.; TEUTLI-LEÓN, M.; RAMÍREZ-ISLAS, M. 2007. Electrorremediación de suelos contaminados, una revisión técnica para su aplicación en campo. *Int. Cont. Amb.* 23: 129-138.
- DEFLAUN, M.; CONDEE, C. 1997. Electrokinetic transport of bacteria. *J. Hazard. Mater.* 55: 263-277.
- DIBBLE, J.; BATHA, B. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 729-739.
- HARBOTTLE, M.; LEAR, G.; SILLS, G.; THOMPSON, P. 2009. Enhanced biodegradation of pentachlorophenol in unsaturated soil using reversed field electrokinetics. *J. Environ. Manag.* 90: 1893-1900.
- KIM, S.; KIM, K. 2001. Monitoring of electrokinetic removal of heavy metals in tailing-soils using sequential extraction analysis. *J. Hazard. Mater.* 85: 195-211.
- LAURSEN, S. 1997. Laboratory investigation of electroosmosis in bentonites and natural clays. *Can. Geotec. J.* 43: 664-671.
- Lindgren, E.; Mattson, E.; Kosak, M. 1994. Electrokinetic remediation of unsaturated soils. *Amer. Chem. Soc. Symp. Ser.* 554: 33-50.
- MAILA, M.; CLOETE, T. 2004. Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: are simplicity and cost-effectiveness the only advantages? *Reviews in Environ. Science & Bio/Technology.* 3: 349-360.
- MARINEZ-PRADO, M.A.; UNZUETA-MEDINA, J.; PÉREZ-LÓPEZ, M.E. 2014. La electrobiorremediación como una técnica híbrida en el tratamiento de suelos contaminado con hidrocarburos totales de petróleo. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 13: 113-127.
- MARTÍNEZ GILBON, A. 2001. Electrorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Tesis de Licenciatura en Química. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, México D.F. p. 47.
- MOLINA DÍAZ, G.; PALESTINA CALIZ, V.; PIEDRAS PÉREZ, J. 2004. Recuperación electrocinética de hidrocarburos sorbidos en suelos contaminados. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, México D.F. p. 85.
- NIQUI-ARROYO, J.; BUENO-MONTES, M.; POSADA-BAQUERO, R.; ORTEGA-CALVO, J. 2006. Electrokinetic enhancement of phenanthrene biodegradation in creosote-polluted clay soil. *Environ. Pol.* 142: 326-332.
- ORTIZ, I.; SANZ, J.; DORADO, M.; VILLAR, S. 2007. Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Universidad de Alcalá del Círculo de Innovación en tecnologías Medioambientales y Energía (CITME), Madrid, p. 108.
- PERESSUTTI, S.R.; ALVAREZ, H.M.; PUCCI, O.H. 2003. Dynamics of hydrocarbon-degrading bacteriogenesis of an experimental oil pollution in Patagonian soil. *Int. Biodet. Biodegrad.* 52: 21-30.
- PUCCI, G.; PUCCI, O. 2003. Biodegradabilidad de componentes de mezclas naturales de hidrocarburos previamente sometidas a landfarming. *Rev. Argent. Microbiol.* 35: 62-68.



- PUCCI, G.N.; ACUÑA, A.J.; PUCCI, O.H. 2011. Biodegradación de hidrocarburos en la meseta patagónica, un resumen de la optimización de los parámetros a tener en cuenta. *Rev. Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. 115: 36-41.
- PUCCI, G.N.; ACUÑA, A.J.; WICK, L.Y.; PUCCI, O.H. 2012. Electrobioremediation of patagonian soil contaminated with hydrocarbons. *Portugaliae Electrochimica Acta*. 30: 361-370.
- PUCCI, O.H. 1998. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Petrotecnica*. 6: 54-59.
- REDDY, K.; CHINTHAMREDDY, S. 1999. Electrokinetic remediation of heavy metal contaminated soils under reducing environments. *Was. Man*. 19: 269-282.
- REDDY, K.; PARUPUDI, U. 1997. Effects of soil composition on the removal of chromium by electrokinetics. *J. Hazard. Mater.* 55: 135-155.
- RIIS, V.; KLEINSTEUBER, S.; BABEL, W.; CAN, J. 2003. Influence of high salinities on the degradation of diesel fuel by bacterial consortia. *Microbiol.* 49: 713-721.
- SCHMIDT, C.; BARBOSA, M.; ALMEIDA, M. 2007. A laboratory feasibility study on electrokinetic injection of nutrients on an organic, tropical, clayey soil. *J. Hazard. Mater.* 143: 655-661.
- SHAPIRO, A.; PROBSTEIN, R. 1993. Removal of contaminants from saturated clay by electroosmosis. *Environ. Sci. Technol.* 27: 283-291.
- SOGORKA, D.; GABERT, H.; SOGORKA, B. 1998. Emerging technologies for soils contaminated with metals: electrokinetic remediation. *Haz. Was.* 30: 673-685.
- SUER, P.; GITTE, K.; ALLARD, B. 2003. Speciation and transport of heavy metals and macroelements during electroremediation. *Environ. Sci. Technol.* 37: 177-181.
- SUNI, S.; ROMANTSCHUK, M. 2004. Mobilisation of bacteria in soils by electroosmosis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49: 51-57.
- VAN HAMME, J.; SINGH, A.; WARD, O. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews*. 67: 503-549.
- VÁZQUEZ, M.V.; HERNÁNDEZ, L.F.; GRANDOSO, D.; ARBELO, C.D. 2004. Study of the electrical resistance of andisols subjected to electro-remediation treatment. *Portugaliae Electrochimica Acta*. 22: 399-410.
- VIRKUTYTE, J.; SILLANPÄÄ, M.; LATOSTENMAA, P. 2002. Electrokinetic soil remediation - Critical overview. *Sci. Tot. Environ.* 289: 97-121.
- WICK, L.; MATTLE, P.; WATTIAU, P.; HARMS, H. 2004. Electrokinetic transport of PAH-degrading bacteria in model aquifer sand soil. *Environ. Sci. Technol.* 38: 4596-4602.
- WICK, L.; SHI, L.; HARMS, H. 2007. Electrobioremediation of hydrophobic organic soil-contaminants: A review of fundamental interactions. *Electrochim. Acta*. 52: 3441-3448.

## CAPÍTULO 8

### La biorremediación aplicada a la rehabilitación de suelos contaminados con hidrocarburos

María Graciela Pozzo Ardizzi

Gerente técnico Geociencia SRL Remigio Bosch 468 8300 Neuquén

e-mail: gpozsoardizzi@gmail.com

#### Biorremediación y tratamientos biológicos

El término inglés “bioremediation” se refiere a los tratamientos basados en sistemas biológicos para la limpieza de sitios contaminados. Técnicamente se utiliza el anglicismo “biorremediación”.

Puede definirse la biorremediación como una tecnología de biorrecuperación de ambientes naturales previamente contaminados con xenobióticos, utilizando la capacidad metabólica de los microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y algas) y algunas plantas, en presencia de oxígeno y nutrientes suministrados para acelerar los procesos de biodegradación natural. En síntesis es un proceso que utiliza organismos y sus aptitudes metabólicas para eliminar o neutralizar los contaminantes del ambiente.

La biorremediación, como método para la descontaminación se basa en la digestión de las sustancias orgánicas por los microorganismos, sustancias que actúan como fuente de carbono necesaria para el crecimiento de sus células y fuente de energía para llevar a cabo las funciones metabólicas que requieren estos organismos para su crecimiento, desarrollo y multiplicación.

Según indica la Norma IRAM 29555-1:2003 para desarrollar una técnica remediadora sobre estos procesos metabólicos se requiere que el medio ofrezca ciertas condiciones fisicoquímicas y biológicas, a saber:

- Se necesita asegurar la existencia de determinadas poblaciones de microorganismos autóctonos con probada capacidad de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono y energía.
- Será necesario que exista en el sistema un determinado número de aceptores de electrones que enzimáticamente oxiden los carbonos constituyentes de los hidrocarburos.

- Verificar condiciones adecuadas de pH, nutrientes, temperatura, humedad, textura y estructura del suelo, y concentración de los contaminantes.

Durante un proceso de biodegradación se produce la transformación parcial o total de los contaminantes orgánicos.

Una transformación parcial genera como producto intermediario o final un compuesto menos tóxico que el parental. Una transformación total o mineralización genera como producto final dióxido de carbono y agua (procesos aerobios) o metano (procesos anaerobios).

En la biorremediación de suelos y aguas contaminados se utilizan técnicas de tratamiento biológico de residuos como es el caso del compostaje o la biooxidación.

El uso de tecnologías de biorremediación presenta varias ventajas respecto a otras técnicas alternativas para eliminar los compuestos contaminantes como son los tratamientos físicos o químicos tradicionales (Basco Pla y Castillo, 2014).

Algunas de estas ventajas son:

- tecnología de fácil aplicación;
- los productos formados son generalmente inocuos o menos tóxicos;
- bajos costos de instalación y operación;
- tratamiento seguro con un mínimo riesgo a la salud y al ambiente;
- tecnológicamente aplicable y efectiva.

Como limitaciones de las técnicas biológicas con respecto a las técnicas fisicoquímicas debemos considerar, los tiempos biológicos, es decir, el tiempo necesario para alcanzar una biodegradación aceptable según las exigencias normativas. También puede ocurrir que durante una biorremediación se produzca una ralentización del proceso degradativo, sea por un enriquecimiento de los componentes más recalcitrantes o por una alteración en la biodisponibilidad de los contaminantes; sin embargo, las técnicas fisicoquímicas, pudiendo ser más rápidas en la disminución de la concentración de contaminantes, disminuyen o eliminan la microbiota autóctona del suelo y modifican sus características fisicoquímicas.

### **Estrategias de biorremediación**

Las estrategias de biorremediación se agrupan en dos tipos:

- intrínseca o atenuación natural, y

- dirigida o asistida.

La biorremediación intrínseca ocurre debido a la capacidad de las poblaciones microbianas autóctonas para desarrollar, de forma natural y simultánea, los procesos de biotransformación total o parcial de los contaminantes. En este caso la participación del hombre es solo para el seguimiento y control del proceso.

La biorremediación dirigida o asistida consiste en mejorar el proceso mediante la bioestimulación o la bioaumentación de las poblaciones microbianas, encausando o acelerando el proceso de biodegradación natural (Viñas y col, 2001; Nápoles, 2005).

En la biorremediación asistida, el hombre estimula el crecimiento, desarrollo y multiplicación de los microorganismos endógenos por la adición de nutrientes ( $\text{NO}_3^-$  o  $\text{PO}_4^{3-}$ ), oxígeno por laboreo o por agregado de peróxidos y agua (Viñas *et al.*, 2001; Núñez, 2003). Esta estrategia se aplica cuando existe población endógena en la zona contaminada con probada capacidad degradativa.

La bioaumentación consiste en inocular microorganismos exógenos o endógenos multiplicados en laboratorio; estos microorganismos degradadores se introducen al sistema para complementar la población endógena existente en el suelo y en un número tal que colaboren en degradar una cantidad significativa del contaminante antes de inactivarse.

### **Biorremediación *in situ*, *ex situ*, *on site***

Según el modo de aplicación de las técnicas, la biorremediación puede ser:

- *in situ*: si se realiza el tratamiento en el lugar donde se encuentra la contaminación.
- *Ex situ*: si se realiza el tratamiento retirando los materiales del sitio contaminado tratándolos en una instalación fuera del lugar donde se encuentra la contaminación.
- *On site*: es una variante del *ex situ*, donde el tratamiento se realiza en una zona lindante a la zona afectada con excavación del suelo.

La biorremediación *in situ* no produce modificación de la estructura física del material para tratar. Es aplicable tanto a suelos como a acuíferos. Tiene como ventaja su menor costo, sin embargo es más complejo el control de la actividad biodegradativa y la gestión del proceso. La biorremediación *ex situ* también se aplica en suelos y agua,

se realiza en sitios acondicionados al efecto o en plantas de tratamiento, donde se facilitan los controles, pero se encarece el proceso.

### Microorganismos biorremediadores

Estos microorganismos, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, poseen la capacidad de utilizar diferentes compuestos tóxicos (xenobióticos) como fuente de carbono, sin embargo su densidad poblacional es limitada en sitios no contaminados y se incrementa en ambientes impactados por un contaminante (Núñez, 2003; Madigan *et al.*, 2004).

Entre los organismos vivos que se utilizan en las tecnologías de biorremediación, las bacterias representan el grupo microbiano más activo por su variedad de géneros y especies y por la versatilidad metabólica que poseen. Las poblaciones mixtas, denominadas consorcios o cohortes microbianas, demuestran mayor acción biodegradativa por sus actividades especializadas y por la acción cooperativa de la población mixta. Los géneros bacterianos degradadores de xenobióticos más comunes tanto en suelos como en aguas son: *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Nocardia* y *Pseudomonas spp.* (Leahy y Colwell, 1990).

En la tabla siguiente se reportan los microorganismos aislados en suelos contaminados con hidrocarburos localizados en la cuenca neuquina, en el noroeste de la provincia de Río Negro (Altamirano y Pozzo Ardizzi, 2000).

Genero	Especie	Origen
<i>Micrococcus</i>	<i>roseus</i>	Suelo contaminado
	<i>sedentarius</i>	Suelo contaminado
	<i>variens</i>	Suelo contaminado
	<i>spp.</i>	Suelo contaminado
<i>Sphingomonas</i>	<i>paucimobilis</i>	Suelo contaminado
<i>Pseudomonas</i>	<i>vescicularis</i>	Rizosfera de gramínea

Las especies identificadas corresponden a tres géneros diferentes: *Micrococcus sp.*, *Sphingomonas sp.* y *Pseudomonas sp.* que son conspicuos en ambientes naturales tanto en suelo como en agua.

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* son bacilos rectos o curvos, gram negativos, no esporulados, cuyo tamaño oscila entre 0,5 y 1 µm de ancho por 1,5 y 4 µm de largo, no poseen vainas ni apéndices. Su metabolismo es respiratorio, nunca fermentativo. Algunas especies son litotróficas pudiendo emplear H<sub>2</sub>, entre

otros, como único dador de electrones. Asimismo pueden emplear el  $\text{NO}_3^-$  como aceptor de electrones en anaerobiosis. La prueba de oxidasa es generalmente positiva y catalasa lo es siempre.

El género *Sphingomonas*, comparado con *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*, presenta mayor especificidad y velocidad de degradación frente a diferentes hidrocarburos aromáticos polinucleares, así como también se ha detectado su capacidad de producir bioemulsificantes.

La cepa aislada de los suelos regionales e identificada como *Sphingomonas paucimobilis*, citada previamente como *Pseudomonas paucimobilis*, ha sido reportada por su capacidad de mineralizar fenantreno, fluorantreno, xileno, tolueno, bifenilos, salicilato y hasta pesticidas como el lindano.

Respecto de *Pseudomonas vesicularis* ha sido aislada a partir de superficies de mármol expuestas al exterior durante años; se demostró asimismo que esta especie es capaz de crecer en concentraciones altas de plomo (hasta 1500 ppm de  $\text{Pb}_3\text{O}_4$ ).

Los microorganismos pertenecientes al género *Micrococcus* poseen células esféricas, que pueden agruparse de a pares, tetradas o en forma irregular. Las colonias son pigmentadas. Son aerobios estrictos, su metabolismo es respiratorio con escasa o nula producción de ácido, y crecen bien en medios simples. La prueba de la catalasa es positiva, la de la oxidasa frecuentemente lo es aunque débilmente. Son relativamente resistentes a un reducido potencial agua, toleran bien la desecación y la presencia de alto contenido en sales (hasta 7,5 %), característica que comparten con el género *Pseudomonas*. Estas características son coincidentes con las del suelo del ambiente patagónico del que han sido aisladas las cepas reportadas (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1994).

El género *Micrococcus* fue previamente aislado a partir de suelos contaminados con petróleo a partir de muestras de suelos provenientes de una refinería y reportado por su capacidad de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (Lebkowska *et al.*, 1995). Así mismo se ha descrito la capacidad de este género de vivir en altas concentraciones de petróleo así como la de degradar otros compuestos orgánicos como malatión y clorpirifos (Bieszkiewics *et al.*, 1998). También se destacan hongos con capacidad hidrocarburilítica pertenecientes a los géneros: *Acrostalagmus*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Fusarium* y *Cephalothecium*. (Pozzo Ardizzi, *et al.*, 1999).

## **Factores que afectan la biodegradación**

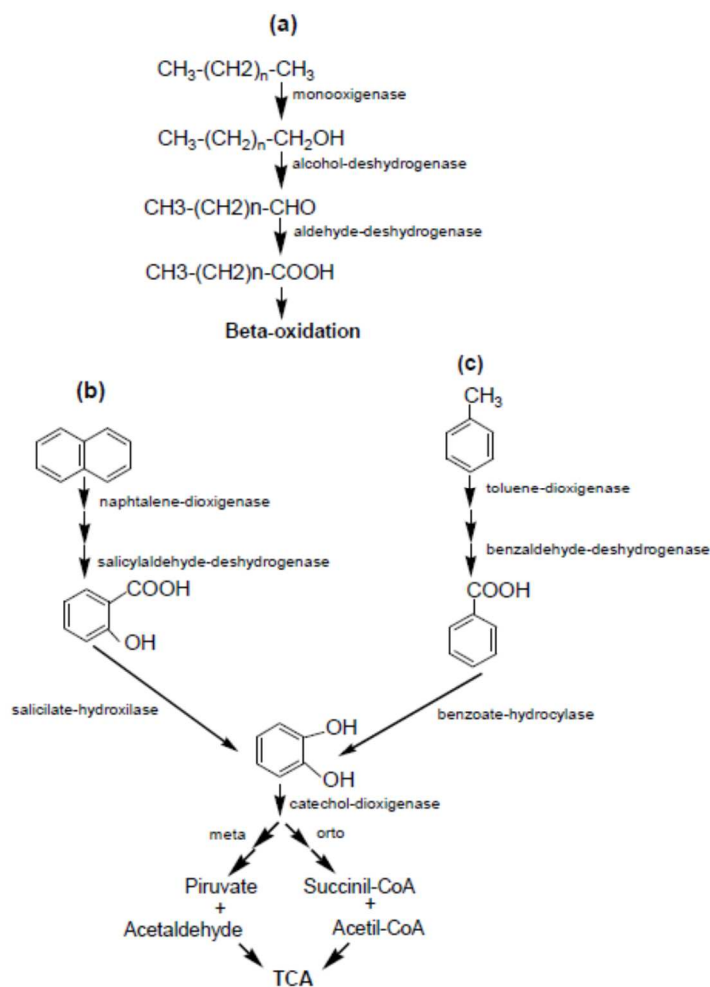
Un sistema de biorremediación eficiente depende de la velocidad de biodegradación de los contaminantes, por ello es necesario considerar los factores bióticos y abióticos que lo afectan.

- Los factores abióticos o fisicoquímicos son aquellos que se relacionan con el contaminante (estructura química, concentración y biodisponibilidad) y con las condiciones medioambientales (pH, humedad, temperatura, disponibilidad de oxígeno y nutrientes).
- Los factores bióticos dependen de los microorganismos (población microbiana y cometabolismo).

## **Estructura química y concentración del contaminante**

La biodegradabilidad de un compuesto orgánico depende de la capacidad de los microorganismos para usarlo como fuente de carbono, si el “sitio de acción o ataque” de la enzima degradativa se encuentra bloqueado (estructuras isoprenoides o moléculas sustituidas con grupos voluminosos -COOH o -CH<sub>3</sub>), la reacción no tendrá lugar, disminuyendo entonces la capacidad biodegradativa (Ercoli *et al.*, 2000).

Los compuestos alifáticos se degradan por sucesivas oxidaciones, pero si la molécula incluye sustituyentes como alcanos de cadena larga, se forman estructuras ramificadas estéricamente inaccesibles a la degradación. Por la misma razón, los compuestos alifáticos insaturados se degradan más lentamente que los saturados. Los compuestos aromáticos o cíclicos se degradan a partir de la ruptura del anillo. La incorporación de halógenos disminuye la degradabilidad por estabilización del anillo aromático (Viñas *et al.*, 2001; Nápoles, 2005). El orden decreciente de biodegradación es, generalmente, n-alcanos > isoprenoides > aromáticos de bajo peso molecular > cicloalcanos > poliaromáticos > moléculas polares (Leahy y Colwell, 1990).

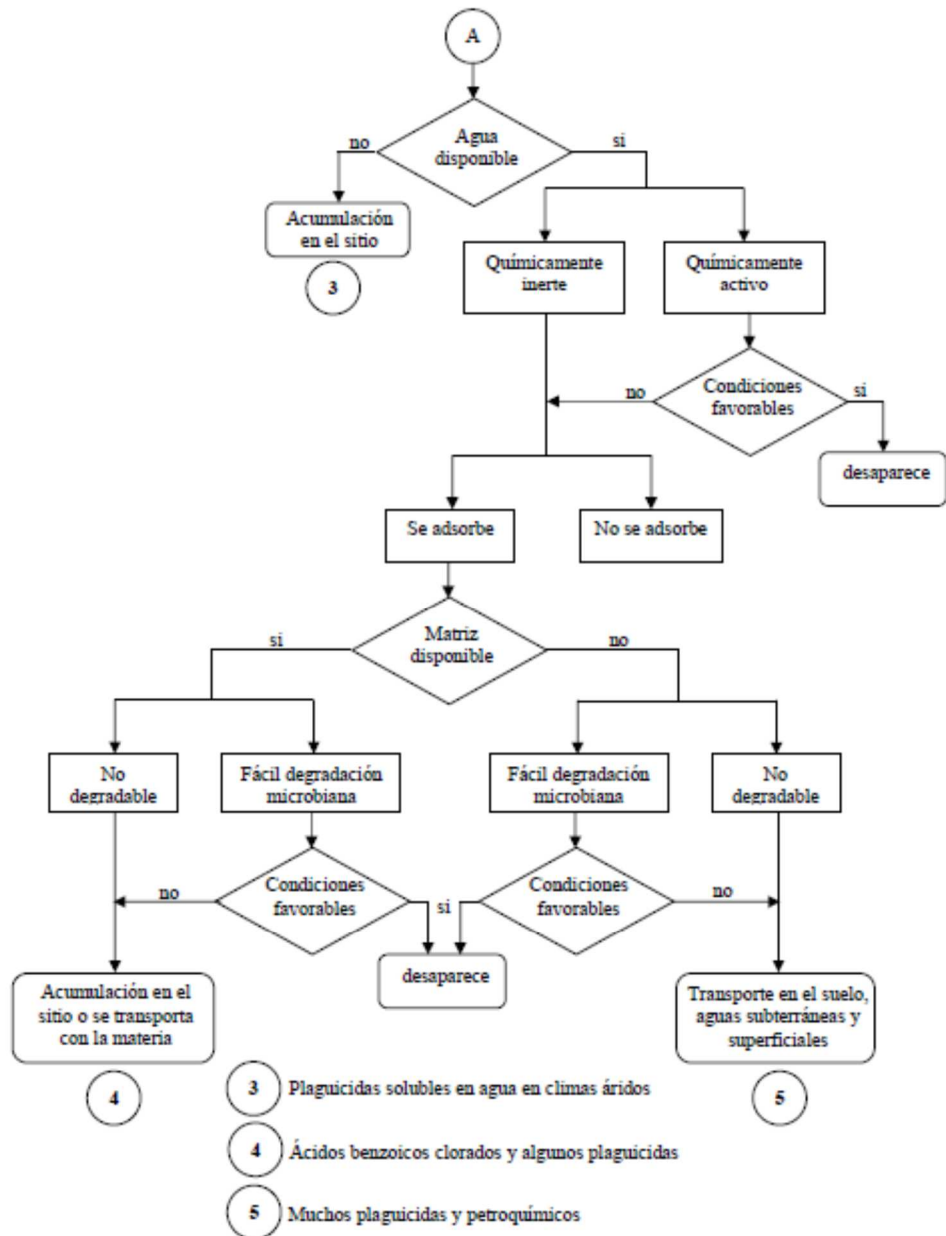


**Figura 1.** Ruta metabólica de degradación de hidrocarburos por *Pseudomonas aeruginosa*.

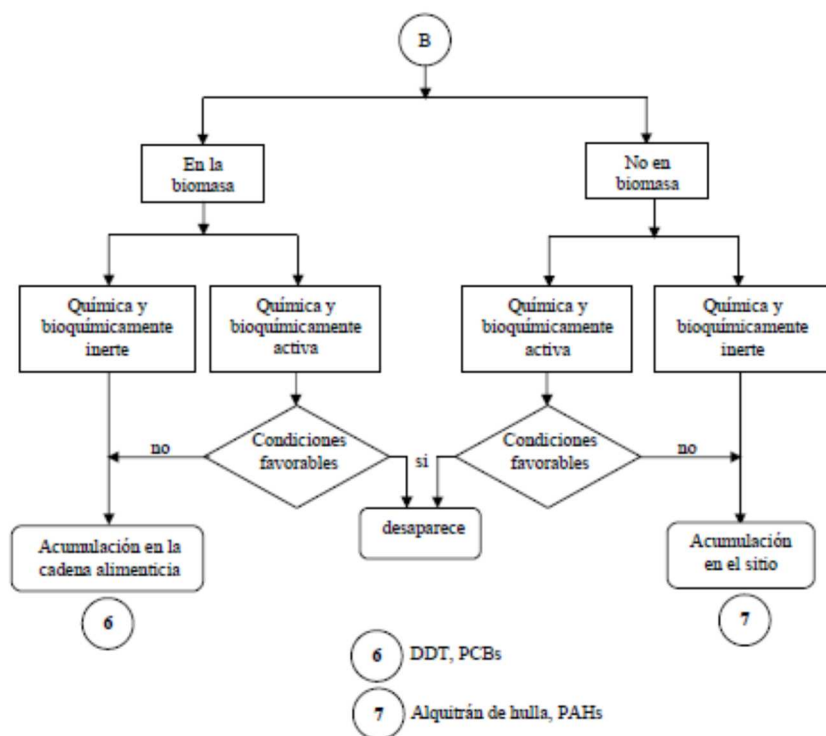
a) n-alcános, b) naftaleno y c) tolueno. Fuente: Nápoles Álvarez, J. y Ábalos Rodríguez, A. 2008.

El último paso en la degradación de n-alcános involucra la betaoxidación y la degradación de aromáticos y poliaromáticos finalizan en ciclo de TCA (ciclo del ácido tricarbóxico o ciclo de Krebs). En ambas rutas el catecol es el intermediario.





**Figura 2.** Ruta o destino de los compuestos xenobióticos presentes en el ambiente. Fuente: Nápoles Álvarez y Ábalos Rodríguez, 2008.



**Figura 3.** Ruta o destino de los compuestos xenobióticos presentes en el ambiente (continuación). Fuente: Nápoles Álvarez, J. y Ábalos Rodríguez, A. 2008.

### Biodisponibilidad

El término biodisponibilidad se refiere al contacto entre el xenobiótico o contaminante y el sistema biológico. Según la ISO / WD 11074: "Biodisponibilidad es el grado en el que un compuesto químico presente en la matriz del suelo puede ser absorbido o metabolizado por humanos o receptores ecológicos o se encuentra disponible para la interacción con sistemas biológicos". (ISO 11074:2005). La biorremediación es un proceso oxidativo enzimático y la biodegradación de diferentes moléculas está condicionada a la disponibilidad del sustrato por parte de la célula microbiana. Una excesiva biodisponibilidad puede inducir toxicidad por alta concentración del contaminante en el medio.

Una estrategia para aumentar la biodisponibilidad de los contaminantes es la utilización de tensoactivos sintéticos (etoxilatos, bencenosulfonatos) y microbianos (ramnolípidos, lipopéptidos y emulsanos). La molécula orgánica penetra al medio intracelular a través de las micelas del tensoactivo (Abalos *et al.*, 2004; Cubitto *et al.*, 2004).

## Condiciones que regulan un biosistema

### Condiciones ambientales: pH, humedad y temperatura

El pH del sistema suelo-contaminante-microorganismos más adecuado corresponde a los comprendidos entre 6 y 8 unidades y el pH neutro es el óptimo. La variación del pH afecta a la actividad microbiana y también la solubilización y adsorción/absorción del contaminante. Las formas catiónicas ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) son más solubles a pH ácido mientras que las formas aniónicas ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ) son más solubles a pH alcalino.

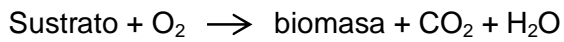
La humedad puede condicionar de forma severa la biodegradación, el exceso de humedad genera procesos anaeróbicos, la escases retarda el proceso por disminución de actividad y muerte de las células microbianas. El nivel óptimo de humedad depende de las propiedades de cada suelo, el tipo de contaminación y si la biodegradación es aerobia o anaerobia. El agua actúa como medio de transporte a través del cual los nutrientes y el oxígeno son movilizados hasta el interior de las células. Es conveniente mantener una humedad alrededor del 60 % de la capacidad de campo.

La temperatura influye en la velocidad de degradación, dependiendo del tipo de microorganismo. Las temperaturas más adecuadas se encuentran entre 15 °C y 45 °C (microorganismos mesófilos) aunque se han descrito algunos trabajos de biorremediación con microorganismos termófilos extremos y psicrófilos (Feitkenhauer *et al.*, 2003).

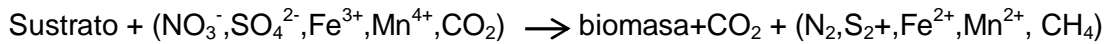
La velocidad de degradación aumenta con la temperatura, por lo que un incremento de esta es útil, pero no debe superar los 40 °C pues ocurre una disminución de la actividad microbiana por desnaturalización enzimática y se produce una selección poblacional hacia especies resistentes a las altas temperaturas (Semple *et al.*, 2001).

### Disponibilidad de oxígeno

La biodegradación ocurre por las reacciones de óxido-reducción de la cadena respiratoria para la obtención de energía. La cadena se inicia con el sustrato orgánico, externo a la célula, que actúa como dador de electrones. Los aceptores de electrones utilizados por los microorganismos son oxígeno, ion nitrato, hierro (III), ion sulfato y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor final de electrones los procesos de biodegradación son de tipo aerobio, no obstante la vía anaerobia puede ocurrir (Madigan *et al.*, 2004).



Si se utiliza otro aceptor diferente del oxígeno los procesos de biodegradación son de tipo anaerobio.



Considerando la vía de degradación aerobia, es común la oxidación a través de enzimas oxigenasas, a intermediarios que se incorporan fácilmente al ciclo de Krebs. La degradación anaerobia de compuestos aromáticos implica la ruptura de los dobles enlaces del núcleo aromático. El proceso ocurre en tres etapas: activación del sustrato; ataque enzimático (mediante reductasas) de los intermediarios activados y conversión de los compuestos no cíclicos (como resultado de la ruptura del anillo) en metabolitos centrales.

Los compuestos aromáticos pueden ser oxidados a  $\text{CO}_2$  por cultivos de bacterias por respiración anaerobia (ejemplo:  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{SO}_4^{2-}$  por *Pseudomonas* o por bacterias fototróficas). En cambio las bacterias metanogénicas degradan los compuestos aromáticos en cultivos mixtos (Leahy y Colwell, 1990; Maier *et al.*, 2000).

### **Concentración de nutrientes**

El metabolismo microbiano requiere de fuentes de macronutrientes: carbono, nitrógeno, fósforo y potasio. El carbono es el elemento más importante por su rol en la nutrición y representa aproximadamente el 50 % de la masa seca de una célula. Los microorganismos son capaces de emplear desde las formas más oxidadas ( $\text{CO}_2$ ) hasta complejos polímeros de alto peso molecular, incluidos compuestos tóxicos. Los organismos autótrofos usan  $\text{CO}_2$  y los organismos heterótrofos emplean compuestos orgánicos como fuente de carbono.

Los compuestos orgánicos suministran el carbono para las estructuras celulares y son la fuente de energía metabólica, así muchos organismos obtienen simultáneamente carbono y energía de la misma sustancia, otros necesitan una fuente de energía adicional a la fuente de carbono.

El nitrógeno interviene en la síntesis de aminoácidos y enzimas; se requiere en grandes cantidades porque constituye alrededor del 10 % de la masa seca de la célula (como parte de proteínas, ácidos nucleicos, polímeros de la pared celular, etc.). La fuente preferida de nitrógeno es el amonio porque entra directamente al metabolismo y por tanto puede ser usado prácticamente por todos los microorganismos.

En la biorremediación de ecosistemas terrestres se ha demostrado que la utilización de la fuente nitrogenada es muy rápida. Los suelos no alcanzan a cubrir todas las necesidades metabólicas y deben ser incorporados fertilizantes agrícolas en forma de urea o sulfato de amonio y nitratos. El fósforo interviene en la formación de compuestos energéticos celulares que se utilizan en los procesos de síntesis y degradación y es suministrado generalmente como fosfato. Las fuentes de fósforo más utilizadas en cultivos de bacterias son  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $NaH_2PO_4$  o mezclas de ellas. La dosificación de nitrógeno y fósforo se realiza en función de la concentración de carbono, en una relación C:N:P 100:10:1 (Viñas *et al.*, 2001; Nápoles, 2005). Sin embargo, el uso excesivo de nutrientes inorgánicos puede inhibir los procesos de biodegradación.

### **Población microbiana**

La población microbiana es el elemento condicionante para que ocurra el proceso de biodegradación. Se requiere la existencia de una población microbiana adaptada al medio, que posea los enzimas necesarios para catalizar las reacciones de degradación.

Los microorganismos pueden degradar los contaminantes en forma de cultivos puros, mixtos o consorcios que generalmente resultan más eficientes que un cultivo puro. En los consorcios se establecen interacciones complejas entre las especies microbianas, por ejemplo, en una mezcla de poblaciones microbianas, los consumidores primarios inician el proceso de degradación y los consumidores secundarios utilizan los productos metabólicos de los primeros para degradarlos, además pueden facilitar el crecimiento de los primarios, suministrándoles productos metabólicos (como factores de crecimiento), eliminando tóxicos mediante cometabolismo. La adaptación o aclimatación de una comunidad microbiana a un contaminante dado, determina la rapidez con la que el compuesto puede ser transformado y mineralizado (Alexander, 1994; LaGrega *et al.*, 2001).

Esta adaptación puede ocurrir por tres mecanismos:

- inducción o depresión de enzimas específicos,
- cambios genéticos que deriven en nuevas capacidades metabólicas, o
- enriquecimiento selectivo de microorganismos capaces de transformar un compuesto de interés.

Este mecanismo es ampliamente utilizado en la obtención de consorcios microbianos degradadores de xenobióticos complejos. El tipo de contaminación influye notablemente en las características de la comunidad microbiana.

El cometabolismo es el proceso a través del cual algunos componentes orgánicos, que los microorganismos no pueden degradar como única fuente de carbono, son transformados en presencia de otro sustrato (co-sustrato) natural adicional, por ejemplo azúcares. En hábitats naturales puede suceder la co-utilización simultánea por bacterias aerobias heterótrofas de muchos sustratos diversos (Bordons y Constantin, 1999; LaGrega *et al.*, 2001).

El tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos requiere una concentración mínima de microorganismos hidrocarburofílicos de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/g suelo y de microorganismos heterótrofos totales de  $10^5$  a  $10^6$  UFC/g de suelo. Si esta masa crítica no fuera suficiente se pueden incorporar microorganismos al suelo mediante inoculación o bioaumentación. También se puede lograr un incremento importante estimulando la población microbiana existente por incorporación de nutrientes (Solanas, 2002).

## **Métodos de biorremediación aplicables a la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos**

### **Sistemas de biorremediación de suelos**

La rehabilitación de suelos contaminados con petróleo y el tratamiento de los diversos residuos que produce la actividad petrolera, aplicando el tratamiento de biorremediación por estimulación asistida de la actividad hidrocarburofílica de los microorganismos nativos, ha demostrado ser un método ecológicamente sustentable que minimiza el compromiso ambiental que originan otros métodos de restauración y tratamiento.

Los ambientes contaminados por derrames o volcado de efluentes con hidrocarburos y el tratamiento de residuos de la actividad industrial en general y de la petrolera en particular reportan presencia de concentraciones variables de grasas y aceites, gasolinas, kerosene y naftas de aviación, diésel y fueloil, residuos de fondos de tanques y de piletas API, derrames de crudo (livianos y pesados), mezclas de hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAPs), BTEX y compuestos inorgánicos con aptitud para la biodegradabilidad.

La Agencia de protección ambiental de EE. UU. (USEPA) define la biorremediación como la manipulación de sistemas biológicos para efectuar cambios en el ambiente.

Como ya hemos descripto, las transformaciones bioquímicas de compuestos químicos orgánicos por actividad metabólica de microorganismos son procesos naturales que ocurren en el ambiente. En un medio con suficiente disponibilidad de oxígeno, fósforo, nitrógeno y minerales, los sustratos orgánicos contaminantes del medio son quienes actúan como fuente de carbono para el crecimiento y multiplicación microbiana y son bioconvertidos en productos de oxidación que deberían finalmente transformarse en bióxido de carbono y agua. Entre las diferentes tecnologías desarrolladas, aquellas que se basan en biotratamientos, ya sea para remediar y rehabilitar o bien para tratar residuos de producción reciente, son reportadas por la Agencia como métodos de alta eficiencia, bajos costos relativos y mínima agresividad para el ambiente (USEPA, 2012).

En Argentina, nuestra Ley 24.051 Residuos Peligrosos y su Decreto eglamentario 831/93 indica: “La generación, manipulación, transporte, tratamiento y disposición final de residuos peligrosos, quedarán sujetos a las disposiciones de la presente Ley”. Indica en su artículo 2.º: “Será considerado peligroso, a los efectos de esta ley, todo residuo que pueda causar daño, directa o indirectamente, a seres vivos o contaminar el suelo, el agua, la atmósfera o el ambiente en general”.

La biorremediación de suelos contaminados ya sea *in situ* o *ex situ* puede realizarse por varios métodos, en particular nos ocuparemos del método de laboreo en suelos, biolabranza o “landfarming” y del tratamiento en pilas o “biopilas”.

La Ley Nacional 24.051 Residuos Peligrosos y algunas leyes provinciales de tratamiento de residuos establecen una caracterización de los residuos industriales considerados como especiales y peligrosos y fijan normas y pautas para sus tecnologías de tratamiento. En el Anexo I Categorías sometidas a control, los materiales residuales de la actividad petrolera se encuadrarían como “Y9 Mezclas y emulsiones de desecho de aceite y agua o hidrocarburos y agua”. Además del perfil mineral del suelo extraído junto con los contaminantes podría contener alguno o varios de los constituyentes de desechos indicados en la lista de Y19 a Y45.

En el Anexo II de la Ley de Residuos Peligrosos, respecto a la lista de características peligrosas pueden encuadrarse en el N.º de código H12 y H13. Finalmente, del Anexo II de la ley, podemos concluir que un biotratamiento por la metodología de “landfarming” se adecua a “las operaciones que no pueden conducir a la recuperación, reciclado, regeneración o reutilización total o parcial del residuo”. Por cuanto el tratamiento en tierra por bioxidación enzimática con microorganismos autóctonos

representa una operación de eliminación que se encuadra en los términos de la Ley 24.051 Anexo II-A-D2.

Los productos de petróleo más ligeros (volátiles, por ejemplo, gasolina) tienden a ser eliminados por evaporación durante los procesos de aireación (es decir, inyección de aire, extracción de aire o volteo de pila o laboreo agrícola) y, en menor medida son biodegradados por respiración microbiana.

Los productos de hidrocarburos de fracción media (por ejemplo, combustible diésel, kerosene) contienen porcentajes más bajos de volátiles; la biodegradación de estos productos de petróleo es más significativa que la evaporación.

Los productos de petróleo de fracciones más pesadas (por ejemplo aceites lubricantes) no evaporan durante aireación por lo que en estos casos, la biodegradación es el mecanismo dominante que descompone estos productos de petróleo. Sin embargo, los componentes de petróleo de peso molecular más altos requieren un largo período de tiempo para degradarse.

### **Landfarming**

La biorremediación de suelos por landfarming, que en algunos casos puede ser asistida con bioaumentación, es un proceso que básicamente implica incrementar drásticamente la masa microbiana del suelo mediante la adición de nutrientes o de microorganismos procedentes de cultivos obtenidos mediante la multiplicación en biorreactores de los microorganismos autóctonos. Los microorganismos se obtienen del suelo contaminado del lugar, en laboratorio se seleccionan los consorcios microbianos más adecuados según la tolerancia a sustancias inhibidoras, a la salinidad y a su capacidad de degradación de hidrocarburos.

Para el caso particular de los suelos acopiados en los yacimientos hidrocarbúferos, se ha aplicado, con éxito, el tratamiento de biorremediación por estimulación asistida de la actividad hidrocarburofítica de los microorganismos nativos por la metodología de landfarming. Para la aplicación de biotratamientos en suelos contaminados con hidrocarburos se requieren las siguientes estrategias de operación y manejo:

- Elección de un sitio que asegure:
  - Protección de los agentes climáticos adversos (viento, temperaturas y lluvias).
  - Aislamiento de los acuíferos y aguas superficiales.
  - Facilidad de tratamiento y disposición final en ese lugar.
  - Accesibilidad para laboreo con equipos agrícolas.



Repoblamiento vegetal al final del biotratamiento.

- Selección y multiplicación de microorganismos autóctonos para su posterior utilización en bioaumentaciones.

Considerando estos requerimientos se recomienda la utilización de locaciones de pozos abandonados, canteras agotadas, o sitios previamente alterados o degradados, cumpliendo así un doble propósito: biorremediar los suelos y restaurar el sitio.

El proceso complementario de bioaumentación implica incrementar drásticamente la masa microbiana del suelo mediante la adición de microorganismos, generalmente presentes en el suelo, obtenidos mediante selección y cultivo en biorreactores. Los microorganismos se obtienen del suelo contaminado, en laboratorio se seleccionan los consorcios microbianos más adecuados según la tolerancia a sustancias inhibidoras, a la salinidad y a su capacidad de degradación de hidrocarburos.

## **Biopilas**

Las biopilas, también conocidas como bioceldas o pilas de compostaje, se utilizan para reducir las concentraciones de los contaminantes de petróleo en suelos excavados aplicando el método de biodegradación. Esta tecnología implica acondicionar suelos contaminados en pilas (o "celdas") y estimular las actividades microbianas aeróbicas propias de los suelos a través de la aireación o la adición de enmiendas, nutrientes y humedad.

Las biopilas se forman a partir de pilas, preferentemente no mayor de 2 metros de altura, de material biodegradable, formadas por suelo contaminado y sustratos orgánicos en condiciones favorables para el desarrollo de los procesos de biodegradación de los contaminantes. Estas pilas pueden ser aireadas de forma activa (biopilas dinámicas), volteando la pila, o de forma pasiva (biopilas estáticas), mediante tubos perforados de aireación. Se estimula la actividad microbiana por adición de nutrientes y humedad.

Las biopilas se diferencian del compostaje en que la cantidad de sustratos orgánicos añadidos a la pila es menor que en la pila de compostaje ya que el objetivo no es obtener compost, sino acelerar la degradación de contaminantes. La materia orgánica en la biopila (compost, estiércol, virutas de madera, etc.) mejora la estructura del suelo y favorece el proceso de biodegradación al actuar como co-sustrato.

Las biopilas son similares a landfarms ya que ambas metodologías se realizan sobre el terreno, utilizan sistemas de aireación para mejorar el aprovechamiento del oxígeno para estimular el crecimiento y la reproducción de bacterias aeróbicas que, a su vez,

degradan los componentes de petróleo. Mientras que un landfarming se airea por laboreo agrícola, las biopilas reciben aireación por inyección/extracción a través de tuberías perforadas a lo largo de la pila o simplemente por volteo con máquinas adecuadas.

El sistema de biopilas alargadas es más económico y sencillo. En estas, el material se apila en camellones alargados y la aireación se realiza mediante el mezclado manual o mecánico, proceso que a su vez permite homogeneizar la temperatura. El mezclado de la pila proporciona una mayor distribución y facilita la biodegradación de los contaminantes porque facilita la homogenización de los nutrientes, agua, aire, contaminantes y microorganismos.

Las biopilas estáticas no necesitan mezclarse mecánicamente ya que la aireación y la homogeneización del calor se lleva a cabo por medio de un sistema de inyección (compresor) o extracción (vacío) de aire mediante tubos colocados en la base alineados paralelamente a lo largo de la pila.

Tanto biopilas como landfarms han demostrado ser probadamente eficaces para reducir las concentraciones de casi todos los componentes de los productos de petróleo que se encuentran normalmente en los sitios contaminados por las actividades del *downstream*.

Un plan de acciones correctivas que proponga el uso de la biorremediación (landfarming o biopilas) como método para subsanar suelos contaminados con petróleo debe considerar la aplicabilidad del método evaluando los tres pasos que se indican a continuación.

Paso 1. Evaluación de la efectividad. Permite identificar el suelo, el contaminante, y los factores climáticos que contribuirán a la eficacia del biotratamiento y compararlos con parámetros de operación aceptables.

Paso 2. Evaluación del diseño del sistema. Permitirá determinar si se ha definido correctamente los parámetros de diseño, si se han especificado los parámetros de diseño y si el diseño de construcción es compatible con las prácticas estándar.

Paso 3. Evaluación de la operación y plan de monitoreos. Acciones que son esenciales para evaluar la eficacia de los biotratamientos. Estos controles permitirán monitorear la puesta en marcha y la operación del sistema a largo plazo y determinar si los planes de control son suficientes.

## Evaluación de la eficacia de los biotratamientos

La eficacia de un sistema de biorremediación depende de los parámetros que se agrupan en tres categorías, características del suelo, características de los contaminantes y condiciones climáticas, y se muestran en la tabla siguiente:

Parámetros de control para evaluar la eficiencia de un biotratamiento		
Características del suelo	Características de los contaminantes	Condiciones climáticas
<ul style="list-style-type: none"><li>• Densidad de la población microbiana</li><li>• pH del suelo</li><li>• Contenido de humedad</li><li>• Temperatura del suelo</li><li>• Concentración de nutrientes</li><li>• Textura del suelo</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Volatilidad</li><li>• Estructura química</li><li>• Concentración</li><li>• Toxicidad</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Temperatura ambiente</li><li>• Precipitaciones</li><li>• Vientos</li><li>• Humedad relativa</li></ul>

Operativamente, se deben identificar los parámetros que se apartan de los intervalos eficaces que se proporcionan y se debe comprobar que el diseño del sistema y las especificaciones de funcionamiento propuestas compensen cualquier condición de sitio no adecuada.

## Características del suelo

### Densidad de la población microbiana

El suelo normalmente contiene gran número de microorganismos diversos incluyendo bacterias, algas, hongos, protozoos y actinomicetos. En suelos bien drenados, que son más adecuados para los biotratamientos, estos organismos son generalmente aeróbicos. Los suelos agrícolas poseen una importante población autóctona de microorganismos, sin embargo, suelen realizarse aplicaciones de microorganismos cultivados (bioaugmentación) o enmiendas orgánicas como estiércol animal, viruta de madera, material vegetal chipeado, etc. La incorporación de estiércol sirve para aumentar la población microbiana y proporcionar nutrientes adicionales.

Los microorganismos requieren nutrientes inorgánicos como nitrógeno y fósforo para promover el crecimiento celular y mantener los procesos de biodegradación; estos nutrientes pueden estar disponibles en cantidades suficientes en los suelos, pero

generalmente se deben agregar como fertilizantes agrícolas para mantener las poblaciones bacterianas. El proceso metabólico utilizado por los microorganismos para producir energía requiere un aceptor terminal de electrones (ATE) para oxidar enzimáticamente la fuente de carbono a dióxido de carbono.

Los microorganismos se clasifican según la fuente de carbono y la fuente de ATE que utilizan para llevar a cabo sus procesos metabólicos. Los microorganismos que utilizan compuestos orgánicos como su fuente de carbono (por ejemplo, los componentes de petróleo y otros compuestos orgánicos naturales) son denominados heterótrofos; aquellos que usan compuestos de carbono inorgánico (por ejemplo, dióxido de carbono) son autótrofos. Las bacterias que utilizan oxígeno como su ATE son aeróbicas; aquellas que usan un compuesto distinto del oxígeno, (por ejemplo, nitrato, sulfato) son anaerobias; y aquellas que pueden utilizar ambos, el oxígeno y otros compuestos como ATE son facultativas. Para biodegradar productos del petróleo solo los microorganismos que son aeróbicos (o facultativos) y heterótrofos son importantes en el proceso de degradación.

Con el fin de evaluar la presencia y actividad de una población microbiana autóctona para una degradación de los contaminantes de petróleo, se deben realizar análisis de laboratorio en muestras de suelo del sitio, que, como mínimo, deben incluir recuentos en placa de bacterias heterótrofas totales (unidades formadoras de colonias (UFCs) por gramo de suelo seco al aire). Las densidades de población microbiana de suelos en un rango típico van del orden de  $10^4$  a  $10^7$  UFC/gramo de suelo.

Para que el sistema suelo-contaminante-microorganismos sea eficaz el recuento de heterótrofos mínimo deberán ser  $10^3$  UFC/gramo o superior. Un recuento en placa inferior a  $10^3$  podría indicar la presencia de concentraciones tóxicas de materia orgánica o inorgánica. En estos casos, el suelo debe ser acondicionado para reducir las concentraciones de sustancias tóxicas y aumentar la densidad de población microbiana. Si la densidad poblacional es baja e insuficiente, la población puede incrementarse agregando microorganismos comerciales o cultivados ad hoc (bioaumentación).

La tabla siguiente ilustra la relación entre el recuento microbiano y la efectividad del tratamiento biológico (IRAM 29555-1:2003).

Recuento de microorganismos heterótrofos totales y efectividad de un biotratamiento	
Microorganismos Heterótrofos Totales	Efectividad
>1000 UFC/g suelo seco	Generalmente efectivo.
<1000 UFC/g suelo seco	Puede ser efectivo, pero necesita profundizar las pruebas de toxicidad para verificar condiciones tóxicas.

### pH del suelo

La tabla siguiente resume el efecto del pH del suelo sobre la efectividad del biotratamiento. El pH del suelo debe estar dentro del rango de 6 a 8, con un valor óptimo de aproximadamente 7 (neutral) para estimular el crecimiento bacteriano. Suelos con valores de pH fuera de este rango deben corregirse antes de la operación. Puede considerarse la adición de cal para elevar el pH o añadir azufre elemental para bajarlo. También se pueden inyectar soluciones líquidas durante la operación de riego para ajustar el pH.

pH del suelo y efectividad de un biotratamiento	
pH del suelo (anterior a la construcción de la celda o biopila)	Efectividad
6 < pH < 8	Generalmente efectivo.
6 < pH > 8	Requiere agregado de correctores de pH para alcanzar el rango efectivo.

Si el pH del suelo es inferior a 6 o superior a 8, debe asegurarse de que los ajustes de pH, y que el plan de operaciones incluya monitoreo y corrección del pH.

### Contenido de humedad

Los microorganismos del suelo requieren condiciones de suelo húmedo para su crecimiento y desarrollo. Una humedad excesiva restringe la circulación de aire a través del subsuelo y con ello reduce la disponibilidad de oxígeno, que es esencial para procesos metabólicos bacterianos aeróbicos. En general, los suelos deben estar húmedos, pero no mojados. El rango ideal para la humedad del suelo es de entre el 40 y el 80 % de la capacidad de retención de agua (capacidad de campo) del suelo o alrededor del 12 a 30 % en peso.

Periódicamente, debe agregarse agua porque los suelos pierden humedad por evaporación debido a las operaciones de aireación. El diseño constructivo debe incluir drenajes especiales en las celdas de landfarming o cobertura de las biopilas.

Humedad del suelo y efectividad de un biotratamiento	
Contenido de humedad del suelo	Efectividad
40 % > capacidad de campo < 85 %	Efectivo.
Capacidad de campo < 40 %	Requiere riego para mantener óptimo crecimiento microbiano.
Capacidad de campo > 85 %	El diseño constructivo debe incluir drenajes especiales o cobertura de la biopila.

### Temperatura de suelo

La tasa de crecimiento microbiano es función de la temperatura. La actividad microbiana del suelo se reduce significativamente a temperaturas por debajo de los 10 °C. La actividad microbiana de la mayoría de los microorganismos responsables de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo disminuye a temperaturas superiores a 45 °C.

La temperatura del suelo varía con la temperatura ambiente, por eso en determinados períodos del año disminuye la tasa de crecimiento microbiano y, por tanto, disminuirá la degradación del contaminante. Cuando la temperatura ambiente retorna al rango de crecimiento, se restaura gradualmente la actividad microbiana.

En climas fríos, las temperaturas de operación óptimas suelen darse por períodos de 7 a 9 meses. En regiones cálidas, la temperatura óptima para la operación de la biopila puede durar todo el año.

La tabla siguiente muestra cómo la temperatura del suelo afecta a la operación de un biosistema.

Temperatura del suelo y efectividad de un biotratamiento	
Temperatura del suelo	Efectividad
10 °C < temperatura del suelo < 45 °C	Efectivo.
10 °C < temperatura del suelo > 45 °C	Generalmente inefectiva, la actividad microbiana decrece cuando la temperatura ambiente se hace extrema. El diseño constructivo debe incluir sistemas de calentamiento o enfriamiento o bioaumentación con bacterias activas a temperaturas extremas.

### Concentración de nutrientes

Los microorganismos requieren nutrientes inorgánicos que pueden estar disponibles en cantidades suficientes en los suelos del sitio, pero frecuentemente se deben agregar a los suelos del biosistema; sin embargo, cantidades excesivas de ciertos nutrientes (fosfato y sulfato) pueden reprimir el metabolismo microbiano.

La proporción de carbono: nitrógeno: fósforo, típica y necesaria para una efectiva biodegradación, guarda las relaciones: 100:10:1 a 100:1:0.5 dependiendo de los componentes específicos y de los microorganismos involucrados en el proceso de biodegradación.

El contenido de nitrógeno y fósforo disponible propio del suelo se determina por análisis químicos de muestras de suelo impactado y responde a técnicas analíticas de análisis agrícolas para determinar la fertilidad del suelo. Estas concentraciones se deben comparar con los requerimientos de nitrógeno y fósforo calculados a partir de las concentraciones recomendadas para el proceso de biodegradación.

Una concentración conservadora del nitrógeno y fósforo requeridos para la óptima degradación de los productos de petróleo puede calcularse suponiendo que la masa total de hidrocarburos en el suelo representa la masa de carbono disponible para biodegradación. Esta simplificación es válida porque el contenido de carbono de los hidrocarburos de petróleo comúnmente encontrados en sitios contaminados es de aproximadamente el 90 % en peso de carbono. Si se deben realizar adiciones de nitrógeno, deben hacerse en forma dosificada porque la cantidad y el tipo de nitrógeno agregados pueden disminuir el pH del suelo.

## **Textura**

La textura de suelo afecta a la permeabilidad, al contenido de humedad y a la densidad del suelo, en consecuencia, condiciona a la distribución de oxígeno, a la disponibilidad de nutrientes y al contenido de humedad.

## **Biotratabilidad**

Los estudios de tratabilidad permiten descartar que la toxicidad del contaminante o las condiciones del suelo natural impidan la actividad biológica.

Los estudios de biotratabilidad se llevan a cabo en laboratorio y deben planificarse para que los parámetros evaluados sirvan para diseñar e implementar el sistema constructivo y operativo de la celda de landfarming o de la biopila. Si estos estudios no demuestran aptitud, se necesitarán estudios piloto antes de realizar el tratamiento en gran escala. Si, el suelo, los contaminantes y las características climáticas corresponden al rango de efectividad para el biosistema y los estudios de biotratabilidad confirman la aplicabilidad del método se procede a diseñar el sistema a gran escala.

Estos estudios deben proporcionar datos sobre:

- Biodegradabilidad de contaminantes.
- Capacidad de los microorganismos indígenas para degradar los contaminantes.
- Condiciones de crecimiento óptimo.
- Tasas de biodegradación y
- Requerimiento de nutrientes naturales y minerales.

La caracterización de las propiedades físicas y químicas de los suelos para tratarse por biorremediación constituyen la línea de base o datos iniciales.

La tabla siguiente reporta análisis físicos y químicos a realizar sobre muestras de suelo del sitio para estudios de biotratabilidad.



Parámetros físicos y químicos para estudios de biotratabilidad	
Parámetro	Propiedades que mide
Toxicidad del suelo	Tipo y concentración del o los contaminantes, metales pesados presentes, pH.
Textura del suelo	Granulometría, contenido de arcillas, contenido de humedad, porosidad, permeabilidad, densidad aparente.
Nutrientes	Nitratos, fosfatos, aniones y cationes.
Biodegradabilidad del contaminante	Concentración de C orgánico total (COT), volatilidad, estructura química.

Los resultados analíticos permiten determinar calidad y concentración de contaminantes en los suelos; evaluar la concentración inicial de los contaminantes presentes en las muestras iniciales, para que pueda evaluarse evolución de la concentración; determinar si los macronutrientes (nitrógeno y fósforo) están presentes en concentraciones requeridas para sustentar los niveles incrementales de actividad microbiana y finalmente, evaluar parámetros que pueden promover o inhibir el crecimiento microbiano.

La degradación, simulada en un mesocosmo (escala de laboratorio), se mide por la reducción de la concentración de contaminantes y los cambios en la población microbiana y otros parámetros de seguimiento en función del tiempo. Una evaluación del biotratamiento puede incluir los siguientes tipos de estudios:

- Control de actividad microbiana: mide la velocidad a la que los microorganismos existentes pueden degradar a los contaminantes en condiciones aerobias sin la adición de nutrientes suplementarios.
- Ajuste de nutrientes: permiten calcular la proporción óptima C:N:P para alcanzar velocidades de degradación máximas en ensayos preparados con diferentes concentraciones de nutrientes.
- Necesidad de inoculación o bioaumentación: los ensayos se inoculan con consorcios o bacterias biodegradadoras y se analiza para determinar si efectivamente aumentan la tasa de degradación.
- Ensayos de control (blancos): permiten medir la velocidad de degradación debido solo a procesos fisicoquímicos del suelo (abióticos). Permiten comparar con los otros ensayos que se basan en los procesos biológicos.

Luego de haber comprobado, en escala experimental, que el biotratamiento será potencialmente eficaz, se procede a diseñar el sistema para aplicar.

### **Diseño y plan operativo**

La norma IRAM (29594) sobre tratamiento de suelos contaminados con productos y residuos de la industria hidrocarburífica está dividida en 2 partes; la primera es sobre tratamiento biológico del suelo (landfarming) y la segunda parte es sobre el tratamiento biológico en pilas (biopilas). Esta norma proporciona una guía para la aplicación de tratamientos biológicos en suelo para reducir el contenido de hidrocarburos y otros contaminantes orgánicos asimilables y brinda las condiciones adecuadas para corregir y prevenir impactos ambientales, incidentes y enfermedades profesionales derivadas de la actividad. Estas normas orientan sobre los requisitos de diseño para conducir estas operaciones de remediación, a saber:

**Requisitos de espacio.** Una celda de landfarming generalmente no debe superar los 40 cm de altura, o sea la profundidad de trabajo de las herramientas de laboreo, rastras o cinceles. La superficie necesaria puede determinarse dividiendo la cantidad de suelo para ser tratado por la altura de la celda. Si se trata de biopilas, la altura típica varía entre 1 y 3 metros, según la herramienta de volteo que se utilice. Alrededor de la biopila será necesaria un área de terreno adicional para el acceso y tareas de acondicionamiento y volteo; la longitud y ancho de una biopila generalmente se establece por el método de aireación que se aplique, volteando manualmente los suelos, con máquinas viales o con hileradoras especiales para este fin. En general, las biopilas no deberían exceder de 2 a 3 m de ancho.

**Diseño de las celdas o biopilas.** Las celdas se diseñan en función del área disponible para realizar la operación, respetando prioritariamente la altura. Generalmente está determinado por la superficie de terreno disponible. El sistema puede incluir una o varias celdas o biopilas.

**Sistemas de control de escurrimientos.** Son necesarios para evitar la saturación de la zona de tratamiento o el lavado de los suelos; debe controlarse el ingreso de escorrentías, construyendo muros de tierra o zanjas de guarda para desviar el flujo de agua. El egreso de aguas de escorrentía se puede controlar por desviación dentro de la zona de tratamiento a una pileta de captación.

**Control de dispersión y voladuras.** Se construyen las celdas y las biopilas con pendientes adecuadas en sus lados; y se riega periódicamente para minimizar voladuras de suelo contaminado. Las biopilas pueden taparse.

Ajuste de pH, riego y suministro de nutrientes. Se aplican abonos sólidos, calcáreo o cal, en los suelos previo a la construcción de la celda o biopila, y durante el proceso se aplican nutrientes líquidos, agua y soluciones por riego (fertirrigación). La composición de nutrientes y soluciones o sólidos para control de pH se establecen a partir de los estudios de biotratabilidad y la frecuencia de su aplicación se modifica durante la operación según sea necesario a consecuencia de los monitoreos programados.

Seguridad del sitio. Se recomienda cercar el sitio de tratamiento.

#### Tareas y operación de una celda

- Una vez conformada la celda efectuar tareas de laboreo del material para homogeneizar, particular y airear.
- Realizar el muestreo inicial pretratamiento.
- Determinar mediante análisis fisicoquímicos los parámetros de pretratamiento. Elaborar un informe inicial del estado de la celda.
- Desarrollar cultivos de consorcios microbianos autóctonos para la inoculación de microorganismos (bioaumentación).
- Realizar sucesivos laboreos del suelo con herramientas agrícolas. La frecuencia recomendada es mensual.
- Efectuar muestreos y análisis fisicoquímicos trimestrales. Elaborar informes de avance.
- Verificar de finalización del proceso de landfarming por cumplimiento de los objetivos de remediación, realizar análisis finales del material e informe final del tratamiento.
- Solicitar la licencia ambiental de cierre de remediación.
- Proceder a la disposición final del material biorremediado (si corresponde) y proceder a la restauración del sitio.

#### Tareas y operación de una biopila

- Una vez conformada las biopilas, efectuar tareas sobre el material para homogeneizar, particular y airear.
- Realizar el muestreo inicial pretratamiento.
- Determinar mediante análisis fisicoquímicos los parámetros de pretratamiento. Elaborar un informe inicial del estado de la cancha o playa de biopilas.
- Desarrollar cultivos de consorcios microbianos autóctonos para la inoculación de microorganismos (bioaumentación).
- Realizar la adición de nutrientes e inoculación de microorganismos (bioaumentación).

- Efectuar volteos frecuentes de las biopilas, con maquinaria ad hoc. La frecuencia recomendada es semanal.
- Realizar muestreos y análisis fisicoquímicos bimestrales. Elaborar informes de avance.
- Verificar la finalización del proceso de biopilas por cumplimiento de los objetivos de remediación, realizar los análisis finales del material y confeccionar el informe final del tratamiento.
- Solicitar la licencia ambiental de cierre de remediación.
- Proceder a la disposición final del material biorremediado y restaurar el sitio.

## **Experiencias de biorremediaciones asistidas por bioaumentación**

En los suelos de un área hidrocarburífica de la cuenca neuquina sometidos a biorremediación se realizaron diversos aislamientos de microorganismos con probada actividad biodegradadora de hidrocarburos.

Durante los diferentes trabajos de biorremediación realizados para una operadora regional se aislaron e identificaron hongos, algas y bacterias nativas de los suelos contaminados existentes en el área.

Se identificaron seis especies bacterianas: *Pseudomonas paucimobilis*, *Sphingomonas vesicularis*, *Micrococcus sp.*, *M. sedentarius*, *M. varians* y *M. roseus*. Dichas especies fueron aisladas a partir de muestras de suelo provenientes de un sitio que había sido destinado durante años a la disposición de agua de producción proveniente de la industria hidrocarburífera y luego fue sometido a rehabilitación por biotratamiento por landfarming (Altamirano y Pozzo Ardizzi, 2000). En suelos con petróleo, acopiados por largo tiempo en los repositorios de suelos contaminados, se aislaron y caracterizaron hongos de los géneros *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Mortierella sp.*, *Mucor sp.* y *Rhodotorula sp.* En todos los cultivos aislados, se verificó una activa biodegradación de petróleo; de los mismos suelos se aislaron y caracterizaron algas azul verdes del género *Botryococcus sp.* (Pozzo Ardizzi *et al.*, 1999).

Los géneros mencionados son pobladores frecuentes de suelos y aguas sin contaminar. No obstante ello, han sido reportados por su capacidad de degradar hidrocarburos así como también fueron aislados, como en este caso, de sitios contaminados con diferentes compuestos orgánicos presentes en los residuos de petróleo. Con los microorganismos autóctonos extraídos de los suelos y residuos empetroados del yacimiento se conformó un bioinoculante específico para los suelos

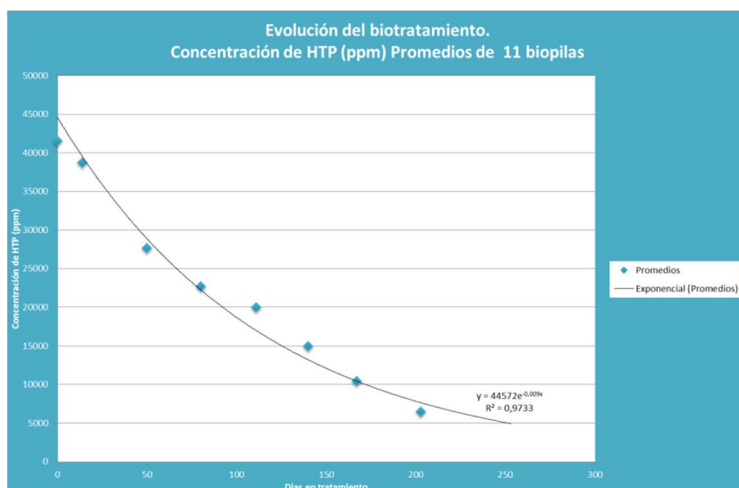
de ese yacimiento. Este inóculo constituye un consorcio microbiano para el cual la empresa remediadora ha desarrollado un medio de cultivo que ha permitido que se multiplique en escala de hasta 10.000 l. Con este cultivo de microorganismos endógenos se bioaumentan las celdas de landfarming y las biopilas.

Basándose en datos bibliográficos y en la experiencia práctica se estima conveniente comenzar el bioproceso por landfarming con un contenido de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) promedio en la celda que no supere valores de 15 a 18 %.

En el caso de biopilas, los antecedentes existentes conjuntamente con la experiencia práctica indican conveniente iniciar el proceso con una concentración de HTP inferior a 10-12 %. Contenidos de hidrocarburos mayores a estas concentraciones, requerirían mayor tiempo de tratamiento.

Tanto en procesos por landfarming como por biopilas se fija como punto final de biotratamiento un valor de HTP < 1 %. (10.000 ppm), objetivo establecido por las Autoridades de Aplicación Provinciales.

Una operación de biorremediación debe considerarse terminada cuando la curva de declinación HTP vs. tiempo se hace asintótica respecto al tiempo. Experimentalmente, para un landfarm esta situación se alcanza en un rango de concentración de HTP < 2 %, a partir de este punto debe continuarse con fitorremediación y atenuación natural. En el caso del tratamiento por biopilas, la operación se considerará finalizada una vez que el contenido de HTP arroje valores inferiores a 1 % (10.000 ppm).



El punto final de todo tratamiento de sitios y materiales contaminados debería acordarse previa realización de un Eco R.B.C.A. (ASTM 2205-3), Acciones Correctivas Basadas en Riesgo para protección de los recursos ecológicos.

También pueden adoptarse los criterios recomendados por Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME), a saber:

El suelo en biotratamiento debe someterse al siguiente análisis:

- Hidrocarburos Totales de Petróleo (GRO + DRO) (EPA 8015).
- Fracción C6-C10 (GC-Capilar FID).
- Fracción C10-C16 (GC-Capilar FID).
- Fracción C16-C34 GC-Capilar FID).
- Fracción > C34 (GC-Capilar FID).

En la tabla siguiente se reportan los valores expresados en mg/kg de niveles de riesgo (Tier 1) para suelos superficiales establecidos por CWS. Estos valores se han determinado según pruebas ecotoxicológicas basadas en riesgo por fitotoxicidad.

<b>Criterios de aceptación para suelos remediados</b>					
<b>Uso del suelo</b>	<b>Textura del suelo</b>	<b>Fracción 1 C6-C10 (mg/kg)</b>	<b>Fracción 2 C10-C16 (mg/kg)</b>	<b>Fracción 3 C16-C34 (mg/kg)</b>	<b>Fracción 4 C34-C50 (mg/kg)</b>
Agrícola	Gruesa	130	450	400	2800
	Fina	260	900	800	5600
Residencial	Gruesa	30	150	400	2800
	Fina	260	900	800	5600
Comercial	Gruesa	310	160	1700	3300
	Fina	660	1500	2500	6600
Industrial	Gruesa	310	760	1700	3300
	Fina	660	1500	2500	6600

Las experiencias realizadas utilizando microorganismos autóctonos de los suelos regionales para la degradación de hidrocarburos de petróleos en suelos se presentan a continuación.

Los resultados alcanzados en el ecosistema norpatagónico, provincias de Río Negro y Neuquén, permiten recomendar la biorremediación como una herramienta efectiva para abordar la degradación de hidrocarburos en suelos.

## Tratamiento de suelos contaminados con HC por landfarming

### Biotratamiento *ex situ* de suelos contaminados acopiados en repositorios



Construcción de celdas



Laboreo inicial

Tratamiento por biorremediación por landfarming, asistida con bioaumentación de 13.500 m<sup>3</sup> de suelos contaminados.

Tratamiento en celdas de 900 a 12.00 m<sup>3</sup>, dentro de recinto de acopio y recintos vecinos.

Contenido de HTP inicial promedio 90.000 ppm.  
Contenido de HTP final promedio al cierre de la remediación de cada lote < 10.000 ppm.

Tratamiento seguido por atenuación natural en sitio de disposición final.

Duración del tratamiento 10 a 14 meses por lote, según concentración promedio inicial.



Suelos biorremediados

### Biotratamiento *in situ* de suelos contaminados en antiguas lagunas de evacuación de efluentes



Antigua laguna de evacuación de efluentes

Tratamiento por biorremediación asistida en 35 ha de suelos contaminados, ocupados por antiguas lagunas de evacuación de efluentes de la actividad hidrocarburífera.

Contenido de HTP inicial promedio 140.000 ppm.  
Contenido de HTP final promedio al cierre de la remediación 20.000 a 15.000 ppm.

Tratamiento seguido por fitorremediación y atenuación natural.

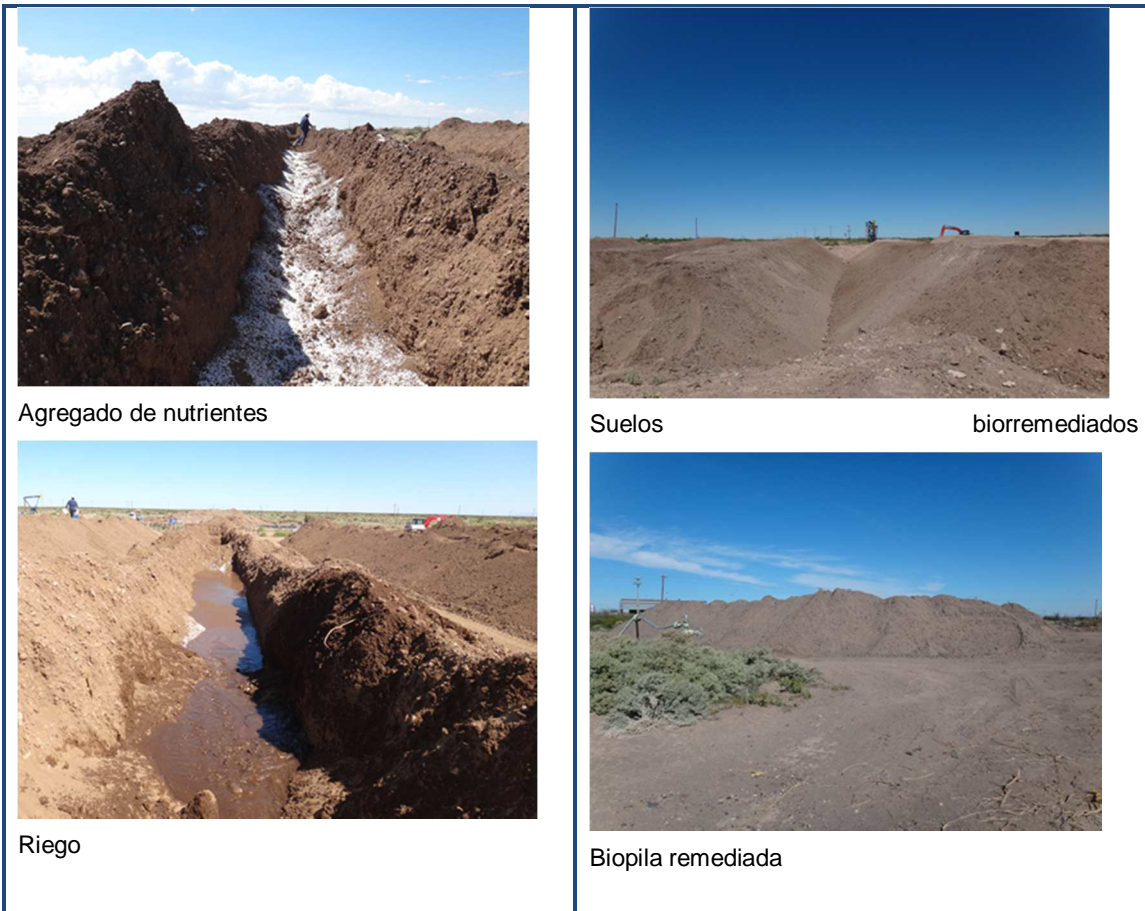
 <p>Suelos en tratamiento por landfarming</p>	<p>Duración del tratamiento por landfarming, 28 meses. Replanteo vegetal 7 años.</p>  <p>Sitio biorremediado en restauración</p>
--	--

**Tratamiento de suelos contaminados con HC por biopilas**

**Biotratamiento *ex situ* de suelos contaminados acopiados en repositorios**

 <p>Construcción de biopilas</p>	<p>Tratamiento por biorremediación en biopilas, asistida con bioaumentación de 23.000 m<sup>3</sup> de suelos contaminados.</p> <p>Tratamiento en biopilas de 700 a 1200 m<sup>3</sup>, dentro de recinto de tratamientos.</p> <p>Contenido de HTP inicial promedio 50.000 ppm. Contenido de HTP final promedio al cierre de la remediación de cada lote &lt; 10.000 ppm.</p>
 <p>Volteo periódico</p>	<p>Tratamiento seguido por atenuación natural en sitio de disposición final.</p> <p>Duración del tratamiento 6 a 12 meses por pila, según concentración promedio inicial.</p>  <p>Bioaumentación con cultivos autóctonos</p>





## Bibliografía

- ABALOS, A.; VIÑAS, M.; SABATÉ, M.A.; MANRESA, A.; SOLANAS, A.M. 2004. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium on presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation* 15: 249-260.
- ALEXANDER, M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, San Diego.
- ALTAMIRANO, M.G.; POZZO ARDIZZI, M.G. 2000. Aislamiento e identificación de bacterias provenientes de un suelo sometido a biorremediación. Instituto Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional del Comahue.
- ASTM 2205 3. Acciones Correctivas Basadas en Riesgo para protección de los recursos ecológicos. ECO R.B.C.A.
- ATLAS, R.; BARTHA, R. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Education, SA. Madrid.
- BERGEY, D.H.; HOLT, J. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.
- BLASCO PLA, R.; CASTILLO RODRÍGUEZ, F. 2014. Acerca de la biotecnología ambiental. *Arbor*, 190 (768): a157. Doi: <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4011>
- BIESZKIEWICS, E.; HOROCH, M.; BOSZCZYK MALESZAK, H.; MYCIELSKI, R. 1998. An attempt to use selected strains of bacteria adapted to high concentrations of petroleum oil to increase the

effective removal of petroleum products in excess activated sludge in laboratory conditions. *Acta Microbiol. Pol.* 47 (3): 305-12.

BOUWER, E.J. 1992. Bioremediation of organic contaminants in the subsurface. En: Bouwer, E.J. (ed.). *Environmental Microbiology*, Wiley-Liss.

BORDONS, A.; CONSTANTIN, M. 1999. *Introducción a la biotecnología ambiental*. ED Universitat Rovira Virgill. Tarragona. España. p. 111.

CANADA-WIDE STANDARDS for PETROLEUM HYDROCARBONS (PHC) IN SOIL. Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME). Rev. 2008.

CUBITTO, M.; MORÁN, A.; COMMENDATORE, M.; CHIARELLO, M.; BALDINI, M.; SIÑERIZ, F. 2004. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil – polluted soils. *Biodegradation* 15: 281-287.

EGGEN, T. 1999. Bioremediation of recalcitrant aromatic organic pollutants with white rot fungi. Tesis Doctoral. Agricultural University of Norway.

ERCOLI, E.; GÁLVEZ, J.; MEDAURA, M.C.; DI PAOLA, M.; CANTERO, J.; VIDELA, S.; TETTAMANTI, G.; VARDARO, G. 2000. Análisis del comportamiento microbiano en procesos de degradación de hidrocarburos en suelo. *Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Cuyo*. N.º 42.

ERCOLI, G.; GÁLVEZ, J.; DI PAOLA, P.; CANTERO, J.; VIDELA, S.; MEDAURA, M.; BAUZÁ J. 2002. Análisis y evaluación de parámetros críticos en la biodegradación de hidrocarburos en suelo. Apuntes. Estudio realizado en laboratorio de Bioprocesos, Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.

Environmental Protection Agency 2001. *Guía del Ciudadano para la oxidación química*. Norma número 542-F-01-013S

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1996. *Innovative Treatment Technologies: Annual Status Report*. Norma número 542-R-95-008.

FEITKENHAUER, H; MULLER, R.; MARKL, H. 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60–70 C by *Thermus* and *Bacillus* spp. *Biodegradation* 14:367–372.

IRAM 29555-1:2003. *Tratamiento biológico en el suelo (“Landfarming”)*. Parte 1: Directivas para estudios de tratabilidad.

IRAM 29594-1:2010. *Tratamiento de suelos contaminados con productos y residuos de la industria hidrocarburífera*. Parte 1: Tratamiento biológico del suelo (Landfarming).

IRAM 29594-2:2016. *Tratamiento de suelos contaminados con productos y residuos de la industria hidrocarburífera*. Parte 2: Tratamiento biológico en pilas (biopilas).

ISO 11074:2005 defines terms used in the field of soil quality.

JORGENSEN, K.; PUUSTINEN, J.; SOURTTI, A. 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil by composting in biopiles. *Environ. Pol.* 107:245 – 254.

KONING, M.; HUPE, K.; LÜTH, J.C.; COHRS, I.; QUANDT, C.; STEGMANN, R. 1998. Comparative investigations into the biological degradation of contaminants in fixed- bed and slurry reactors. En: Telford, T. (ed.). *Contaminated soil*. London. pp. 531-538.

- LAGREGA, M.D.; BUCKINGHAM, P.L.; EVANS, J.C. 2001. Environmental Resources Management. Hazardous waste management. Mc Graw-Hill. pp. 7-23.
- LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews. 54, pp. 305-315.
- LEBKOWSKA, M.; KARWOWSKA, E.; MIASKIEWICZ, E. 1995. Isolation and identification of bacteria from petroleum derivatives contaminated soil. Acta Microbiol. Pol. 44 (3-4):297-303.
- LEY 24.051 DE RESIDUOS PELIGROSOS Y SU DECRETO REGLAMENTARIO 831/93.
- MADIGAN, M.T.; MARTINCO, J.M.; PATKER, J. 2004. Brock, biología de los microorganismos. Octava edición revisada. Prentice Hall Iberia. Madrid, España.
- MAIER, R.; PEPPER, I.; GERBA, C. 2000. Environmental Microbiology. Orlando, Florida, Academic Press.
- NÁPOLES, J. 2005. Ensayos de tratabilidad en suelos contaminados con petróleo. Tesis en opción al título de Máster en Biotecnología. Mención Ambiental. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba.
- NÁPOLES ÁLVAREZ, J.; ÁBALOS RODRÍGUEZ, A. 2008. Biorremediación de ecosistemas impregnados con xenobióticos. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba. (Disponible: <http://monografias.uo.edu.cu/index.php/monografias/article/view/4/6> verificado). Visitado el 15 de agosto de 2016.
- NÚÑEZ, R. 2003. Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos. Tesis Doctoral. Universidad de La Habana.
- OLIVERA, N.; COMMENDATORE, M.; MORÁN, A. ESTEVEZ, I. 2000. Biosurfactant enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge waste. J. Industrial Microbiology and Biotechnology. 25:70-73.
- POZZO ARDIZZI, M.C.; ROIG, M.B.; POZZO ARDIZZI, M.G. 1999. Actividad hidrocarburofítica de hongos aislados de suelos contaminados con hidrocarburos. Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Editada en Buenos Aires vol 47, pp.37-41.
- SÁNCHEZ, A.; POZZO ARDIZZI, M.G. 2002. Bacterias indígenas pobladoras de suelos contaminados con plomo. Aislamiento e identificación. Ingeniería Sanitaria y Ambiental Vol. 60. pp. 42-46.
- SEMPLE, K.T.; REID, B.J.; FEMOR, T.R. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soil contaminated with organic pollutants. Environmental pollution 112:269-283.
- SOLANAS, A.M. 2002. Biodegradación y biorremediación: aspectos básicos aplicados a la transformación microbiana de contaminantes orgánicos. Apuntes del curso de postgrado. Universidad de Barcelona. España.
- USEPA. 2012. Guía del ciudadano sobre la biorremediación.
- VIÑAS, M.; SABATÉ, J.; GRIFOLL, M. SOLANAS, A.M. 2001. Ensayos de tratabilidad en la recuperación de suelos contaminados por la tecnología de la biorremediación. Residuos. Revista técnica. 59:78-82.
- VIÑAS, M. 2005. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Facultad de biología. Universidad de Barcelona.

## CAPÍTULO 9

### Biorremediación de suelos contaminados con petróleo

Rodolfo Mendoza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Museo Argentino de Ciencias Naturales, MACN-CONICET. Av. Ángel Gallardo 470, C1405DJR Ciudad de Buenos Aires. Argentina.

E-mail: rmendoza@macn.gov.ar

#### Introducción

La contaminación de suelos afecta la calidad de este desde el punto de vista productivo y su interacción con el medioambiente. La magnitud del efecto económico y social que genera la contaminación de un suelo depende al menos de dos factores: la calidad del suelo previa a la contaminación y el tipo de contaminación a la que el suelo ha sido sometido. Calidad de suelo se podría definir como "la capacidad de un suelo para permanecer activo dentro de límites naturales o de manejo del ecosistema, de manera tal que permita sostener la productividad, preservar la calidad del aire y del agua con los que interacciona, y a la vez mantener el ambiente en condiciones que permita una adecuada calidad de vida del ser humano" (Soil Science Society of America, 1995). En cuanto al tipo de contaminación, esta puede ser muy amplia en cantidad y calidad, tanto para elementos orgánicos e inorgánicos. Para el caso de los contaminantes orgánicos e inorgánicos sería necesario definir el riesgo potencial de cada contaminante en particular asociado a los factores que definen la calidad del suelo de acuerdo a su utilidad. En este sentido, en nuestro país existe la Ley 24051 Residuos Peligrosos que definen valores guía para múltiples contaminantes a los efectos de definir calidad de suelo para uso agrícola, residencial e industrial. Sin embargo, esos valores guía se sustentan principalmente en estimaciones de riesgo basadas en la concentración total del contaminante en el suelo (Sims *et al.*, 1997), y no se consideran los factores y procesos que afectan la biodisponibilidad del contaminante, ni los cambios que esa biodisponibilidad pueda tener en el tiempo y en el espacio en función de las características físicas, químicas y biológicas del suelo contaminado y del medioambiente con el que interacciona. En relación con las definiciones anteriores un suelo contaminado con un sentido más agronómico podría ser aquel que como consecuencia del tipo de contaminación recibida ha perdido todo o en parte su capacidad de proteger el funcionamiento del ecosistema por falta de

preservación del agua y el aire en niveles adecuados para el crecimiento vegetal, evitar la dispersión del contaminante por disminución de su capacidad amortiguadora y preservar la salud humana. (Mazzarino *et al.*, 1998). La contaminación de suelos es por lo tanto una actividad dinámica en el tiempo y en el espacio que, además de los contaminantes involucrados, depende de las características edafoclimáticas del lugar y de las prácticas de manejo que se apliquen a la zona contaminada para su remediación.

La contaminación de suelos con hidrocarburos (HC) provenientes de la industria petrolera no es un tema exclusivo de la Argentina, sino que por el contrario en mayor o menor medida, de todos los países del mundo. Aún en aquellos que no producen petróleo sufren problemas de contaminación debido a que también existe contaminación de suelos con HC por actividades de transporte, accidentes, depósitos desmantelados, refinerías, estaciones de servicio, bases militares desmanteladas, etc. Obviamente, la explotación de petróleo y gas es la actividad que posee el mayor riesgo potencial de contaminación de los suelos con HC, pero a la vez tiene como principal objetivo, en higiene y seguridad, evitar cualquier efecto negativo sobre el medioambiente. Sin embargo y tal como ocurre en cualquier actividad industrial se generan residuos, que en el caso de la industria petrolera son el resultado de fugas o descargas accidentales de petróleo, fondos de tanques de almacenamiento y recortes de perforación que impactan sobre los suelos como producto de las operaciones de perforación, explotación, transporte, refinado y comercialización. En el caso de la contaminación de suelos con HC, además de la toxicidad propia del HC, esta puede afectar el crecimiento vegetal por disminución de la presión de oxígeno, aumento de la presión de HC gaseosos, disminución del intercambio gaseoso de la raíz, disminución del intercambio de nutrientes entre el suelo y la solución por encapsulado de agregados y generando adicionalmente una marcada deficiencia de nutrientes para el crecimiento vegetal (Mendoza *et al.*, 2000). Para el tratamiento de estos residuos que contaminan el suelo existen diversas alternativas, sin embargo una de las más adecuadas es el tratamiento de suelos contaminados con petróleo o residuos de petróleo por medio de la biorremediación. Se entiende por biorremediación el uso de cualquier microorganismo, hongo o planta (fitorremediación) de origen natural o introducidos deliberadamente para consumir, degradar y descomponer los contaminantes hidrocarbonados a niveles aceptados por la legislación vigente, con el fin de sanear, biorremediar o rehabilitar un sitio contaminado. Los microorganismos degradadores de petróleo utilizan el HC como fuente carbonada energética y tienen la capacidad de oxidarlos, degradarlos o transformarlos en biomasa o en productos menos tóxicos y de esta manera removerlos del medio. La meta ideal y final de la biorremediación es la completa degradación de una molécula orgánica hasta compuestos inorgánicos (CO<sub>2</sub>, agua y formas inorgánicas de N, P y S) y componentes celulares.

En definitiva, debido a que la actividad petrolera y que la producción agropecuaria y forestal comparten en nuestro país espacios productivos, estas deben compatibilizarse de una manera racional y avanzar con hechos concretos que resulten ecológica y económicamente viables y sustentables para coexistir, preservar el ecosistema y el medioambiente dentro de un marco legal ágil, dinámico y factible que promueva una mejora de la calidad de vida.

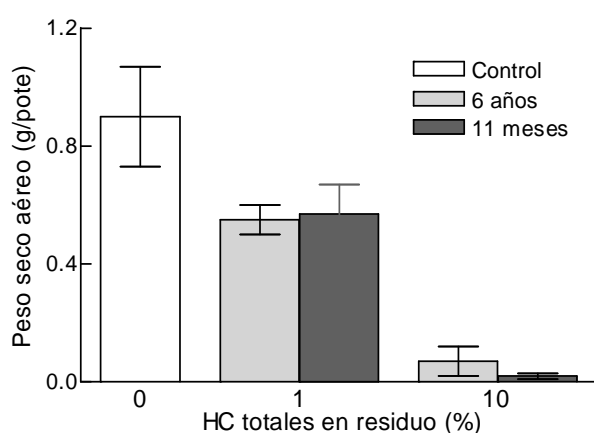
## **Petróleo y características de los hidrocarburos**

El petróleo es un compuesto bituminoso de HC de fase líquida o gaseosa existente en reservorios naturales. Su nombre *petroleum* deriva del latín *petra* (roca) y *oleum* (aceite). Los reservorios naturales, denominados yacimientos, pueden encontrarse a distintas profundidades donde el petróleo se encuentra sometido a alta presión y temperatura, por ejemplo: el yacimiento hidra en Tierra del Fuego se encuentra en el mar a unos 10 km de la costa y a 1690 m de la superficie; en Salta existe el yacimiento Santa Rosa a unos 5500 m de profundidad, mientras que Vaca Muerta se estima a una profundidad de unos 3000-3500 m de la superficie.

En líneas generales, cuando se extrae el petróleo aflora a altas temperaturas, dividido en tres formas básicas: gas natural, se trata de gas que no condensa a temperatura ambiente; condensado, es el gas que condensa a temperatura ambiente y; crudo, es la forma líquida. La composición del petróleo varía según el yacimiento en una relación H/C = 1,85 como una media generalizada. Una aproximación de su composición podría ser la siguiente: azufre 0,1–7,9 %, nitrógeno 0,02–1,61 %, oxígeno 0,08–1,80 %, trazas de fósforo, trazas de metales pesados (V, Ni, Fe, Mn, Pb), agua de formación y agua de inyección de alta salinidad. Posee además, HC de distinto peso molecular y en distintas proporciones de nominados alcanos o parafinas, icloalcanos o icloparafinas, alquenos u olefinas y arenos o aromáticos (<15 %). El 60 % corresponde a aproximadamente 295 HC diferentes y el resto a cientos de compuestos.

En cuanto a las posibilidades de biorremediación, los HC de bajo peso molecular, simples ligaduras y cadenas lineales son más factibles de degradar que aquellos de alto peso molecular, con más de una ligaduras y cíclicos (Bulman y Jank, 1990). En Tierra del Fuego en piletones a cielo abierto que contenían residuos de petróleo en superficie con diferente tiempo de exposición se observó que en concentraciones del 10 % el residuo con tan solo 11 meses de exposición al aire libre, con un 90 % compuesto con HC de C<sub>13</sub>– C<sub>33</sub>, tuvo un efecto negativo mayor sobre la producción de pasto ovillo que el residuo con 6 años de exposición, con un 25 % compuesto por HC de C<sub>13</sub> – C<sub>33</sub> y el 75 % restantes por HC de mayor peso molecular (Mendoza, 1998).

Mientras que en concentraciones del 1 % no hubo efecto entre residuos, pero la producción de pasto ovillo disminuyó un 28 % respecto del testigo sin contaminar (Fig. 1). Los residuos compuestos por HC de alto peso molecular, con mayor tiempo de exposición al aire y que han perdido los HC de bajo peso molecular por evaporación y degradación afectan el crecimiento vegetal en menor medida que aquellos de bajo peso molecular. Con el tiempo, el residuo hidrocarbonado de alto peso molecular puede pasar a ser casi un inerte en el suelo, y en zonas áridas y con dosis apropiadas hasta puede promover el crecimiento vegetal por una mejor conservación de la humedad del suelo (Mendoza *et al.*, 1995; Mendoza y Portal, 2000).



**Figura 1.** Efecto del nivel de contaminación de un suelo de Tierra del Fuego por un residuo de petróleo con 6 años de exposición al aire libre y otro con 11 meses de exposición sobre el crecimiento de pasto ovillo (*Dactylis glomerata*). (Mendoza *et al.*, 1998).

Dentro de los HC aromáticos se encuentran los HC policíclicos aromáticos (PAHs) en concentraciones 1 µg/kg y hasta 10 mg/kg, que resultan ser recalcitrantes y peligrosos para la salud humana. Los PAHs más comunes e identificados como prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EUA son los siguientes: naftaleno (C<sub>10</sub> H<sub>8</sub>), acenafteno (C<sub>12</sub> H<sub>10</sub>), acenaftileno (C<sub>12</sub> H<sub>8</sub>), fluoreno (C<sub>13</sub> H<sub>10</sub>), fenantreno (C<sub>14</sub> H<sub>10</sub>), antraceno (C<sub>14</sub> H<sub>10</sub>), fluoranteno (C<sub>16</sub> H<sub>10</sub>), pireno (C<sub>16</sub> H<sub>10</sub>), benzo(a)antraceno (C<sub>18</sub> H<sub>12</sub>), criseno (C<sub>18</sub> H<sub>12</sub>), benzo(b)fluoranteno (C<sub>20</sub> H<sub>12</sub>), benzo(k)fluoranteno (C<sub>20</sub> H<sub>12</sub>), benzo(a)pireno (C<sub>20</sub> H<sub>12</sub>), dibenzo(ah)antraceno (C<sub>22</sub> H<sub>14</sub>), benzo(ghi)perileno (C<sub>22</sub> H<sub>12</sub>), indeno(1,2,3,cd)pireno (C<sub>22</sub> H<sub>12</sub>). El criterio establecido para la remoción o tratamiento de estos PAHs varía ampliamente entre las distintas naciones (Wilson y Jones, 1993). Entre ellos, EUA, Canadá, Holanda, Alemania son los principales países en diseñar políticas serias para la remoción y tratamiento de los PAHs. La estructura de estos HC consiste en 2 o más anillos benzenicos unidos de manera lineal, angular o circular

sobre sí mismos, formando verdaderos compuestos heterocíclicos. En sus estructuras, además de átomos de C e H, existen N, S y O, pero en mucha menor proporción. Los PAHs pueden ser encontrados en concentraciones considerables en sitios industriales asociados a producción de petróleo, gas y sustancias preservadoras de madera. La Organización Mundial de la Salud (1983) los ha definido como cancerígenos y mutagénicos. Estos PAHs son muy estables, recalcitrantes y relativamente difíciles de degradar en suelos contaminados, y más difíciles aún los que poseen mayor peso molecular y número anillos benzenicos en su estructura. En un suelo arenoso de pH 4,5 sin tratamiento alguno (Tabla 1), y tan solo por atenuación natural el fluoranteno (3 anillos) se degradó el 80 y 93 % respecto a su concentración inicial en 64 y 258 días mientras que el indeno(1,2,3,cd)pireno (5 anillos) tan solo el 17 y 23 % respectivamente (Ferro *et al.*, 1997).

**Tabla 1.** Degradación por atenuación natural de hidrocarburos policiclicos aromáticos (PAHs) en un suelo arenoso luego de 64 y 258 días de contacto (Ferro *et al.*, 1997).

Hidrocarburos	Inicial (mg/kg)	64 días (mg/kg)	258 días (mg/kg)	Degradación (%)	
				64 días	258 días
Naftaleno	23,6	10,5	0,0	55,5	100,0
Acenafteno	33,0	6,8	15,7	79,4	52,4
Fluoranteno	63,7	12,4	4,2	80,5	93,4
Pireno	85,2	33,6	11,2	60,6	86,9
Benz(a)antraceno	4,1	4,0	1,4	2,4	65,9
Criseno	19,6	7,3	3,9	62,8	80,1
Benzo(b)fluoranteno	17,6	8,8	11,1	50,0	36,9
Benzo(k)fluoranteno	8,8	5,7	3,4	35,2	61,4
Benzo(a)pireno	13,1	9,4	5,4	28,2	58,8
Dibenzo(ah)antraceno	2,1	2,0	0,9	4,8	57,1
Benzo(ghi)perileno	12,0	9,2	2,9	23,3	75,8
Indeno(1,2,3,cd)pireno	6,4	5,3	4,9	17,2	23,4

## Destinos cuantitativos de un derrame

Luego de un derrame se afecta el ecosistema, pero estos efectos no son permanentes y el ecosistema tiende a restablecerse con el tiempo. Los destinos de los HC provenientes de un derrame son muy difíciles de cuantificar, pues son dependientes de las características del suelo, la vegetación, el clima y la posición geográfica (latitud, longitud y altitud). Sin embargo, en condiciones definidas en EUA, Eascott *et al.*,



(1989) informaron que luego de un año de ocurrido un derrame, el HC retenido en el horizonte superficial de un suelo siguió el siguiente camino: 20 % se evaporó, 2 % se disolvió en el agua del suelo, 30 % se biodegradó, 3 % se degradó por fotólisis y reacciones químicas de diversos tipos y el 45 % restante puede quedar retenido en el suelo y parte se podría lixiviar a profundidades mayores y los HC livianos podrían alcanzar la napa freática.

Evaporación: ocurre principalmente para los HC livianos como la Gasolina (C<sub>4</sub>-C<sub>9</sub>), con densidades inferiores a 1, que posee una presión de vapor de 60-105 kPa, que depende del lugar, de la estación y del clima. Los compuestos que se evaporan pueden ser más de 100, entre ellos los más volátiles son: butano, propano y los llamados BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno y xileno). En suelos arenosos, los derrames de petróleo y más aún de gasolina, resultan más peligrosos que en suelos arcillosos por el mayor riesgo de lixiviación con posibilidades de alcanzar la napa freática. Justamente, una de las técnicas de biorremediación indica promover la evaporación por intermedio de insuflar aire, remover el suelo para mejorar la aireación y la ventilación, y aumentar así la presión de oxígeno y acelerar la evaporación.

Disolución: ocurre con el agua del suelo y también en la napa freática en el caso que el HC la alcance. La disolución en agua del HC es baja y depende del compuesto.

La gasolina se disuelve a razón de 50-150 mg/L, mientras que el percloroetileno (PCE), que es un solvente de 2 carbonos unido en doble ligadura (CCl<sub>2</sub>=CCl<sub>2</sub>), se disuelve nada más de 5 µg/L aproximadamente.

Biodegradación: es muy dependiente de las características físicas, químicas y biológicas del suelo. La biodegradación se produce por bacterias y hongos, existentes en el suelo, y también por actinomicetes y levaduras. En líneas generales y dependiendo del clima y suelos, en superficie las tasas de degradación varían desde 0,02 – 0,4 g HC/kg suelo/día (Bauman, 1990). El suelo alberga bacterias autóctonas heterótrofas que degradan HC como también otras que no lo hacen. Los primeros 15 centímetros de un suelo pobre en nutrientes y en materia orgánica de pH 8,2 en Pico Truncado (Santa Cruz) alcanzó una concentración de bacterias heterótrofas totales de alrededor de  $5 \times 10^7$  ufc/g de suelo seco antes de la contaminación, de ese total el  $7 \times 10^2$  eran degradadoras de HC. Al contaminarse el suelo con petróleo crudo, la concentración de bacterias heterótrofas totales se elevó a  $2 \times 10^8$  y las degradadoras de HC aumentaron hasta  $9 \times 10^3$  ufc/g suelo seco, que corresponde a un aumento 3 veces mayor respecto a las heterótrofas totales. Además, cuando se fertilizó el suelo con N y P el aumento de las degradadoras de HC trepó hasta  $5 \times 10^4$  ufc/g suelo seco (Mendoza *et al.*, 1998). En un suelo con adecuada concentración de materia orgánica, oxígeno y nutrientes puede contener entre  $10^7$ – $10^9$  ufc/g suelo seco. De esta cantidad,

entre 0,1–1 % pueden ser específicos para degradar HC, y al ponerse el suelo en contacto con HC, los microorganismos degradadores pueden aumentar sustancialmente hasta  $10^6$ – $10^8$  ufc/g suelo seco (Dineen *et al.*, 1990).

En todos los casos las tasas de degradación en suelo son muy dependientes de: a) características físicas y químicas, b) fertilidad, c) microflora existente en calidad y viabilidad, d) temperatura, humedad y presión de oxígeno, e) características del o de los HC contaminantes y f) del volumen y concentración del HC en el suelo contaminado. Es necesario tener presente que en líneas generales, entre 0,5–1-2 % de petróleo en el suelo la tasa de degradación es casi independiente de la concentración de HC en suelo, entre 3–30 % la tasa es dependiente de la concentración y a mayor concentración la tasa disminuye, y entre 30–50 % de petróleo en peso en el suelo, la degradación prácticamente cesa. En zonas sobresaturadas y a una profundidad en el perfil de suelo donde el oxígeno es escaso y las raíces no llegan (Widdowson *et al.*, 2005), la biorremediación cesa o es muy baja y es necesario aplicar técnicas específicas de remediación asistida. De esta manera y para biorremediación es conveniente mantener concentraciones de petróleo en suelo entre 1 % y no mayores al 5 %, más allá de estos valores la tasa de degradación puede disminuir considerablemente.

Los géneros más importantes que degradan HC son: *Bacillus*, *Pseudomonas* (*P. putida*), *Micrococuss*, *Thiobacillus*, *Spirillum* y *Flavobacterium*, entre otras. Entre los hongos degradadores de HC se encuentran los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Stropharia*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, entre otros.

## **Movimiento y retención de HC en el suelo luego de un derrame**

Luego de ocurrido un derrame, además de reportarlo inmediatamente, es necesario cercar la zona contaminada, evaluar el riesgo ambiental y comenzar el tratamiento de remediación lo antes posible. En este sentido, es importante conocer el movimiento secuencial de los HC en el perfil de suelo para, posteriormente, aplicar los planes de contingencia diseñados para tales casos. Una secuencia general podría ser la siguiente (Hillel, 1989).

1.- Volatilización de compuestos livianos en superficie: esto provoca la contaminación de la atmósfera cercana y puede ser especialmente peligrosa en días calurosos y sin viento porque una nube saturada de HC puede almacenarse en lugares bajos y sin ventilación con peligros de explosión ante acercamientos de vehículos o personas.

2.- Degradación por fotólisis: se puede producir en superficie alrededor del 3 %.

- 3.- Esguerrimiento superficial: el petróleo derramado puede acelerarse por gravedad y por arrastre de agua de lluvia y acumularse en depresiones del terreno.
- 4.- Adherencia de los compuestos pesados en la superficie del suelo y plantas.
- 5.- Hidrofobización de los primeros centímetros de suelo que queda encapsulado por el crudo. Inhibición del intercambio de nutrientes suelo-solución.
- 6.- Infiltración lateral y en profundidad dentro de una zona no saturada de HC, principalmente gasolina, por su baja densidad.
- 7.- Creación de una zona saturada de HC en capas superficiales.
- 8.- Retención y adsorción de HC en partículas de suelo, materia orgánica y poros.
- 9.- Volatilización y difusión de vapor con alta concentración de HC hacia zonas no saturadas (lateral y en profundidad).
- 10.- Separación cromatográfica de HC livianos y pesados en el perfil del suelo. Livianos a mayor profundidad y pesados cercanos a la superficie.
- 11.- Disolución de HC solubles en el agua del suelo.
- 12.- Emulsión de HC no solubles y pesados en el agua del suelo.
- 13.- Degradación química de HC en el perfil por sustancias existentes en el suelo.
- 14.- Degradación biológica de HC en el perfil del suelo por microorganismos degradadores.
- 15.- Lavado y arrastre de HC en profundidad por agua de lluvia que puede alcanzar el agua subterránea.
- 16.- Deposición de HC en la superficie de la napa freática. Ascenso, descenso y flujo lateral de HC junto con el acuífero.
- 17.- Dispersión y migración de HC dentro del acuífero.

### **Características del suelo, migración y retención de componentes móviles del petróleo en el perfil**

Conceptualmente se sostiene que cuanto mayor es el tiempo de permanencia de HC móviles en el perfil de suelo mayor es la posibilidad para que el HC sea degradado y menor la posibilidad de alcanzar la napa freática, que es uno de los mayores peligros y posteriores problemas para biorremediar. Sin embargo, a mayor profundidad en el perfil menor es la concentración de raíces, de oxígeno y de bacterias heterótrofas que degradan HC que pueden disminuir considerablemente en cantidad y viabilidad. Por esta razón es necesario monitorear estas variables. Algunas de las características más importantes de un suelo que afectan la retención, migración; y de aquí la degradación de HC en el suelo son las siguientes:

.- Textura: la permeabilidad, difusividad y dispersión hidrodinámica son variables dependientes de la composición textural. Suelos con texturas finas, altos porcentajes de arcillas y materia orgánica tienen capacidad de retener HC que suelos de texturas gruesas con altos porcentajes de arena y pobres en materia orgánica.

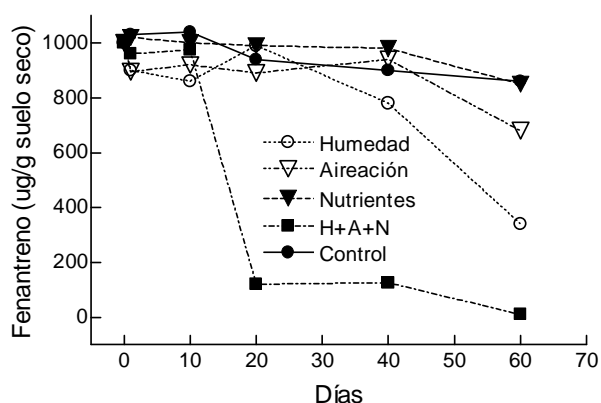
.- Estructura: macro, microporos y fisuras. Los macro y micro poros están asociados generalmente con la textura. Las fisuras que se pueden producir en suelos arcillosos expandibles en casos de sequías prolongadas aceleran la migración de HC en profundidad.

.- Profundidad de horizontes: cuanto mayor es la profundidad de un horizonte mayor es su capacidad para retener HC y mayor el tiempo de permanencia del HC en el perfil susceptible a ser degradado.

.- Uniformidad horizontal y vertical de las capas de horizontes: concavidades y depresiones y presencia de roca tanto en superficie como en horizontes subsuperficiales modifican la capacidad de retención de HC en el suelo.

.- Profundidad de la napa freática: a mayor profundidad de napa, mayor es el tiempo de retención y degradación del HC en el perfil, y menos chances que el HC alcance la napa freática.

.- Humedad, temperatura y fertilidad del suelo: además de la cantidad y capacidad de las bacterias degradadoras de HC en el suelo, estos tres factores juntamente con la difusión de oxígeno controlan la tasa de degradación biológica de HC en suelo y tienen una interacción positiva entre las variables (Fig. 2).



**Figura 2.** Degradación de fenantreno ( $C_{14} H_{10}$ ) en un suelo contaminado con 1000 ug/g bioestimulado con H (humedad al 60 % de la capacidad de campo), A (aireado por frecuentes mezclas), N (fertilizado con nitrógeno C:N = 60:1; y fósforo C:P = 100:1) y con la combinación de H+A+N. (Cho y Kim, 1997).

## **Evaluación del riesgo de la contaminación**

Una evaluación del riesgo ambiental luego de ocurrida la contaminación es muy importante para definir la potencialidad de la contaminación. Básicamente, el riesgo ambiental depende al menos de tres factores: a) la naturaleza y magnitud de la contaminación, b) el camino que seguirá el contaminante luego de la contaminación, ya sea por desplazamiento en superficie o migración en el perfil de suelo, y c) la consecuente exposición del contaminante al medioambiente, directa o indirectamente sobre poblaciones en general.

Luego de reportar la contaminación, cercar el lugar, evaluar el riesgo, y realizar otras tareas relacionadas con el plan de contingencia, es necesario tener presente un concepto que, a pesar de ser reconocido y aceptado, no necesariamente es siempre tenido en cuenta en estas situaciones. Se trata de realizar los mayores esfuerzos para no remover o remover lo mínimo indispensable el horizonte superficial del suelo contaminado, que es precisamente donde se encuentran la mayor concentración de bacterias autóctonas degradadoras de HC en el suelo. Si bien se podría posteriormente incorporar bacterias alóctonas degradadoras de HC al suelo contaminado con mayor capacidad de degradación que las autóctonas, estas últimas se encuentran más adaptadas al ambiente del sitio contaminado y cuentan con cierta ventaja sobre las primeras, principalmente en términos de persistencia en el tiempo. Este criterio, resultaría aún más importante si posteriormente se utilizará como técnica de biorremediación la atenuación natural.

## **Biorremediación**

La biorremediación de suelos incluye a variadas técnicas biológicas utilizadas para remediar suelos contaminados con HC. La biorremediación puede ser realizada *in situ* o *ex situ* y además puede comprender a sustancias orgánicas e inorgánicas. Además del tratamiento biológico, las técnicas de biorremediación más utilizadas se caracterizan por ser de bajo costo, suficientemente efectivas, compatibles desde el punto de vista ecológico y factibles de ser utilizadas con baja complejidad. Sin embargo, unas de las desventajas más importantes es que en algunos casos los tiempos necesarios para la remediación del suelo son largos. De aquí que existen varias técnicas denominadas de manera genérica biorremediación asistida, que comprende estimulaciones de la actividad microbiana para aumentar las tasas de degradación. Las más comunes son: incorporación de nutrientes, aireación, siembra

de microorganismos degradadores, humectación y combinación de dos o más técnicas.

## **Métodos de biorremediación**

Existen numerosos métodos de biorremediación disponibles que van desde simples a complejos, de bajo costo y alto costo, y pueden ser *in situ* y *ex situ*. Cualquiera sea la técnica utilizada para remediar, sanear, rehabilitar o biorremediar el suelo del sitio contaminado cuando se trata de grandes superficies o volúmenes contaminantes debería cumplir al menos con 2 principios básicos para que sea efectiva: ser económica y ecológicamente sustentable, de otra manera existen grandes posibilidades de fracaso durante el desarrollo del tratamiento y que este se abandone o no se finalice por completo. Algunas de las más utilizadas por su costo y efectividad son las siguientes:

1.- Atenuación natural: estrictamente y en situaciones reales y prácticas se trata de un método que se realiza en el lugar (*in situ*) donde se produjo la contaminación, generalmente por derrames accidentales, siempre y cuando las condiciones del terreno y la magnitud y calidad de la contaminación lo permitan. Si el volumen de petróleo derramado y concentración final de HC en el sitio contaminado son muy elevadas, es posible que sea necesario emplear otro método de biorremediación. La atenuación natural aprovecha procesos naturales para contener la contaminación causada por derrames de petróleo y reducir su concentración en el suelo afectado. Se procede en primer lugar a un aislamiento del sitio contaminado y se monitorea en el tiempo la marcha de la biorremediación natural o también llamada remediación pasiva. Este proceso depende de las características y capacidad del suelo para degradar HC asociado con el clima del lugar. En todos los casos de derrame es muy importante en principio realizar tareas de recuperación del petróleo derramado en la superficie del suelo al máximo posible, tanto de aquel acumulado en concavidades naturales como el existente en pozos de recuperación realizados para tal fin por medio de bombeo. Esta tarea es muy importante y necesaria como parte del saneamiento del lugar contaminado y también para disminuir las concentraciones de HC en suelo a niveles apropiados y permitir una degradación efectiva en el menor tiempo posible. Esta tarea es necesaria, además, para preservar la vegetación del lugar y evitar la remoción del horizonte superficial del suelo donde se encuentran la mayor parte de los nutrientes, materia orgánica y microorganismos de suelo que sustentan la fertilidad para el crecimiento vegetal. Posteriormente durante el transcurso de la biorremediación, el aumento de la cobertura y

crecimiento vegetal contribuirán a acelerar la remediación del sitio contaminado (Mendoza *et al.*, 1998; Mendoza y Portal, 2000). En todos los casos es importante también no “planchar” el suelo, por el contrario dejarlo de manera rugosa para mejorar la aireación, retener humedad y aumentar la captación y deposición de semillas arrastradas por el viento e inclusive realizar surcos de poca profundidad y acelerar aún más la biorremediación por aumento de la cobertura vegetal del terreno (Mendoza *et al.*, 1998).

De todas maneras Transcurrido un tiempo de estabilización del sistema es posible realizar algunas labores que estimulen la degradación de HC tales como, mezclar los primeros centímetros del horizonte superficial contaminado, agregar nutrientes, estimular el crecimiento de plantas, etc. En este caso dejaría de ser atenuación natural estrictamente para pasar a llamarse como algunos de los casos que se mencionan a continuación.

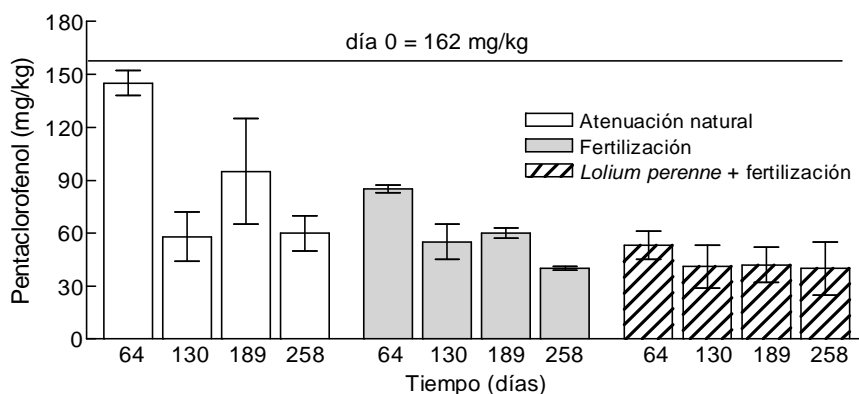
2.- Landfarming: puede realizarse en el lugar de contaminación o trasladar el suelo contaminado con una alta concentración de HC a otro sitio para biorremediar. Se trata de disponer el residuo hidrocarbonado sobre la superficie del suelo y mezclarlo con una capa de este de manera apropiada para diluirlo hasta una profundidad variable como para obtener niveles de HC de hasta 5-7 % en peso y utilizar el suelo como biorreactor. La capa de suelo debe ser la mínima posible para alcanzar las concentraciones de HC deseadas. Esta técnica fue utilizada para el vaciado, tapado y saneamiento de piletos compuestos por residuos de petróleo y agua salina en Pico Truncado (Fig. 3). Los suelos de áreas petroleras en Patagonia Continental son en su mayoría pobres en nutrientes, con pH alcalino, bajos en contenido de materia orgánica y en muchos casos con alto contenido salino que agravan aún más la situación existente (Mendoza *et al.*, 1998). La deficiencia de nutrientes, combinado con las bajas temperaturas y las escasas precipitaciones en Patagonia, hacen necesario implementar técnicas de manejo que mejoren las condiciones del suelo contaminado para su biorremediación. De aquí que comúnmente se realizan labores culturales como, mezclado y aireado del suelo para favorecer la degradación, y también agregados de nutrientes para estimular el crecimiento de la población microbiana y de vegetales en general que estimulan aún más la degradación de HC (Mendoza y Portal, 2000; Mendoza *et al.*, 2001). En Cañadón Seco (Santa Cruz) un derrame accidental de crudo diluido con los primeros 30 cm del perfil a concentraciones iniciales de HC de 9,1 % y posteriormente tratado con nutrientes se redujo a 4,4 % en 16 meses (Luque *et al.*, 2000).



**Figura 3.** Piletón antes y después de aplicado el land farming en vías de saneamiento confinando el residuo en superficie que contenía residuos de petróleo (HC totales de 4,3 %) y agua salina expuesto al aire libre para acelerar su degradación en un suelo con pH 8,3 (Mendoza *et al.*, 1998).

3.- Biopilas: es una técnica asistida y muy utilizada que se realiza en otro lugar (*ex situ*) donde el suelo fue contaminado y destinado para tal fin. La elección del lugar destinado para establecer las biopilas debe tener un perfil de suelo con la napa freática ubicada a una cierta profundidad, además de asegurarse de que el perfil de suelo sea impermeable o impermeabilizarlo para evitar que componentes móviles del petróleo puedan alcanzar y contaminar la napa. La biopila es básicamente un sistema de composteo y consiste en mezclar los residuos de HC con suelo a concentraciones que pueden ser mayores que para landfarming, pero adecuadas para manejo del suelo y no tan altas como para disminuir de manera marcada la tasa de degradación de HC. Previo a la construcción de la biopila, y si fuera necesario por el tipo y tamaño del material contaminado, se debe realizar una homogenización del suelo utilizando una zaranda para disminuir el tamaño del grano y aumentar así la exposición del contaminante a la acción de los microorganismos degradadores de HC. Además, el tamizado permite homogeneizar el muestreo posterior y disminuir la variabilidad en el análisis de HC durante el monitoreo de la degradación en el tiempo. La biopila tiene forma trapezoidal y las dimensiones variarán entre un largo de 10 a 100 m, un ancho 5 a 20 m y 2 a 4 m de altura (Fig. 4).





**Figura 4.** Degradación de pentaclorofenol (PCP, C<sub>6</sub>Cl<sub>5</sub>OH) en un suelo arenoso de pH 4,5 contaminado con 162 mg/kg durante 258 días por atenuación natural, fertilización con N-P-K-S, y con fertilización y cultivo de *Lotium perenne*. (Ferro et al., 1997).

La pila construida puede ser tapada para conservar la humedad y temperatura, y también aireada por cañerías por circulación forzada o natural y humedecerla con riego si fuera necesario y conveniente. En muchos casos, se realiza el volteo y mezcla de la pila para aireación y homogenización, y también la incorporación de bacterias alóctonas degradadoras de HC. En caso que el clima y el suelo no proporcionen condiciones apropiadas como para promover el crecimiento bacteriano, y de esta manera lograr una eficiente degradación de HC en el menor tiempo posible, será necesario corregirlas mediante bioestimulación (Ercoli et al., 2000) y bioaumentación (Pozzo Ardizzi et al., 2000). Una relación efectiva recomendada por EPA (USEPA) estaría compuesta por C:N:P y puede variar desde 100:1:1 hasta 100:15:0.5. Un trabajo de biorremediación asistida en 4 biopilas en la provincia de Santa Cruz desde febrero hasta agosto con suelos contaminados con HC a un nivel de 7,2; 7,9; 6,0 y 4,7 % alcanzó una degradación promedio del 63 %, a una temperatura media promedio de 3,4 °C (Moreno Andrade y Gismondi, 2011).

El suelo contaminado con petróleo contiene generalmente una concentración de HC totales superior al 1 % p/p como suelo seco, que es el nivel guía superior indicado como punto final para biorremediación según la legislación vigente. Los hidrocarburos halogenados, si se encuentran, no deben superar concentraciones 5 %, pero si fuera superior, sería necesaria aplicar una oxidación previa al tratamiento en biopila hasta alcanzar un nivel inferior al 5 %.

4.- Bioaumentación: consiste en siembra de microorganismos degradadores de HC a un suelo contaminado, que fueron crecidos y multiplicados previamente en medios apropiados. Las bacterias degradadoras pueden ser bacterias alóctonas de origen comercial y las autóctonas previamente multiplicadas. Es una técnica complementaria que puede combinarse con otras y acelerar de este modo la tasa de degradación de

HC en suelo, especialmente cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o en capacidad degradadora. En Colonia Catriel se logró biorremediar predios contaminados con residuos de petróleo con concentraciones iniciales de HC totales 10,9 % en un período de 2 años mediante la aireación por laboreo mecánico combinado con siembra de bacterias autóctonas degradadoras de HC multiplicadas *in vitro* que alcanzó valores promedios de HC totales cercanos al 1 % (Pozzo Ardizzi *et al.*, 2000). Sin embargo, los resultados de la bioaumentación han mostrado ser controversiales, al menos en ciertos ambientes. En la Antártida, donde las condiciones climáticas extremas y también las reglamentaciones internacionales impiden el uso de microorganismos alóctonos, la bioaumentación de suelos crónicamente contaminados con HC con bacterias sicrofílicas autóctonas en niveles de  $10^6$  ufc/g suelo seco no mejoró la eficiencia de biodegradación de hidrocarburos en comparación con los sistemas solo bioestimulados (Mac Cormack *et al.*, 2011). Queda abierta la pregunta acerca de la utilidad de la bioaumentación para el tratamiento de suelos contaminados con HC y que nunca antes habían sido contaminados con HC en esas latitudes, en los cuales la microflora autóctona no está previamente adaptada al estrés causado por la presencia de HC. En estos casos particulares y en laboratorio, el bioaumento ha sugerido que puede mejorar la eficiencia de degradación de HAPs o al menos acelerar los tiempos de degradación, lo cual en un ambiente como la península antártica, donde solo se dispone de dos a tres meses con temperaturas que superen los 0 °C en algún momento del día, representa una ventaja relevante (Ruberto *et al.*, 2006).

5.- Bioestimulación: es también una técnica complementaria de biorremediación denominada biorremediación asistida, que consiste en mejorar las condiciones de humedad, temperatura, fertilidad del suelo (Luque *et al.*, 2000; Mendoza *et al.*, 2000) y aireado (Ercoli *et al.*, 2000) para estimular a la población microbiana autóctona y así acelerar la tasa de degradación de HC. En todos estos casos es muy importante realizar un monitoreo del sistema y las mediciones necesarias para corregir y acelerar así la tasa de degradación de HC a su máximo posible mediante el ajuste de las variables involucradas. Estas variables deben estar asociadas a las condiciones de suelo y clima del lugar pues existe interacción positiva entre las variables que bioestimulan el sistema y la combinación de más de una variable aumenta la tasa de degradación de HC (Fig. 5).



**Figura 5.** Biopila típica en construcción con cañerías de aireación vertical y horizontal para estimular la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados.

La Patagonia Insular posee suelos ácidos, pobres en nutrientes, con altos niveles de materia orgánica y reciben precipitaciones anuales de 350-400 mm en el norte de Tierra del Fuego donde se desarrolla la actividad petrolera y la producción ovina. La Patagonia Continental posee suelos alcalinos, pobres en nutrientes, con bajos niveles de materia orgánica que reciben precipitaciones anuales del orden de 160-200 mm con temperaturas superiores a las predominantes en Tierra del Fuego. Estas condiciones claramente diferentes en clima y suelo deben ser consideradas para luego aplicar criterios acertados que complementen cualquier tipo de biorremediación estimulada por cualquiera de las variables antes mencionadas. En términos prácticos, surge que en Tierra del Fuego el mayor problema para la degradación de HC es la baja temperatura, mientras que en el continente es la falta de humedad. Estos y otros criterios en cuanto a clima y suelo deben ser tenidos en cuenta a la hora de plantear el método de biorremediación para utilizar. Como ejemplo extremo de lo anteriormente expuesto puede mencionarse nuevamente la situación existente en los suelos antárticos. Allí se conjugan, temperaturas extremadamente bajas, muy escasas precipitaciones así como niveles de nutrientes inorgánicos (N y P) y orgánicos (C) muy por debajo de los valores habituales. Bajo estas condiciones, cuando ocurre un derrame de HC se produce un desbalance en la relación C:N:P que impide un adecuado crecimiento de los microorganismos y la transformación de ese C en exceso

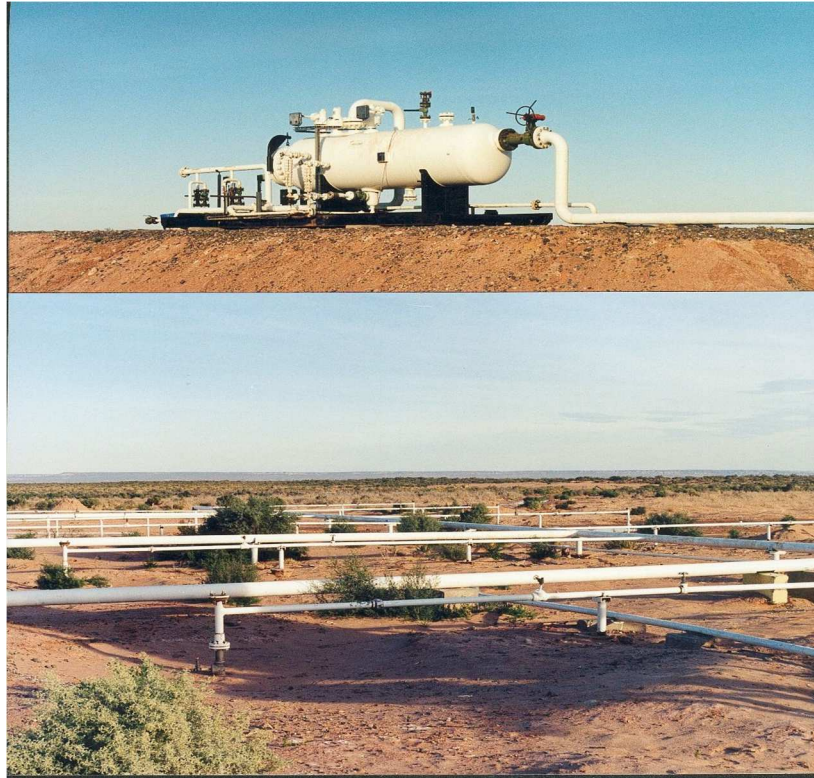
a biomasa. Se ha observado que la bioestimulación con N y P, a fin de ajustar la relación C:N:P, es un paso esencial en cualquier proceso de biorremediación efectivo en suelos antárticos. Dado que ese ajuste puede ser caso-específico, su optimización mediante análisis de superficie de respuesta es una herramienta recomendable (Martínez Alvarez *et al.*, 2015). La aplicación a campo, en sistemas de biopilas, de los resultados de dicha optimización obtenidos en el laboratorio ha confirmado su eficiencia para mejorar la biodegradación de HC (Martínez Alvarez *et al.*, 2015).

6.- Estabilización, solidificación y confinamiento: se trata de confinar residuos estabilizados. Uno de los grandes problemas de los métodos de biorremediación efectivos en costos como los mencionados anteriormente es el gran volumen de suelo sin contaminar o ya remediado que se necesita utilizar para diluir con el residuo de HC, comúnmente en estos casos se trata de residuos de fondo de tanques de almacenamiento de petróleo que generan grandes volúmenes de barros empetrolados difíciles de gestionar. Recordemos que concentraciones de HC superiores al 3-6 %, dependiendo del suelo y clima, se consideran límites como para obtener una degradación relativamente efectiva. Estabilización puede ser definida como la modificación química del material contaminado para eliminar o disminuir al mínimo su toxicidad. La EPA refiere a estabilización, solidificación y fijación como el tratamiento de residuos que produce los siguientes efectos: mejora en las propiedades físicas, encapsulados de los contaminantes y reducción de la solubilidad y movilidad de las sustancias tóxicas. Existen varias técnicas de solidificación y estabilización de los residuos empetrolados, entre las más conocidas tenemos: uso de cemento como estabilizador, uso de silicatos, adsorbentes sintéticos, encapsulamiento y vitrificación (Pamukcu *et al.*, 1989). Posteriormente y antes de confinarlo en lugares seguros, se debe tener en cuenta: a) durabilidad, b) capacidad del sistema para la retención del residuo estabilizado y c) resistencia del sistema para prevenir la lixiviación de residuos móviles de HC. Todos estos factores son muy importantes para mejorar la resistencia física del material en el tiempo, por lo tanto el monitoreo de contaminantes debe ser permanente (Dardis, 2000).

7.- Remediación de napa (bioslurping): es la típica tecnología utilizada para la biorremediación de napa freática. En este tratamiento se utilizan una serie de cañerías distribuidas y enterradas a profundidades apropiadas para permitir la succión del agua contaminada con HC de la franja capilar y del nivel freático (Fig. 6). La técnica también permite insuflar aire (bioventing) para acelerar la biorremediación (Bitesnik, 1998; Maselli y Rosso, 2000). El agua contaminada se separa del HC para luego gestionarlos de manera conveniente, previo paso por un filtro biológico. Esta técnica ha permitido recuperar 626 m<sup>3</sup> (47 % del total) litros de HC de una zona medanosa

(bajo de Añelo, Neuquén) con su napa contaminada ubicada entre 1 a 5 m de profundidad con una pluma de aproximadamente 13 hectáreas y donde se habían acumulado aproximadamente 1325 m<sup>3</sup> de HC sobrenadante (Bitesnik, 1998).

8.- Lavado de suelo (soil washing): es un procedimiento *ex situ* y se basa en la extracción física en medio líquido y posterior separación de componentes orgánicos para removerlos del suelo. Secado y distribuido el suelo en zonas de relleno (El Jury *et al.*, 2000).



**Figura 6.** Dispositivo utilizado para la remediación de napa freática (Bioslurping) ubicada entre 1-5 m de profundidad y contaminada con gasolina que ocupó 13 hectáreas en el bajo de Añelo, Neuquén. (Bitesnik, 1998).

## Fitorremediación

La fitorremediación es el empleo de vegetales, incluido árboles, arbustos, pasturas y plantas acuáticas, para remover, degradar, transformar o secuestrar sustancias contaminantes del medioambiente terrestre o acuático. Se trata de una tecnología de bajo costo y ecológicamente compatible con criterios de sustentabilidad. Las plantas pueden ser utilizadas como bombas extractoras de bajo costo para depurar suelos y

aguas contaminadas con un costo de muy inferior a los métodos tradicionales. Algunos de los procesos degradativos en la fitorremediación ocurren en forma más rápida con plantas que con microorganismos, pero mejor aún con la combinación planta-microorganismo. La fitorremediación es un método apropiado para descontaminar superficies grandes o para finalizar la descontaminación de áreas restringidas en plazos largos y por sobre todo, es una metodología con plena aceptación pública y gubernamental. Si bien los períodos pueden ser largos e inefectivos a profundidades donde la masa de raíces en suelo es escasa, una mayor cobertura vegetal de la superficie en el suelo contaminado acelera, directa o indirectamente, la degradación de HC (Mendoza *et al.*, 1998). Las plantas a través de la actividad de su rizosfera estimula el crecimiento en número de bacterias capaces de degradar HC en el suelo (Kirk *et al.*, 2005). Los mecanismos mediante los cuales las plantas pueden remediar suelos y aguas contaminadas son múltiples y resulta dificultoso separar el efecto de cada mecanismo durante la degradación de HC *in situ*, puesto que algunos o todos los mecanismos pueden involucrados de manera simultánea. La fitorremediación incluye a plantas asociadas con comunidades microbianas y ofrecen métodos de remediación con mínimos disturbios del ecosistema en reparación. Las especies vegetales con potencial para ser utilizadas en fitorremediación se estiman alrededor de 750 (Sarma, 2011). Algunas de las propiedades deseables que debería reunir una especie para ser utilizada en biorremediación serían las siguientes:

1. Tolerancia a salinidad y pH alto.
2. Tolerancia a sequía e inundación variable y prolongada.
3. Buena masa de raíces con alcances profundos.
4. Tolerancia y adaptación al contaminante y al sitio contaminado.
5. Alta capacidad de acumular y concentrar el contaminante en sus tejidos cosechables.

Los mecanismos más importantes para biorremediación son los siguientes:

1.- Fitoextracción: es la capacidad de las plantas para absorber contaminantes de la solución del suelo y acumularlos en sus tejidos. Es la típica técnica para biorremediar suelos contaminados con metales pesados en donde se utilizan plantas preferentemente acumuladoras que tienen la capacidad de mantener altas concentraciones de metales pesados en sus tejidos y de esta manera remover el contaminante del suelo contaminado. Desde el punto vista práctico, la biorremediación por fitoextracción se convierte en totalmente efectiva, recién cuando el material vegetal cosechable (parte aérea) es retirado del sitio contaminado y posteriormente gestionado de manera adecuada. Las utilizadas en fitoextracción deberían producir una alta proporción de masa aérea y acumular en esta alta concentración del

contaminante. Alrededor de 500 especies han sido definidas como acumuladoras (De Kramer, 2010). En la ribera del Riachuelo se han encontrado altas concentraciones de HC y de metales pesados (Cr, Cu, Pb, Zn) en sitios clasificados muy altamente contaminados (Ratto *et al.*, 2004; Mendoza *et al.*, 2015). La presencia de *Eleocharis montana*, *Cyperus eragrostis*, *Hydrocotyle bonariensis*, nativas y típicas de áreas inundables de la Cuenca Matanza-Riachuelo, ha mostrado ser tolerante a las altas concentraciones de HC y metales pesados existentes en el medio, y en el caso de *H. bonariensis* sus raíces estuvieron colonizadas hasta un 30 % por micorrizas arbusculares sugiriendo que la simbiosis puede aún establecerse en sitios altamente contaminados, contribuir al crecimiento de la planta y acelerar la biorremediación (Mendoza *et al.*, 2015; Miransari, 2015). Estos tres géneros son considerados como emergentes para ser utilizados en biorremediación, aunque comparados con especies submergentes y flotantes han mostrado una menor capacidad para acumular metales (De Cabo *et al.*, 2015). Sin embargo, es aceptado que la presencia de plantas tolerantes favorece el establecimiento de otras plantas acumuladoras y una sensible estabilización del sistema en general (Wang *et al.*, 2012).

2.- Fitotransformación: refiere a la transformación, degradación o metabolización del contaminante dentro del tejido vegetal o en la zona rizosférica por la acción de enzimas secretadas por la raíz (Schroder *et al.*, 2007). La fitotransformación comprende a la fitovolatilización que refiere a la volatilización de contaminantes absorbidos y enviados al aire por la biomasa aérea mediante la transpiración. La eliminación de HC por este mecanismo es generalmente baja y la fitodegradación refiere a la metabolización del contaminante absorbido vía enzimática.

3.- Fitoestimulación: es inducción por parte de la planta en el suelo rizosférico para la proliferación de micoorganismos degradadores de HC. Las gramíneas por su capacidad de absorción y masa de raíces han mostrado estimular la remediación de suelos contaminados con HC. En un suelo arenoso de pH 4,5 contaminado con 162 mg/kg de pentaclorofenol (PCP, preservador de madera), la concentración de PCP ( $C_6Cl_5OH$ ) disminuyó luego de 64 días a 150 mg/kg por atenuación natural, a 90 mg/kg cuando fue fertilizado, pero donde además se cultivó *Lotium perenne* el PCP disminuyó a 65 mg/kg (Fig. 4) (Ferro *et al.*, 1997). Como no se detectaron valores significativos de PCP en tejido, el aumento de la tasa de degradación del PCP se adjudicó a la promoción de *L. perenne* sobre la actividad microbiana.

4.- Fitoestabilización: es la inmovilización y estabilización en el suelo de contaminantes por la combinación con exudados de raíz y reducir así su biodisponibilidad (Regnier *et al.*, 2009).

5.- Plantas transgénicas: pueden crearse para lograr una alta capacidad para fitorremediar suelos o aguas contaminadas. Además la capacidad de la plantas para degradar contaminantes puede ser mejorada transfiriendo genes desde otros organismos

(bacterias, hongos y plantas) que han demostrado tener potencial para degradar o mineralizar contaminantes (Gerhardt *et al.*, 2009).

6.- Fitorremediación con árboles: varias especies de árboles son utilizadas para remediar suelos, aguas y agua subterránea contaminados con HC, y puede ocupar a más de uno de los mecanismos antes mencionados. Las especies más usadas y donde más se ha experimentado han sido *Populus* spp y *Salix* spp, por su capacidad de rápido crecimiento y alta evapotranspiración del sistema. Widdowson *et al.* (2005) evaluaron la eficacia de un álamo híbrido para remediar PAHs en suelo y agua subterránea en un sitio contaminado con creosota. Al cabo de unos años observaron una reducción a la mitad de la pluma de contaminación y a partir del 3.<sup>er</sup> año una reducción de la concentración de PAHs (especialmente los de 3 anillos, acenaftileno y acenafteno), mientras que los PAHs de 4 anillos persistieron a mayor profundidad. Un estudio similar con álamo se realizó en una refinería donde el suelo y el agua subterránea fueron contaminados con HC en un sitio ocupado por tanques de almacenamiento (El-Gendy *et al.*, 2009). En este trabajo las concentraciones iniciales de benceno, tolueno, xileno y gasolina se redujeron en un 81, 90, 78 y 82 % en los horizontes más profundos y en 34, 84, 19 y 59 % en el agua subterránea con la presencia de álamo como cultivo fitorremediador.

## **Rehabilitación de suelos contaminados en Patagonia, problemas y posibilidades**

El suelo contaminado es fuente de contaminación para animales, vegetales y humanos, y su rehabilitación depende del efecto y del riesgo potencial que pueda tener sobre los seres vivos, pero además de la actividad a la que se pretenda destinarlo una vez que el suelo ha sido remediado. Los ecosistemas patagónicos en donde se realiza la actividad petrolera son frágiles, y pequeños disturbios generan grandes problemas que perduran en el tiempo. Existen leyes con niveles límites de múltiples contaminantes que regulan el uso agrícola, residencial e industrial (Ley Residuos Peligrosos 24.051). Los principales problemas luego de una contaminación con HC y que limitan las posibilidades de uso del suelo para actividades productivas luego de su saneamiento son las siguientes:



1.-Decapitación de horizontes: es un verdadero problema que tiene efectos desastrosos y casi permanentes. Fue una práctica bastante común en el pasado ante grandes derrames, pero por fortuna se ha tomado conciencia y cada vez más se trata de preservar el horizonte superficial (llamado horizonte vegetal en la jerga petrolera). La remoción de la capa superficial del suelo elimina rápidamente el suelo contaminado con HC y el sitio queda saneado, pero a la vez elimina la cobertura vegetal, la mayor parte de los nutrientes y microorganismos del suelo asociados a la fertilidad y también aquellos degradadores de HC. Además, aumenta el pH, la salinidad y la textura fina. El terreno se compacta y la retención de agua en el perfil disminuye, aumenta el escurrimiento superficial y el suelo se erosiona. Posteriormente, el perfil queda prácticamente inutilizado para muchas actividades productivas de manera irreversible (Luque *et al.*, 1996).

2.- Roturación del suelo: puede mejorar la aireación y la retención de agua del sitio contaminado y aumentar la tasa de degradación de HC, pero es recomendable hacerlo a la menor profundidad posible, especialmente en derrames de poco volumen, para posteriormente estimular el crecimiento vegetal que mejorará aún más la degradación de HC. Si el derrame fuera de alto volumen, y donde el HC ha penetrado en profundidad se podrá utilizar un cincel a mayor profundidad para mejorar la retención de agua, mezclar el petróleo con el horizonte superficial y aumentar así la degradación de HC (Nakamatsu *et al.*, 1996; Luque *et al.*, 1996). En caso de perfiles con horizonte superficial de escasa profundidad y la existencia de un subsuperficial salino es necesario evitar el uso de labores que mezclen horizontes y eleven la salinidad a la superficie, en esos casos el uso de cincel puede ser recomendable.

3.- Tamaño de la maquinaria utilizada: la maquinaria disponible en la actividad petrolera es muy distinta a la maquinaria agrícola. Se trata de maquinaria pesada que se intenta en muchos casos utilizarla en labores más finas que las acostumbradas en la actividad petrolera. Aparece entonces una restricción que limita las posibilidades de preservación del horizonte superficial y su posterior uso en actividades ecológica y económicamente más productivas. El uso adecuado de maquinaria agrícola en la recuperación de suelos empetroados indica que se pueden obtener resultados positivos para biorremediar suelos contaminados con HC (Luque *et al.*, 1996).

4.- Vegetación típica de suelos disturbados: luego de intervenido, arado, compactado o removido el suelo de sitios contaminados, aparece la colonización de especies típicas de áreas disturbadas y la desaparición de las especies nativas que limita una actividad productiva futura. Sin embargo, la presencia de plantas puede servir para mejorar directa o indirectamente la degradación de HC, aumentar la cobertura vegetal y prevenir erosión. En este sentido, es posible mejorar la cobertura vegetal mediante el

surcado del terreno a unos escasos centímetros de profundidad y de esta manera mejora la captación de semillas, retención de humedad y aumentar la cobertura vegetal (Mendoza *et al.*, 1998). Esta técnica resulta apropiada cuando se realiza el abandono de pozos donde el suelo de las locaciones queda sin vegetación, compactado y totalmente expuesto a erosión.

5.- Disminución de la capacidad amortiguadora: la contaminación luego de un derrame disminuye la dinámica y el intercambio de nutrientes entre el suelo, y la solución disminuye la porosidad y el suelo pierde calidad y la capacidad de preservar el ecosistema. La actividad productiva futura se verá limitada.

6.- Lenta o nula recolonización de la zona alterada: en los ecosistemas frágiles de la Patagonia, la recolonización del sistema es muy lenta y resulta prácticamente imposible acercarse a los niveles iniciales existentes antes de la contaminación.

7.- Estudios de impacto ambiental: se deben realizar estudios de impacto ambiental sustentables con el medioambiente de la zona y luego de la remediación, realizar propuestas compatibles con las leyes vigentes y también económicamente viables.

8.- Aspectos legales: en nuestro país existen leyes nacionales y provinciales que regulan la generación, manipulación, operación, tratamiento, transporte y disposición final de residuos. La Ley nacional 24.051 Residuos Peligrosos fue sancionada el 17/12/1991, pero se había aprobado con modificaciones en diputados el 27/9/1990. Origen de los diputados Luque y Alvarez Echague. La ley tiene 68 artículos. Esta ley se reglamentó por el decreto 831 del 23/4/1993, donde se definen niveles guía para la calidad de aire, agua y suelo de numerosos compuestos denominados "peligrosos", orgánicos como inorgánicos. En el caso de suelos, se definen niveles guía para uso agrícola, residencial e industrial. La Ley Hidrocarburos, 17.319, que entre otras cosas establece en su art. 69 la obligación de permisionarios y concesionarios a adoptar medidas para evitar daños en los terrenos con motivo de la perforación, conservación y abandono de pozos, desperdicios de HC, y perjuicios de todo tipo que ocasionen perjuicios a la actividad agropecuaria.

La Ley 22.428 Conservación de Suelos dictada para realizar actividades conservacionistas en la planificación de obras e instalación de industrias. Para nombrar una ley provincial, cabe mencionar a la Ley 55 de Tierra del Fuego, donde adhiere en su totalidad a Ley 24.051, pero agrega valores límites de descarga de contaminantes en: agua de mar (30 ppm HC totales), suelo (cero), cloacas y cursos de agua.

Dentro de los aspectos legales existen normas que son emitidas a modo de resoluciones por la Secretaría de Energía, estas resoluciones son muy importantes pues prácticamente regulan toda la actividad petrolera:

.- La Resolución 105/92 de la Secretaría de Energía del 11/11/1992 establece normas y procedimientos para proteger el medioambiente en las operaciones de exploración y explotación de HC, y exige estudios de impacto ambiental (EIA). Estas normas regulan las actividades de accesos a pozos y picadas, trazado de sísmicas, tendido de cañerías, manejo de desechos y fluidos de perforación, desechos de equipos y motores, almacenaje de combustible e HC, manejo de gases, agua salada, fluidos de terminación y fondos de tanques, entre otras cosas.

.- La Resolución 341/93 establece un cronograma y normas para el reacondicionamiento de piletas y restauración de suelo. Esta normativa refiere a los "piletones, piletas o bateas" contiguas al pozo de producción y establecía plazos (plazo final 31/12/1995) para su saneamiento y tapado según la característica y peligrosidad de la pileta.

.- La Resolución 5/95 normaliza el abandono de pozos.

.- La Resolución 342/93 establece normas para los planes de contingencia.

## **Interacción entre las partes involucradas**

La contaminación de suelos con HC involucra al menos a cinco partes:

1.- Gobiernos: nacional, provincial y municipal. Existe superposición de jurisdicciones y de leyes para aplicar, y de criterios para aplicarla. Normalmente, las provincias adhieren la ley nacional a la provincial y en algunos casos pueden agregar modificaciones. Las empresas normalmente se ajustan a la ley provincial. Sin embargo, en algunos casos, algunas municipalidades suelen exigir cumplimientos adicionales.

2.- Empresas contaminantes: necesitan medidas claras, concretas y factibles de realizar. Las medidas claras y concretas existen por leyes, normativas y resoluciones, sin embargo existe, a veces, una baja factibilidad para su cumplimiento. Las empresas buscan cumplir con las reglas, mejorar su imagen ante la comunidad, resolver los llamados pasivos ambientales y trabajar mancomunados con las autoridades gubernamentales. Son dependientes de sus políticas internas y del grado de compromiso con el medioambiente que varía ampliamente entre empresas. Una de las dificultades son los límites jurisdiccionales entre provincias para el transporte de contaminantes impedido por ley. Otro punto es la falta de laboratorios cercanos a los yacimientos en donde se puedan realizar análisis de contaminantes, tratar residuos peligrosos, para evitar el transporte interjurisdiccional. Reglas claras, concretas y factibles, pero persistentes en el tiempo que aseguren permanentes inversiones.

3.- Profesionales: se trata de una actividad multidisciplinaria: geólogos, químicos, microbiólogos, ingenieros agrónomos, técnicos de petróleo, profesionales ambientales, entre otros. No todas las empresas pueden acceder o acceden a todos los profesionales necesarios, de esta manera los trabajos de biorremediación sufren de limitaciones según el profesional que lo encare, la política de la empresa y los controles que puedan ejercer los Gobiernos involucrados. Sin embargo, actualmente existen empresas privadas que realizan trabajos de biorremediación y los trabajos son generalmente tercerizados por las empresas petroleras.

4.- Propietario: es el empresario o productor, superficiario en la jerga petrolera, al que se le ha contaminado el terreno y reclama por indemnizaciones debido al uso de su superficie, tránsito vehicular y lugares contaminados. Las indemnizaciones se pagan anualmente, y cuando la rentabilidad de su actividad es baja, estas indemnizaciones juegan un papel muy importante a modo de un "clásico subsidio agropecuario" que en muchos casos supera los niveles de rentabilidad de la propia actividad agropecuaria y resulta tentadora cuando se debe tomar la decisión de producir o recibir la indemnización.

5.- Comunidad animal y vegetal: es a la que se le debe dar respuestas concretas y protección contra la contaminación. Existen organizaciones políticas de 2.º y 3.º orden, ecologistas, académicas y científicas, que trabajan mucho por la prevención de la contaminación del aire, suelo y agua. Todas ellas han contribuido en gran medida al avance en los trabajos de biorremediación realizados en Argentina en los últimos 20 años.

Algunos problemas para la instrumentación de las normativas, reglamentaciones y leyes desde el punto de vista técnico-científico son las siguientes:

1.- Se definen valores totales de concentración de contaminante basados en estimaciones de riesgo, sin tener en cuenta la capacidad amortiguadora de los suelos para el contaminante en cuestión.

2.- Al definir concentración total, no se define la carga máxima de ese contaminante en el tiempo.

3.- El transporte de residuos peligrosos interjurisdiccional está prohibido por ley, mientras que no existen muchos laboratorios especializados y menos aún certificados, como para monitorear contaminación de los elementos mencionados en la ley.

4.- La definición de residuo peligroso es demasiado amplia.

5.- El efecto climático no está considerado de manera tal que una contaminación en Salta donde alcanza a llover 1000 o más mm anuales, pero concentrado en un corto período tiene igual tratamiento legal que la misma contaminación en Neuquén donde llueven 160 mm y distribuidos en todo el año.

## Bibliografía

BAUMAN, B.J. 1990. Soils contaminated by motor fuels: Research activities and perspectives of the American Petroleum Institute 1: 3-19. En: Kostercki, P.T.; Calabrese, E.J. (ed.). Petroleum contaminated soils. Lewis Publishers. Chelsea, Michigan. EUA.

BITESNIK, H. 1998. Sistema de recuperación de hidrocarburos en napa. 3.<sup>a</sup>. Jornadas de Preservación De Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas, 2: 93-106. Comodoro Rivadavia, Chubut.

BULMAN, T.L.; JANK, B.E. 1990. Environment Canada research on land treatment of petroleum wastes 3: 35-40. En: Kostecki, P.T.; Calabrese, E.J. (ed.). Petroleum contaminates soils. Lewis publishers Inc. Michigan. EUA. p. 423.

CHO, J.C.; KIM, S.J. 1997. Bioremediation of phenanthrene in soil microcosms. En: In situ and on site Bioremediation. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. BC Alleman and A Leeson (Eds), 2: 239-244.

DARDIS, E.; FENOGLIO, J.; BIELSA, R.; SABATINI, A.; MARCIANI, M. 2000. Estabilización y disposición final de sedimentos de fondo de tanque de almacenamiento de petróleo crudo. 4.<sup>a</sup> Jornadas de Preservación De Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas, 1: 261-280. Salta.

DE CABO, L.; SERAFINI, R.; ARREGHINI, S.; FABRIZIO DE IORIO, A. 2015. On-Site and Full-Scale Applications of Phytoremediation to Repair Aquatic Ecosystems with Metal Excess 3: 27-40. En: Ansar, A.A.; Singh Gill Ritu Gill, S.; Lanza, G.R.; Newman, L. (ed.). Phytoremediation. Management of Environmental Contaminants. ©Springer International Publishing Suiza. p. 366.

DE KRÄMER, U. 2010. Metal hyperaccumulation in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 61: 517-34.

DINEEN, D.; SLATER, J.P.; HICKS, P.; HOLLAND, J. 1990. En situ biological remediation of petroleum hydrocarbons in unsaturated soils 3: 177-187. En: Kostercki., P.T.; Calabrese, E.J. (ed.). Petroleum contaminated soils. Lewis publishers Inc. Michigan. EUA. p. 423.

EASCOTT, L.; SHIU, W.; MACKAY, D. 1989. Modeling Petroleum Products in Soils. En: Kostercki, P.; Calabrese, E. (ed.). Petroleum contaminated Soils. Lewis Publishers, Chelsea, MI. EUA. pp. 63-90.

EL JURY, P.; PERFETTI, G.; RODRIGUEZ, M.; RODRIGUEZ, S. 2000. Recuperación de Tierras por Soil Washing. 4.<sup>a</sup> Jornadas de Preservación De Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas, 1: 55-58. Salta.

EL-GENDY, A.S.; SVINGOS, S.; BRICE, D.; GARRETSON, J.H.; SCHNOOR, J.H. 2009. Assessments of the efficacy of a long-term application of a phytoremediation system using hybrid poplar trees at former oil tank farm sites. *Water Environ Res.* 81(5):486-98.

ERCOLI, R.; GÁLVEZ, J.; VIDELA, S.; CANTERO, J.; MEDAURA, C.; DI PAOLA, M.; CALLEJA, C.; VIDELA, C. 2000. Biorremediación de suelos por técnica de acumulación aireada. 4.<sup>a</sup> Jornadas de Preservación De Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas, 2: 279-286. Salta.

- FERRO, A.; KENNEDY, J.; KNIGHT, D. 1997. Greenhouse-scale evaluation of phytoremediation for soils contaminated with wood preservatives: Phytoremediation 3: 3009-314. En: Alleman, B.C.; Lesson, A. (ed.). In situ and on site bioremediation. Battelle, Publishing. Columbus, Ohio. EUA. p. 531..
- GERHARDT, K.E.; HUANG, X.D.; GLICK, B.R.; GREENBERG, B.M. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Sci* 176:20–30.
- HILLEL, D. 1989. Movements and retention of organic in soil: A review and a critique of modeling. 1: 81-86. En: Kostercki P.T.; Calabrese, E.J. (ed.). Petroleum contaminated soils. Lewis Publishers. Chelsea, Michigan. EUA. p. 357.
- KIRK, J.L.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. 2005. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environ Pollut.* 133: 455-65.
- LUQUE, J.; NAKAMATSU, V.; CIANO, N.; LISONI, C. 1996. Uso de maquinaria agrícola en la recuperación de suelos afectados por derrames de petróleo. 2.<sup>a</sup> Jornadas de Preservación De Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas. IAPG 449-461. Neuquén.
- LUQUE, J.; NAKAMATSU, V.; CIANO, N.; ANAR, M.I. LISONI, C. 2000. Monitoreo de la evolución de la biodegradación del petróleo en un derrame próximo a Caleta Olivia, Santa Cruz. 4.<sup>a</sup> Jornadas de Preservación De Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas, 1: 241-250. Salta.
- MAC CORMACK, W.P.; RUBERTO, L.A.M.; CURTOSI, A.; VODOPIVEZ, C.; PELLETIER, E. 2011. Human impacts in the Antarctic coastal zones: the case study of hydrocarbons contamination at Potter Cove, South Shetland Islands". En: Scott Coffen-Smout (ed.). Ocean Year Book. Brill/Martinus Nijhoff Publishers. Dalhousie University, Nueva Escocia. Vol 25, pp. 141-170.
- MARTÍNEZ ÁLVAREZ, L.M.; LO BALBO, A.; MAC CORMACK, W.P.; RUBERTO, L.A.M. 2015. Bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil: optimization of a biostimulation strategy using response-surface methodology (RSM). *Cold Region Science and Technology.* 119: 61-67.
- MASELLI, G.; ROSSO, M. 2000. Recuperación de fase libre sobrenadante (gasolina) en el Yacimiento Loma La Lata, Neuquén. 4.<sup>a</sup> Jornadas de Preservación De Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas, 2: 129-155. Salta.
- MAZZARINO, M.J.; HANG, S.; ARES, J. 1999. Contaminación de suelos por uso de residuos orgánicos y agroquímicos: ¿Cuál es nuestro nivel actual de conocimientos y que normas y actitudes deberíamos aplicar? Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo. Pucón, Chile.
- MENDOZA, R.E.; PAGANI, E.; Portal, R. 2001. Saneamiento de piletas con petróleo en Patagonia. *Gerencia Ambiental.* 76: 464.
- MENDOZA, RE. 1998. Hydrocarbons Leaching, Microbial Population and Plant yield in Soil Amended with Petroleum. *Bioremediation J.* 1(3): 223-231.
- MENDOZA, R.E.; CALDÍZ, D.; CASO, O.; VATER, G.; PORTAL, R. 1996. Empleo de residuos orgánicos de petróleo (ROP) en suelos agrícolas. 2 Efecto sobre la conservación de la humedad del suelo y la producción de tubérculos en papa. 2.<sup>a</sup> Jornadas de Preservación de

Agua, Aire y Suelos en la Industria Petrolera. 5-10 mayo 1996, San Martín de los Andes. Publicación del Instituto Argentino del Petróleo. 31-45.

MENDOZA, R.E.; GARCÍA, I.V.; DE CABO, L.; WEIGANDT, C.F.; FABRIZIO DE IORIO, A. 2015. The interaction of heavy metals and nutrients present in soil and native plants with arbuscular mycorrhizae on the riverside in the Matanza-Riachuelo River Basin (Argentina). *The Science of the Total Environment*. 505: 555-564.

MENDOZA, R.E.; MAC CORMACK, W.; PAGANI, E.; MARBAN, L.; RÍOS MERINO, L. 1998. Efecto del derrame de petróleo en suelo sobre la microflora degradadora de hidrocarburo, la vegetación y algunas propiedades químicas del suelo. 3.<sup>a</sup> Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas. Publicación del Instituto Argentino del Petróleo y del Gas. Tomo I, 105-125. Comodoro Rivadavia, 14-17 setiembre.

MENDOZA, R.E.; MAC CORMACK, W.; PAGANI, E.; MARBAN, L.; RÍOS MERINO, L. 2000. Contaminación de crudo: efecto sobre propiedades del suelo, la vegetación y la microflora degradadora de hidrocarburo. 4.<sup>a</sup> Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas. Publicación del Instituto Argentino del Petróleo y del Gas. Tomo II, 265-278. Salta, 3-6 octubre.

MENDOZA, R.E.; PORTAL, R. 2000. Landfarming of petroleum wastes in a cold dry climate of Tierra del Fuego. Effect on soil and vegetation. *Ciencia del Suelo*. 18: 36-43

MENDOZA, R.E.; TABOADA, M.A.; RODRIGUEZ, D.; CASO, O.; PORTAL, R. 1995. Use of oily waste organics as amendment to soils. En: Hinchee, R.; Kittel, J.; Reisinger, H. (ed.). *Applied bioremediation of petroleum hydrocarbons*. Battelle Press, Ohio. EUA. p. 543.

MIRANSARI, M. 2015. Phytoremediation Using Microbial Communities: I. En: *Phytoremediation. Management of Environmental Contaminants*, 2: 177-182.

MORENO ANDRADE, C.; GISMONDI, L.D. 2011. Ensayo de biorremediación asistida de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo en la Patagonia Sur de la Argentina. *Petrotecnica* 22-32 octubre.

NAKAMATSU, V.; CIANO, N.; LUQUE, J.; LISONI, C. 1996. Adaptación de especies nativas a suelos contaminados con hidrocarburos. 2.<sup>a</sup> Jornadas de Preservación De Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas. IAPG 613-622. Neuquén.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 1983. Evaluation of carcinogenic risk of chemical to humans-polycyclic aromatic compounds. Part I: Chemical, environmental data. Vol., 32. International Agency for Research Cancer. Lyons. Francia.

PAMUKCU, S.; HIJAZI, H.M.; FANG, Y. 1989. Study of possible reuse of stabilized petroleum contaminated soils as construction material 3: 203-214. En: Kostercki, P.T.; Calabrese, E.J. (ed.). *Petroleum contaminates soils*. Lewis publishers Inc. Michigan. EUA. p. 423.

POZZO ARDIZZI, G.; ALTAMIRANO, G.; BARBIERI, L.; SANCHEZ, A.; DÍAZ, G.; EUSEBI, C.; SOSA, A.; CAGLIARI, A. 2000. Rehabilitación por biorremediación asistida de un predio de vertido de aguas de producción en el Yacimiento Entre Lomas. 4.<sup>a</sup> Jornadas de Preservación De Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas, 1: 97-120. Salta.

- RATTO, S.; MARCECA, E.; MOSCATELLI, G.; ABBRUZESE, D.; BARDI, H.; BOSSI, M.; BRES, P.; CORDÓN, G.; DI NANO, M.P.; MURRINI, L.; POTARSKY, K.; WILLIAMS, F. 2004. Evaluación de la contaminación orgánica e inorgánica en un suelo aluvial de la costa del Riachuelo, Buenos Aires, Argentina *Ecología austral*, versión On-line ISSN 1667-782X, *Ecol. Austral* v.14 n.º 2. Córdoba.
- REGNIER, T.C.; KOUKAM, C.R.; LEONARD, C.M.; COMBRINK, S.; MOKGALAKA, N.S.; WEIERSBYE, I.M. 2009. Chemical analysis and potential use of the tree *Combretum erythrophyllum* grown on gold and uranium mine tailings seepage. En: Fourie A, Tibbett M (eds) *Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Conference on Mine Closure*, Perth, Australia.
- RUBERTO, L.A.M.; VAZQUEZ, S.C.; CURTOS, A.; MESTRE, M.C.; PELLETIER, E.; MAC CORMACK, W.P. 2006. Phenanthrene biodegradation in soils using an Antarctic bacterial consortium. *Bioremediation Journal* 10: 191-201.
- SARMA, H. 2011. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *J Environ Sci Technol* 4:118–138.
- SCHRODER, P.; SCHEER, C.E.; DIEKMANN, F.; STAMPFL, A. 2007. How plants cope with foreign compounds: translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*). *Environ Sci Pollut Res Int* 14:114–122.
- SIMS, J.T.; CUNNINGHAM, S.D.; SUMMER, M.E. 1995. Assessing soil quality for environmental purpose: Role and challenges for soil scientists. *J. Env. Qual.*, 26: 20-25. 1997. Soil Science Society of America: SSSA statement on soil quality. *Agr. News*, Madison, S. A.
- WANG, W.; GAO, J.; GUO, X., LI, W.; TIAN, X.; ZHANG, R. 2012. Long-term effects and performance of two-stage baffled surface flow constructed wetland treating polluted river. *Ecol Eng* 49:93–103.
- WIDDOWSON, M.A.; SHEARER, S.; RIKKE, G.; ANDERSEN, R.G.; NOVAK, J.T. 2005. Remediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Compounds in Groundwater Using Poplar Trees. The Charles E. Via Jr. Department of Civil and Environmental Engineering, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia 24061-0105. *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39 (6), pp 1598–1605.
- WILSON, S.C.; JONES, K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A Review. *Env. Poll.* 81: 229-249.



## CAPÍTULO 10

### **El papel de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en la fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos**

Rosalba Esquivel-Cote\*, Ronald Ferrera-Cerrato, Alejandro Alarcón

Área de Microbiología, Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Carretera México-  
Texcoco km 36.5. Montecillo, Estado de México, México. C.P. 56230.

E-mail: [rosesquivel\\_cote@hotmail.com](mailto:rosesquivel_cote@hotmail.com)

#### **Introducción**

La contaminación de suelo y agua por hidrocarburos derivados del petróleo (HDP) es un problema mundial (Fan *et al.*, 2008). La fitorremediación representa una de las mejores vías para limpiar o destoxificar (remediar) ecosistemas y agroecosistemas contaminados, y utilizar plantas capaces de transformar, degradar, remover o estabilizar HDP y otros contaminantes orgánicos e inorgánicos (Yavari *et al.*, 2015). Asimismo, la fitorremediación es asistida por microorganismos capaces de utilizar hidrocarburos como fuente de energía y carbono (hidrocarbonoclastas), y principalmente por microorganismos que coadyuvan al crecimiento de las plantas y a la capacidad remediadora de estas. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) emplean mecanismos directos e indirectos para favorecer la nutrición vegetal y evitar la incidencia y la severidad de fitopatógenos (Glick, 2012; Ahemad y Kibret, 2014). Algunas RPCV presentan capacidad hidrocarbonoclasta, lo cual incrementa la importancia de ser utilizadas como inoculantes para plantas fitorremediadoras dirigidas a la limpieza de suelos, sedimentos y agua contaminados con HDP.

Los estudios en biotecnología ambiental se han centrado en tecnologías viables y sostenibles para reducir o sustituir productos químicos en prácticas agrícolas y de remediación (Agnello *et al.*, 2015). Sin embargo, el conocimiento básico en este tema aún es limitado, pero el avance en estudios moleculares ayudará a esclarecer la expresión de genes catalíticos y promotores del crecimiento vegetal, así como comprender el impacto de los HDP en la diversidad de microorganismos no cultivables y en los mecanismos moleculares que sustentan la comunicación entre las RPCV y las plantas en los suelos contaminados, y que conllevan a un equilibrio ecológico

(Girlanda y Perotto, 2005). Este capítulo presenta los avances sobre el uso de RPCV como un potencial biotecnológico en la fitorremediación de suelos contaminados por HDP.

## Contaminación del suelo por hidrocarburos

El petróleo es la principal fuente energética no renovable en el mundo (De Juana Sardón, 2003). No obstante, el volumen de petróleo derramado accidentalmente por su extracción, la refinación y el transporte (Cuadro 1) han convertido a los ecosistemas acuáticos y terrestres en auténticos depósitos de contaminantes peligrosos para las plantas, para los microorganismos y para los humanos debido a las propiedades cancerígenas y mutagénicas de algunos HDP. A nivel global, esta situación resulta en una de las grandes preocupaciones de salud humana y ambiental (Fan *et al.*, 2008; Atlas y Hazen, 2011; Pereira, 2013).

En los ecosistemas terrestres, el petróleo cambia significativamente las características físicas, químicas y biológicas del suelo (Martínez y López, 2001). La relación carbono nitrógeno (C:N) se modifica porque la concentración de C se eleva y la de N disminuye, y el porcentaje de materia orgánica se reduce (Osuji y Nwoye, 2007). Las relaciones C:N son parámetros utilizados en la caracterización del N y sus relaciones

**Cuadro 1.** Principales derrames de petróleo en el mundo. La Jornada Ecológica (2010).

Año	País	Fuente	Cantidad de petróleo derramado	Ecosistema afectado
1910	Estados Unidos (Macondo)	Taponamiento de la plataforma Macondo	210 millones de galones de petróleo	Mar y costas del Golfo de México
1971	Estados Unidos (cien millas de cabo Hatteras)	Nafragio del barco petrolero Texaco Oklahoma	32900 toneladas de crudo	Mar
1976	Estados Unidos (Isla de Nantucket, Massachusetts)	Encallamiento del barco petrolero Argo Merchant	7,7 millones de galones de petróleo	29 millas náuticas de mar
1978	Bretaña	Encallamiento del Barco petrolero Amoco Cádiz	68,7 millones de galones de petróleo	Mar, 340 kilómetros de costa de Bretaña

1979	México (Bahía de Campeche)	Explosión del Pozo petrolero Ixtoc I	140 millones de galones de petróleo	Mar
1979	Estados Unidos (Galveston, Texas)	El choque del barco petrolero Burmah Agate contra el carguero Mimos	10,4 millones de galones de petróleo	Mar
1989	Alaska (Prince William Sound)	Encallamiento del barco petrolero Exxon Valdez	10,8 millones de galones de petróleo	el arrecife Bligh y costa no continua de Alaska
1990	Estados Unidos (Linden, Nueva Jersey)	Explosión del Barco petrolero <i>Cibro Savannah</i>	127 mil galones de petróleo	Mar
1990	Estados Unidos (Galveston, Texas)	Barco cisterna Megaborg	5,1 millones de galones de petróleo	
1990	Estados Unidos (Bay City, Michigan)	Explosión del Buque tanque Júpiter	No calculado	río Saginaw
1991	Kuwait	Destrucción de barcos petroleros, terminales petroleras y pozos de petróleo	900 millones de barriles de petróleo	Costas y suelo
1993	Estados Unidos (Tampa, Florida)	Choque entre la barcaza Bouchard 155, el carguero Balsa 37, y el barco Ocean 255	336 mil galones de fuel oil	bahía de Tampa
1994	Rusia (Komi)	Rompimiento de oleoducto	Entre 200,000 y 300,000 toneladas de petróleo	suelo
2009	Australia-Asia (Mar de Timor)	Rompimiento de oleoducto	450 toneladas de crudo	Mar
2010	Estados Unidos (Luisiana)	BP Deepwater Horizon	779 mil toneladas de crudo	Mar y costas del Golfo de México
2015	Estados Unidos (Santa Bárbara, California)	Rompimiento de oleoducto	400,000 litros de petróleo	Costas y mar de la bahía

con la materia orgánica del suelo en estudios de fertilidad. Los valores de las relaciones C:N varían entre 8 y 14 (Faassbender y Bornemisza, 1987); sin embargo,

en suelos contaminados con petróleo la relación es superior a 17:1, lo que origina una inmovilización de nutrientes. Asimismo, al aumentar la concentración de petróleo en el suelo, se elevan la temperatura, el contenido de humedad, y el porcentaje de  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{Mg}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , P; en tanto, la conductividad eléctrica, el pH y la concentración de  $\text{Al}^{+++}$ , y de  $\text{NO}_3^-$  y N total disminuyen, eventos que afectan la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Agbogidi *et al.*, 2007; Osuji y Nwoye, 2007). Adicionalmente, las propiedades hidrofóbicas de los HDP reducen la habilidad de las plantas y microorganismos para absorber agua y nutrientes del suelo (Nie *et al.*, 2011), provocando la pérdida de la fertilidad y afectando la actividad enzimática (por ejemplo, dehidrogenasas y ureasas), la germinación de semillas, el crecimiento vegetal y la productividad agrícola (Wyszkowska y Kucharski, 2000; Osuji y Nwoye, 2007).

Como ejemplo de los impactos negativos de los HDP, se tiene que una concentración superior al 0,1 % de petróleo en suelo afecta significativamente la germinación y la elongación de raíz en plántulas de maíz (*Zea mays*) y trigo (*Triticum aestivum*) (Tang *et al.*, 2011); disminución del contenido proteínico, lipídico y de humedad de semillas de maíz con respecto a semillas de plantas crecidas en suelos no contaminados (Agbogidi *et al.*, 2007). Además, la biomasa y la longitud de raíz de leguminosas tropicales como *Crotalaria incana* y *Leucaena leucocephala* son afectadas por la presencia de concentraciones altas de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Vázquez-Luna, 2015). Los HDP como el diésel y el aceite automotriz disminuyen el contenido foliar de nitrógeno, carbono y azufre, e incrementan el contenido de metales pesados en plantas de haba (*Vicia faba*) (Rusin *et al.*, 2015). Paradójicamente, el petróleo puede favorecer el crecimiento de otras especies vegetales como pastos de los géneros *Bromus* y *Galega*, cuya materia seca, el contenido de nitrógeno y la fijación biológica de nitrógeno son favorecidos (Yan *et al.*, 2015).

La presencia de hidrocarburos totales de petróleo en suelo tiene un impacto significativo en la población microbiana y la fauna de la rizosfera (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2013; García *et al.*, 2013; Trujillo-Narcia *et al.*, 2014). La rizosfera es la región del suelo que se encuentra bajo la influencia física y fisiológica de la raíz de las plantas (Walker *et al.*, 2003; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007), donde se encuentra la mayor cantidad de microorganismos debido a la abundancia y a la diversidad de fuentes de carbono y energía que son exudados por la raíz (Curl y Truelove, 1986; Dakora y Phillips, 2002). La adición de diésel y aceite (3000 ppm) incrementa la actividad biológica del suelo, de acuerdo con el índice de respiración edáfica (Castro-Mancilla *et al.*, 2013). En suelos contaminados con queroseno (2000 mg kg<sup>-1</sup>) se incrementa la población de bacterias totales, pero reduce la de hongos micorrízicos arbusculares respecto a suelos recuperados (García *et al.*, 2013); en particular, la presencia de

gasolina (15-30 g kg<sup>-1</sup>) afecta significativamente el número de bacterias y actinobacterias en el suelo (Ambrazaitiene *et al.*, 2013).

## **Microorganismos hidrocarbonoclastas**

Los microorganismos hidrocarbonoclastas (BHC) son capaces de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono y energía; este tipo de microorganismos incluye bacterias, hongos y algas (Warshawsky *et al.*, 1995; Hernández-Acosta *et al.*, 2003; Viñas *et al.*, 2005; Argumedo-Delira *et al.*, 2012; Cruz-Hernández *et al.*, 2013; Essien *et al.*, 2013; Dellagnezze *et al.*, 2014). La población de microorganismos hidrocarbonoclastas es la más afectada por la presencia de hidrocarburos derivados del petróleo, y varía dependiendo de la zona geográfica (Piehler *et al.*, 1999; Prantera *et al.*, 2002; Viñas *et al.*, 2005; Taketani *et al.*, 2009; Castro-Mancilla *et al.*, 2013). En sedimentos de manglares, existe una correlación positiva ( $r=0,60$ ) entre la cantidad de hidrocarburos totales y la población de bacterias BHC (Essien *et al.*, 2013), en tanto que, en suelos alpinos esta tendencia no se presenta (Margesin *et al.*, 2003). Las BHC están involucradas en la transformación parcial o bien, en la mineralización total de hidrocarburos contaminantes, por tanto, son una herramienta indispensable en la biorremediación de suelos contaminados con petróleo.

## **Estrategias de biorremediación-fitorremediación**

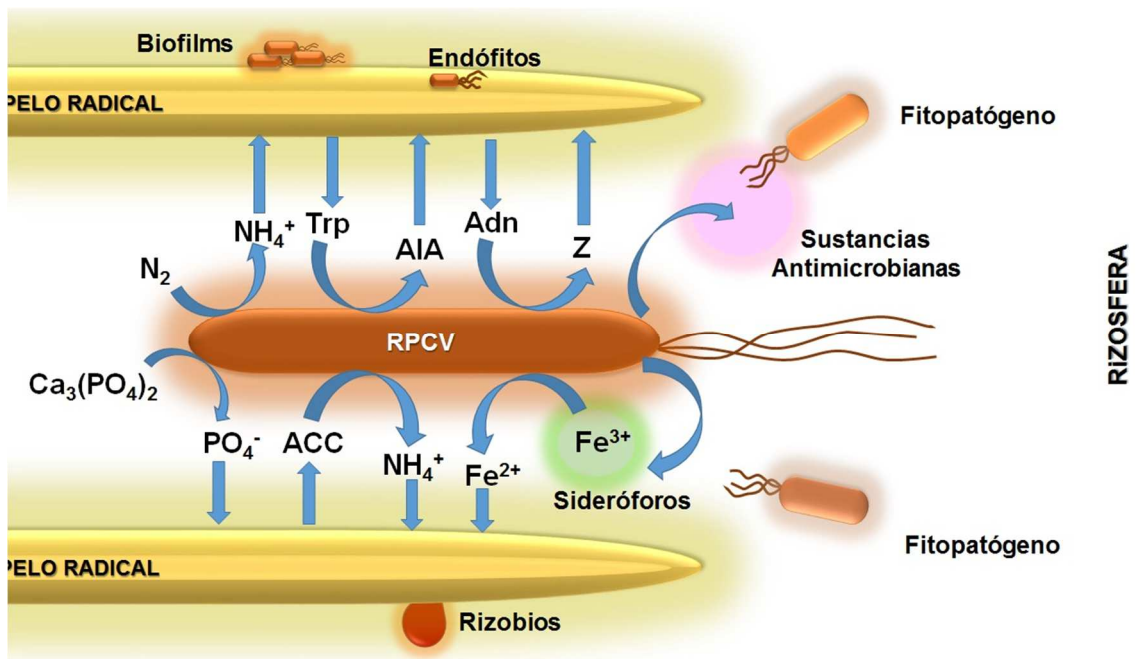
La biorremediación representa una biotecnología que emplea métodos biológicos para reducir el riesgo ambiental provocado por agentes contaminantes orgánicos e inorgánicos altamente peligrosos en sistemas acuáticos y terrestres. El uso de recursos naturales del propio sitio como plantas, lombrices de tierra, bacterias, hongos, algas o bien, la aplicación de enzimas, ha logrado remediar zonas contaminadas con hidrocarburos reduciendo los costos y el impacto ecológico que conllevaría el empleo de métodos mecánicos, físicos y químicos que son costosos (Warshawsky *et al.*, 1995; Ferrera-Cerrato, 2000; Andrea, 2010; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2013; Pereira, 2013; Martínez-Rabelo *et al.*, 2015).

La fitorremediación es una técnica que consiste en utilizar plantas superiores (herbáceas, arbustivas, arbóreas) para destoxificar, transformar, disipar, oxidar, mineralizar y degradar contaminantes orgánicos; así como para remover y acumular

contaminantes inorgánicos en grandes extensiones de suelo y agua contaminada (Yavari *et al.*, 2015). Los pastos son las especies vegetales más sugeridas como plantas eficientes para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos debido a que poseen un sistema radical fibroso, el cual abarca una amplia área de superficie por unidad de volumen de suelo, y que prolifera cerca de la superficie donde se localiza la mayor concentración de HDP (Joner y Leyval, 2003; Lee *et al.*, 2008). Las plantas pueden absorber y acumular contaminantes orgánicos en sus raíces, tallos y hojas (Tesar *et al.*, 2002; Yousaf *et al.*, 2010), y son capaces de eliminarlos a través de procesos tales como la biodegradación, fitovolatilización, acumulación y transformación metabólica (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2013; Yavari *et al.*, 2015). No obstante, la habilidad fitorremediadora de las plantas para disminuir la concentración de hidrocarburos no está relacionada directamente con sus características para crecer y adaptarse a las condiciones de contaminación, sino que dependen de la interacción entre la planta y los microorganismos simbiotes o de vida libre que cohabitan su rizosfera, y que en conjunto tienen un papel crucial en la eficiencia de la fitorremediación (Joner y Leyval, 2003; Lee *et al.*, 2008; Bento *et al.*, 2012), de igual forma, las bacterias con capacidad para promover el crecimiento vegetal pueden tener un efecto significativo durante el proceso de fitorremediación (Zhuang *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2013; Naveed *et al.*, 2014).

### **Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV)**

Las rizobacterias son bacterias que se localizan o se aíslan de la rizosfera (Kloepper *et al.*, 1991), y representan una amplia variedad de géneros que crecen en asociación con su planta hospedante. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV o PGPR, por sus siglas en inglés) (Kloepper y Schroth, 1978; Suslow *et al.*, 1979) benefician la fisiología, morfología y desarrollo de las plantas mediante mecanismos de acción directos o indirectos (Figura 1) (Glick, 2012; Ahemad y Kibret, 2014).



**Figura 1.** Representación esquemática de los principales mecanismos de acción empleados por rizobacterias para promover el crecimiento vegetal (ver el texto). Trp, triptófano; AIA, ácido indol-3-acético; Adn, adenina, Z, zeatina (citocinina); ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico;  $N_2$ , nitrógeno molecular;  $NH_4^+$ , ion amonio;  $Ca_3(PO_4)_2$ , fosfato tricálcico;  $PO_4^-$ , ion fosfato;  $Fe^{3+}$ , ion férrico;  $Fe^{2+}$ , ion ferroso.

## Mecanismos directos

Estos mecanismos son aquellos involucrados en la nutrición vegetal, donde los microorganismos transforman macroelementos (en formas químicas complejas no disponibles para las plantas) a formas más sencillas, quedando disponibles en la solución del suelo rizosférico para que puedan ser absorbidos y asimilados por la planta. De los mecanismos directos más estudiados y relevantes involucrados en la nutrición vegetal son la fijación de nitrógeno, la solubilización de fósforo, la producción de fitohormonas, de sideróforos y la síntesis de la enzima ACC desaminasa (Glick, 2012; Ahemad y Kibret, 2014).

### Fijación de nitrógeno

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para el crecimiento vegetal (Marschner, 1995). Las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (BFNA) o diazotróficas tienen la habilidad de convertir el nitrógeno molecular ( $N_2$ ) a amonio ( $NH_4^+$ ) que representa la forma nitrogenada asimilable para las plantas. Gracias a su ventaja competitiva de

sobrevivir en ambientes ricos en carbono y pobres en nitrógeno, estas bacterias pueden proliferar selectivamente en la rizósfera (Döbereiner y Pedrosa, 1987). *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium* son algunos de los géneros diazotróficos asociados simbióticamente con leguminosas con alta especificidad hacia sus hospedantes. Géneros como *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Paenibacillus* y *Pseudomonas* son los grupos bacteriano diazotróficos de vida libre mejor caracterizados y relacionados con otras especies vegetales (Dobbelaere *et al.*, 2003).

### **Solubilización de fósforo**

El fósforo (P) es otro de los macronutrientes limitantes para las plantas. Mucho del fósforo del suelo se encuentra en compuestos insolubles, como el fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), no disponible para las plantas (Marschner, 1995). Varios microorganismos del suelo, como bacterias y hongos, son capaces de producir ácidos orgánicos e inorgánicos, y solubilizar los compuestos no solubles de fósforo a compuestos solubles como los ortofosfatos ( $\text{PO}_4^-$ ), dejando el P disponible para ser absorbido por las plantas (Rodríguez y Fraga, 1999; Richardson, 2001). Varios géneros bacterianos han sido reportados como solubilizadores de fósforo, como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Flavobacterium*, *Erwinia* y *Brevibacillus* (Rodríguez y Fraga, 1999; Ndung'u-Magiroy *et al.*, 2012).

### **Producción de fitohormonas**

Uno de los mecanismos más estudiados y reconocidos para promover el crecimiento vegetal por parte de las rizobacterias es la producción de fitohormonas o fitoreguladores, sustancias orgánicas que tienen una influencia directa en los procesos fisiológicos de las plantas y actúan a muy bajas concentraciones (Nickell, 1982). Cinco tipos de fitohormonas son las más estudiadas en microorganismos debido a la importancia que tienen en el desarrollo vegetal: auxinas (estimulan el crecimiento de la raíz, raíces adventicias y formación de nódulos); giberelinas (relacionadas con la elongación celular de tallos); citocininas como la zeatina (Z, regulan la división celular, diferenciación de tejidos, fotosíntesis, formación de flores y senescencia, y se sintetizan a partir de adenina, Adn); ácido abscísico (relacionado con el estado de maduración vegetal, abscisión de hojas y frutos, y la formación de nódulos en raíz); y



etileno (involucrado en la germinación y el proceso de senescencia vegetal, y producido como respuesta ante el estrés biótico y abiótico) (Wang e Irving, 2011). En la interacción planta-microorganismo, las bacterias son el grupo microbiano más estudiado en la producción de auxinas como el ácido indol acético (AIA), el cual se sintetiza a partir del triptófano (Trp) (Costacurta y Vanderleyden, 1995; Patten y Glick, 1996; Arshad y Frankenberger Jr, 1997). *Azospirillum*, *Azotobacter* (diazótrofos de vida libre), *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* (diazótrofos simbióticos) son de las bacterias mejor caracterizadas como RPCV con capacidad para producir AIA (Arshad y Frankenberger Jr, 1997). Un mismo género es capaz de producir uno o más tipos de fitohormonas como *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Xanthomonas*, *Herbaspirillum*, (Costacurta y Vanderleyden, 1995).

### **Producción de sideróforos**

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la Tierra (Marschner, 1995). El ion férrico ( $Fe^{+3}$ ) es la forma predominante en el suelo, pero es la menos disponible para plantas y microorganismos. Los organismos requieren altas concentraciones de hierro para llevar a cabo sus funciones vitales, por tanto, plantas, bacterias y hongos compiten constantemente en la rizosfera para obtener este recurso. Para sobrevivir a tales condiciones, algunas bacterias han desarrollado la capacidad de producir sustancias de bajo peso molecular con una elevada afinidad por el ion férrico, llamadas sideróforos. Las bacterias producen sideróforos para secuestrar o quelar el ion férrico, el cual transportan al interior de la célula, donde el hierro es liberado por hidrólisis del sideróforo o por reducción de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , y así poder ser asimilado por la planta y contribuir en su crecimiento (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003; Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). Se han identificado varios tipos de sideróforos: catecolatos (enterobactina), hidroxamatos (ferricromo, ferrioxamina, desferricromo), dihidroxamatos (rhizobactin), trihidroxamatos (vivibactin), pyoverdinas (pesudobactin), cepabactim, pyochelin. Bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella typhumurium*, *Pseudomonas*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus megaterium*, *Streptomyces tendae*, *Mycobacterium*, *Nocardia* han sido bien caracterizados por su capacidad para producir sideróforos (Carson *et al.*, 2000; Faraldo-Gómez y Sansom, 2003; Schalk *et al.*, 2011).

## Síntesis de la enzima ACC desaminasa

El ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) es la molécula previa a la formación de etileno en plantas sometidas a estrés ambiental (heladas, sequía, inundaciones, salinidad, ataque de fitopatógenos y contaminación). El etileno generado en altas concentraciones provoca la senescencia y muerte prematura de las plantas (Abeles *et al.*, 1992; Des-Marais y Juenger, 2010). Con respecto a esto, algunas rizobacterias promueven el crecimiento vegetal mediante la disminución de los niveles de etileno en plantas a través de la acción de la enzima ACC desaminasa, la cual transforma el ACC en  $\alpha$ -cetobutirato (metabolito secundario) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), evitando la sobreproducción de etileno (Glick *et al.*, 1998). Este mecanismo también resulta una fuente de N para plantas y microorganismos en la rizosfera. La enzima ACC desaminasa ha sido identificada principalmente en géneros bacterianos como *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhizobium*, *Streptomyces*, *Variovorax*, entre otras (Belimov *et al.*, 2001; Ghosh *et al.*, 2003; Belimov *et al.*, 2005; Blaha *et al.*, 2006; Madhaiyan *et al.*, 2006; El-Tarabily, 2008; Sgroy *et al.*, 2009; Esquivel-Cote *et al.*, 2010).

## Mecanismos indirectos

Los mecanismos indirectos están principalmente relacionados con la inhibición y la reducción (biocontrol) de los efectos provocados por el ataque de fitopatógenos. La inhibición ocurre vía antagonismo local contra patógenos del suelo o mediante la inducción de resistencia sistémica en la planta. Las rizobacterias antagonistas promueven el crecimiento vegetal evitando la colonización y el ataque de patógenos ya sea: a) sintetizando enzimas hidrolíticas (quitinasas, glucanasas, proteasas, lipasas) capaces de lisar las células de hongos (*Phyitium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Clavibacter michiganensis*) o bacterias fitopatógenas (*Erwinia amylovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*); b) compitiendo por nutrientes, nichos ecológicos y sitios de colonización sobre la superficie de la raíz; c) regulando los niveles de etileno, que se produce por el estrés causado por la infección parasítica, a través de la síntesis de la enzima ACC desaminasa; y d) mediante la producción de sustancias antimicrobianas como sideróforos y antibióticos de amplio espectro (Beneduzi *et al.*, 2012; Glick, 2012; Ahemad y Kibret, 2014). La producción de sideróforos es considerada un mecanismo

indirecto, además de ser un mecanismo relacionado con la nutrición vegetal, debido a que al secuestrar el  $\text{Fe}^{+3}$  presente en el suelo, no queda disponible para microorganismos patógenos, los cuales finalmente mueren de inanición (Schalk *et al.*, 2011). Otras rizobacterias no patógenas inducen una resistencia física en las plantas, llamada Resistencia Sistémica Inducida (Beneduzi *et al.*, 2012; Glick, 2012; Ahemad y Kibret, 2014).

## **Efecto de los hidrocarburos en la actividad de RPCV**

Un mismo microorganismo puede mostrar diferentes mecanismos, que se expresan independiente o simultáneamente, de acuerdo con las condiciones ambientales y de crecimiento de la planta (Bashan y Levanony, 1990). Asimismo, las bacterias rizosféricas que presentan uno o más mecanismos de acción para promover el crecimiento vegetal, son altamente competitivas con la microbiota que prolifera en ambientes contaminados con petróleo (Denaro *et al.*, 2014), como es el caso de las proteobacterias y actinobacterias que son frecuentes en suelos contaminados con petróleo (Sun *et al.*, 2015). Además, se ha comprobado que la capacidad biodegradadora de RPCV-BHC es incrementada cuando actúan en sinergismo con otros microorganismos promotores del crecimiento vegetal, como los hongos micorrízicos arbusculares (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2013; Dong *et al.*, 2014; Xun *et al.*, 2015). La fijación de nitrógeno y la síntesis de la enzima ACC desaminasa son dos de los mecanismos de acción más estudiado en BHC en los últimos años, en condiciones de contaminación orgánica (hidrocarburos) e inorgánica (metales pesados) (Cuadro 2).

## **Efecto en la fijación de nitrógeno**

Uno de los grupos de RPCV-BHC más importantes en la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo son BFNA, capaces de convertir el nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ) a amonio y nitrato ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) (Piehler *et al.*, 1999; Pérez-Vargas *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2004a; Hernández *et al.*, 2004c; Musat *et al.*, 2006; Taketani *et al.*, 2009; Pérez-Vargas y García-Esquivel, 2013; Dashti *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2015). El proceso es una fuente importante de N en suelos contaminados con HDP. La población de diazótrofos en suelos contaminados con petróleo puede fluctuar en  $10^8$

UFC g suelo<sup>-1</sup> (Sorkhoh *et al.*, 2010), y en suelos contaminados con gasolina de 10<sup>4</sup> UFC g suelo<sup>-1</sup> (Prantera *et al.*, 2002), esta abundancia de diazótrofos en suelos contaminados con HDP ha permitido suponer que un número alto de BHC son BFNA (Piehler *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2004a; Hernández *et al.*, 2004c; Pérez-Vargas y García-Esquivel, 2013; Dashti *et al.*, 2015). La presencia de hidrocarburos en el suelo incrementa el tamaño de la población diazotrófica, pero disminuye su diversidad (Piehler *et al.*, 1999; Prantera *et al.*, 2002; Rivera-Cruz *et al.*, 2002; Saul *et al.*, 2005; Taketani *et al.*, 2009; Vázquez-Luna *et al.*, 2011). Por un lado, la fijación de nitrógeno raramente es observada en ambientes contaminados por el derrame de petróleo, frecuentemente limitados por N (Piehler *et al.*, 1999; Eckford *et al.*, 2002; Prantera *et al.*, 2002; Musat *et al.*, 2006). No obstante, se ha identificado el gen *nifH* en bacterias y en suelos contaminados con petróleo (Lima do Carmo *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha reportado que el petróleo favorece la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico de algunos rizobios asociados a sus leguminosas en suelos boreales contaminados con petróleo (Yan *et al.*, 2015). Existen estudios que concluyen que el petróleo podría ser una fuente importante de N, vía la fijación biológica de nitrógeno atmosférico para suelos pobres en este macroelemento (Musat *et al.*, 2006; Taketani *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2015).

## **Efecto en la síntesis de la enzima ACC desaminasa**

La contaminación del suelo por hidrocarburos es causa de estrés y, por tanto, del incremento de etileno en las plantas presentes, tal cual ocurre con aquellas especies utilizadas en la fitorremediación. Las bacterias que sintetizan la enzima ACC desaminasa ayudan a las plantas a reducir el efecto deletéreo de la sobreproducción de etileno. Se ha demostrado que el empleo de bacterias-ACC desaminasa promueve el crecimiento vegetal e incrementa el efecto fitorremediador de las plantas en suelos contaminados con hidrocarburos (Arshad *et al.*, 2007; Glick *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2011; Naveed *et al.*, 2014; Pawlik y Seget, 2015), en los que se ha detectado el gen *acdS*, responsable de la síntesis de esta proteína catalítica (Pawlik y Seget, 2015). El estudio de este mecanismo de acción ha sido de gran relevancia entre los biotecnólogos enfocados a la investigación de la biorremediación.

## Efecto en otros mecanismos

Los estudios referentes al estudio del efecto del petróleo en la expresión de otros mecanismos de acción para promover el crecimiento vegetal son pocos. Al respecto, se ha documentado que la presencia de hidrocarburos en el suelo rizosférico no afecta la producción de ácido indol acético (auxinas) en RPCV hidrocarbonoclastas (Huang *et al.*, 2004; Muratova *et al.*, 2005; Bisht *et al.*, 2014; Das y Tiwari, 2014; Liu *et al.*, 2014; Pawlik y Seget, 2015; Xun *et al.*, 2015).

**Cuadro 2.** Ejemplos de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal con capacidad hidrocarbonoclasta.

Bacteria	Mecanismo promotor del crecimiento vegetal*	Tipo de hidrocarburo	Porcentaje de contaminante biodegradado	Referencia
<i>Agrobacterium</i> , <i>Alcaligenes</i>	BFNA	Benceno, tolueno y xileno	50, 50, 95; 64,91, 83	Prantera <i>et al.</i> , 2002
<i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Azospirillum brasilense</i>	BFNA	Petróleo	ND <sup>1</sup>	Eckford <i>et al.</i> , 2002; Galazka <i>et al.</i> , 2012
<i>Marinobacter sedimentarum</i> , <i>Marinobacter flavimaris</i>	BFNA	Petróleo crudo	76-90; 71	Al-Maillem <i>et al.</i> , 2013
<i>Azospirillum brasilense</i>	BFNA, AIA	Policíclicos aromáticos		Huang <i>et al.</i> , 2004
<i>Azospirillum lipoferum</i>	BFNA, AIA	Petróleo crudo		Muratova <i>et al.</i> , 2005
<i>Bacillus polymixa</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Clostridium pasteurianum</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BFNA	Petróleo crudo	ND <sup>2</sup>	John <i>et al.</i> , 2011
<i>Gordonia</i> sp.	ACCd, Sd	Diésel	ND <sup>3</sup>	Hong <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas</i> sp.	BFNA, AIA, SF, ACCd, Sd	Hidrocarburos totales	39,22	Lima do Carmo <i>et al.</i> , 2011
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	ACCd	Diésel	24,4-49,7	Afzal <i>et al.</i> , 2013
<i>Serratia marcescens</i>	ACCd	Petróleo	>50	Dong <i>et al.</i> ,

				2014
<i>Planomicrobium chinense</i>	AIA, SF	Diésel	2,5	Das y Tiwari, 2014
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	Sd	Hidrocarburos alifáticos y tetradecanos	39-48	Denaro <i>et al.</i> , 2014
<i>Bacillus</i> sp.	BFNA, AIA, SF, ACCd, Sd, AHF	Antraceno, naftaleno	83,4, 75,1	Bisht <i>et al.</i> , 2014
<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pantoea</i> sp., <i>Burkholderia</i> sp.	ACCd	n-Alcanos	20-40	Tara <i>et al.</i> , 2014
<i>Klebsiella</i> sp.	AIA, SF, ACCd, Sd	Petróleo	ND <sup>4</sup>	Liu <i>et al.</i> , 2014
<i>Agrobacterium</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Nesiotobacter</i> , <i>Nitratireductor</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Diatzia</i> , <i>Mycobacterium</i> ,	BFNA	Petróleo crudo	ND <sup>5</sup>	Dashti <i>et al.</i> , 2015
<i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Pantoea</i>	AIA, SF, ACCd, Sd	Petróleo	ND <sup>6</sup>	Pawlik y Seget, 2015
<i>Acinetobacter</i> sp.	AIA, SF, ACCd	Petróleo	37,14	Xun <i>et al.</i> , 2015

En suelos contaminados con petróleo se ha detectado la presencia de bacterias solubilizadoras de fósforo inorgánico (Lima do Carmo *et al.*, 2011; Das y Tiwari, 2014; Bisht *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Naveed *et al.*, 2014; Pawlik y Seget, 2015; Xun *et al.*, 2015). En tanto, se ha reportado que la presencia de hidrocarburos no afecta la capacidad de producir sideróforos por RPCV (Hong *et al.*, 2011; Bisht *et al.*, 2014; Denaro *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Naveed *et al.*, 2014; Pawlik y Seget, 2015), incluso se ha concluido que la capacidad de producir sideróforos se incrementa si la bacteria se encuentra en suelos contaminados con hidrocarburos deficientes en Fe (Staijen *et al.*, 1999; Naveed *et al.*, 2014). Respecto a bacterias antagónicas, Lima do Carmo *et al.* (2011) reportaron la presencia de bacterias antagonistas hidrocarbonoclastas en suelo rizosférico de manglares contaminados con petróleo.

## **Efecto de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en la actividad enzimática de plantas y en el suelo rizosférico**

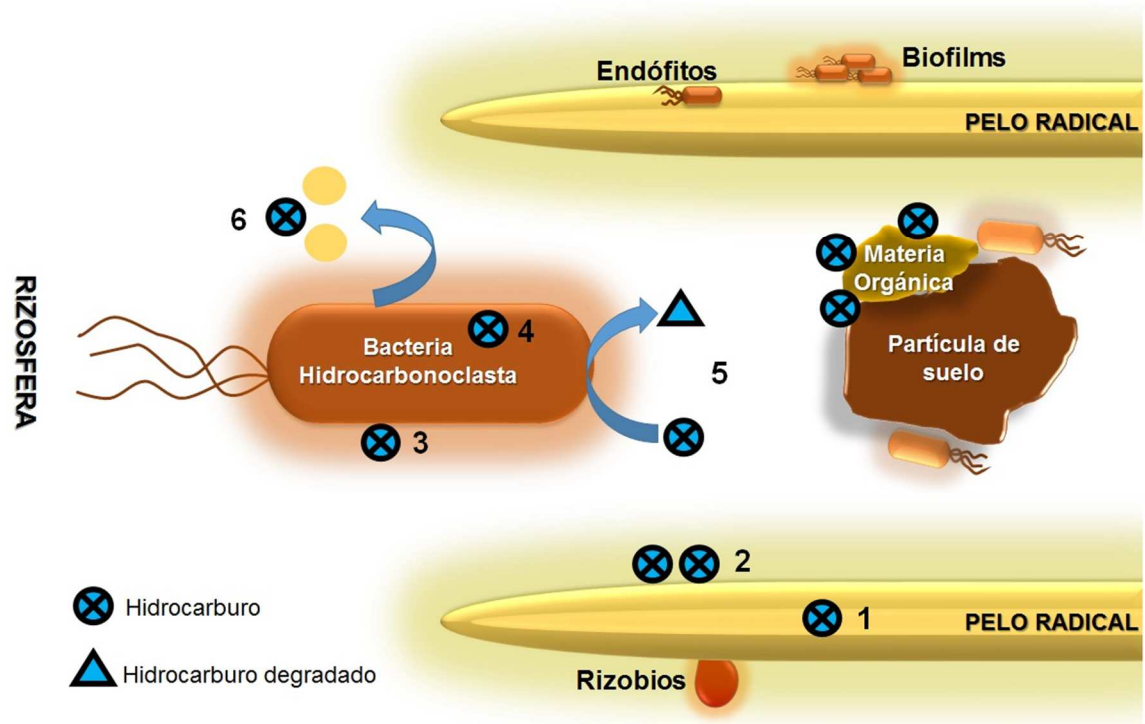
Por un lado, las enzimas del suelo reflejan el estatus de fertilidad y de transformación de nutrientes en el suelo (Dong *et al.*, 2014). La presencia de petróleo se puede correlacionar negativamente con la actividad enzimática de deshidrogenasas y ureasas en suelo (Wyszkowska y Kucharski, 2000). No obstante, en suelos contaminados con petróleo (2000 a 25000 mg kg<sup>-1</sup>), la actividad de la ureasa no es alterada; sin embargo, con 7500 mg petróleo kg suelo<sup>-1</sup>, la actividad dehidrogenasa es inhibida (Wu *et al.*, 2014). Similarmente, la actividad deshidrogenasa y fosfatasa es reducida por la presencia de queroseno en concentraciones altas, correlacionando con la disminución de la misma población de microorganismos en el suelo (Alrumman *et al.*, 2015). Por otro lado, Wiszkowska *et al.* (2006) reportaron que la actividad de ureasas, deshidrogenasas y fosfatasas alcalinas es estimulada por la presencia de diésel en el suelo, en tanto que la actividad de fosfatasas ácidas es estimulada al inicio de la contaminación y afectada a través del tiempo. La actividad enzimática se incrementa con la presencia de microorganismos en suelos contaminados con hidrocarburos; por ejemplo, la actividad de la ureasa y la hidrogenasa aumenta con la inoculación de *Serratia marcescens* y hongos micorrízicos (Dong *et al.*, 2014). Por un lado, otras investigaciones reportan que la introducción de bacterias del género *Gordonia sp.* incrementa la actividad de enzimas deshidrogenasas en suelos contaminados con diésel (Hong *et al.*, 2011). Por otro lado, mediante la detección de los genes *alkB* (hidroxilasa de alcanos) y *nah* (dioxigenasa de naftaleno) se estimó que la población de bacterias degradadoras de hidrocarburos incrementa (alcanos y poliaromáticos, 0,5% y 0,1% a 4% y 2%, respectivamente) respecto a la concentración de bacterias totales en suelo (Wu *et al.*, 2014). En plantas de avena (*Avena sativa*) crecidas en suelos contaminados con petróleo, se ha reportado que la inoculación con microorganismos promotores del crecimiento vegetal incrementa la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y peroxidasa en hojas, lo cual alivia los efectos adversos producidos por la presencia del contaminante en las plantas (Dong *et al.*, 2014).

## **Mecanismos de las BHC-RPCV para degradar hidrocarburos**

El petróleo crudo es una mezcla de hidrocarburos lineales y cadenas ramificadas de alcanos, cicloalcanos y aromáticos como constituyentes dominantes, y también

contiene pequeñas cantidades de compuestos de N, oxígeno (O) y azufre (S) (Fan *et al.*, 2008). Algunos componentes, principalmente los hidrocarburos policíclicos aromáticos son muy tóxicos (Alexander, 1994; Atlas y Hazen, 2011), cuya degradación es una de las principales funciones de los microorganismos del suelo en lugares contaminados con petróleo (Khan *et al.*, 2013; Dashti *et al.*, 2015). La degradación de hidrocarburos es un proceso natural en todos los ecosistemas, sin embargo, factores como materia orgánica, pH del suelo, tipo y disponibilidad del contaminante, disponibilidad y presencia de microorganismos degradadores de hidrocarburos están entre las variables más importantes asociadas con los procesos de biorremediación (Alexander, 1994; Alrumman *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2015). Las BHC cuentan con varios mecanismos para transformar las cadenas que forman a los HDP (Figura 2). Por ejemplo, las bacterias con alta hidrofobicidad, actividad emulsificante, reductoras de la tensión superficial, productoras de biosurfactantes y con alta capacidad de utilizar un amplio rango de hidrocarburos como fuente carbono y energía en suelo en combinación con su habilidad para expresar genes catalíticos para dicha actividad (Lin *et al.*, 2009; Dindar *et al.*, 2013). La adición de microorganismos alóctonos con alta capacidad degradadora de hidrocarburos (bioaumentación) es una de las prácticas más importantes en biorremediación (Quiao *et al.*, 2014; Fodelianakis *et al.*, 2015). De igual manera, la actividad enzimática y la estructura de la comunidad microbiana del suelo son dos de las razones por las cuales se evalúan los microorganismos del suelo y sus funciones biológicas para favorecer la descontaminación de suelos por hidrocarburos (Wu *et al.*, 2014).





**Figura 2.** Representación esquemática de los principales mecanismos de plantas y bacterias hidrocbonoclastas para acumular o biodegradar hidrocarburos derivados del petróleo. 1, fitoacumulación; 2, fitoestabilización; 3, biosorción; 4, bioacumulación; 5, biotransformación (mineralización); 6, producción de biosurfactantes.

## Biosurfactantes

Son sustancias orgánicas que contienen una porción hidrofóbica y una hidrofílica que le proporciona la habilidad de actuar en la interfase de diferentes compuestos. *Pseudomonas aeruginosa* ha sido reportada como una bacteria con alto potencial en la producción de biosurfactantes, principalmente ramnolípidos, y es capaz de biodegradar el 86,7 % de los compuestos saturados y el 39,5 % de compuestos aromáticos, a partir de desechos aceitosos generados de la industria petrolera (Cerqueira *et al.*, 2011). Las bacterias del género *Acinetobacter* producen una sustancia con características a los biosurfactantes que utiliza para degradar varios hidrocarburos como el diésel (Gallego *et al.*, 2001).

## Enzimas catabólicas

Muchas BHC están equipadas con maquinarias metabólicas para usar el petróleo como fuente de carbono y energía a través de vías aeróbicas y anaeróbicas. Por ejemplo, algunos microorganismos poseen sistemas enzimáticos del tipo oxigenasas e hidroxilasas que oxidan hidrocarburos alifáticos y aromáticos mediante el rompimiento de enlaces C-C en las posiciones orto y meta (Hesham *et al.*, 2014; Naveed *et al.*, 2014; M'rassi *et al.*, 2015). La oxidación y la hidroxilación de hidrocarburos están reguladas por genes *alk*, los cuales han sido detectados en todas las bacterias y clones metagenómicos de un mesocosmos contaminado con petróleo crudo (Dellagnneze *et al.*, 2014) (Cuadro 3).

## Situación de los suelos contaminados con hidrocarburos en el trópico de México

La actividad petrolera en México inició durante la década de 1940, centrándose en la región tropical sureste. Tabasco y Veracruz son de los estados con mayor problema de contaminación de suelo y agua por derrame de HDP, originados principalmente por el desbordamiento de las fosas de los pozos petroleros, transporte y por la toma clandestina del combustible directamente de los oleoductos, lo cual ha repercutido negativa y significativamente en los agroecosistemas de estas regiones (Schroeder *et al.*, 1999; Zavala-Cruz *et al.*, 2005). Como parte importante de la misión del Colegio de Postgraduados (Tabasco y Estado de México) en la recuperación de suelos contaminados con compuestos orgánicos e inorgánicos, se han realizado estudios acerca de la interacción suelo-planta-microorganismo para biorremediar suelos contaminados con hidrocarburos. En Teapa, Tabasco, los suelos (Gleysoles) tienen petróleo acumulado por derrames crónicos, pero mantienen praderas de algunas gramíneas como el pasto alemán [*Echinochloa polystachya*, (H.B.K.) Hitchc.]. Al respecto, se ha reportado que la interacción de esta especie vegetal inoculada con consorcios de bacterias y hongos filamentosos es capaz de remover el 48 % de hidrocarburos totales del petróleo (Rivera-Cruz *et al.*, 2004), y el 66,5 % de benzo[a]pireno en suelo (Rivera-Cruz *et al.*, 2006). Otros estudios en el ejido de José Narciso Roviroso, Tabasco, indican que el sistema conformado por *Pseudomonas* sp., *Serratia marcescens*, *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp., y la leguminosa guaje (*Leucaena leucocephala*) fertilizadas con urea (45 % N) y superfosfato triple de calcio

(46 % P) es capaz de remover hasta 81 % de hidrocarburos totales del petróleo, lo que representa su alto potencial para fitorremediar suelos contaminados (Maldonado-Chávez *et al.*, 2010). Los cultivos de maíz y frijol (*Phaseolus vulgaris*), los de mayor tradición y que forman la base de la alimentación en México, han sido afectados por la contaminación de petróleo en suelo, por lo que varias de las investigaciones se han dirigido a estos cultivos. Al respecto, se han reportado poblaciones de BHC de  $6,03 \times 10^8$  UFC g suelo<sup>-1</sup> rizosférico de ambos cultivos en la localidad de Minatitlán, Veracruz, donde las bacterias de la rizosfera de maíz presentaron una capacidad significativa para la remoción de hidrocarburos, la cual incrementa conforme el tiempo (Hernández *et al.*, 2004b; Hernández *et al.*, 2004c). En tanto que, Hernández *et al.* (2000) encontraron poblaciones de hasta  $63 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup> de BFNA-BHC en suelo rizosférico del arbusto *Chamaecrista nictitans* contaminado con 2500 mg petróleo crudo kg suelo<sup>-1</sup>.

**Cuadro 3.** Genes catalíticos involucrados en la biodegradación de hidrocarburos presentes en algunas RPCV.

Gen	Bacteria	Referencia
<i>alkB</i>	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Pseudomonas pertucinogena</i> , <i>Pseudomonas putida</i>	Margesin <i>et al.</i> , 2003; M'rassi <i>et al.</i> , 2015; Pawlik y Seget, 2015
<i>alkB1</i>	<i>Sphingomonas koreensis</i> , <i>Rhodococcus</i> spp.	Margesin <i>et al.</i> , 2003; Hesham <i>et al.</i> , 2014
<i>alkB2</i>	<i>Rhodococcus</i> spp.	Margesin <i>et al.</i> , 2003
<i>alkH</i>	<i>Rhodococcus fascians</i>	Pawlik y Seget, 2015
<i>alkM</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.	Margesin <i>et al.</i> , 2003
<i>nahAc</i> , PAH-RHD $\alpha$ , C120,	<i>Sphingomonas koreensis</i>	Hesham <i>et al.</i> , 2014
C230	<i>Sphingomonas koreensis</i> , Endófitos	Hesham <i>et al.</i> , 2014; Pawlik y Seget, 2015
P450, <i>pah</i>	Endófitos	Pawlik y Seget, 2015
<i>alkB</i> , CYP153,	<i>Parvibaculum</i> , <i>Aeromicrobium</i>	Tsuboi <i>et al.</i> , 2015
<i>alma</i> , <i>ladA</i>	Actinobacterias	Tsuboi <i>et al.</i> , 2015
<i>alk</i>	<i>Micrococcus</i> sp., <i>Dietzia maris</i>	Dellagnezze <i>et al.</i> , 2014

Respecto a la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno, investigadores de la Universidad Veracruzana y del Colegio de Postgraduados (Estado de México) evaluaron el impacto del petróleo crudo sobre este tipo bacterias en la región de la Perla, Veracruz, y reportaron que las poblaciones bacterianas incrementan hasta tres veces en suelos contaminados con 40 000 mg petróleo kg suelo<sup>-1</sup> respecto a los suelos no contaminados (Vázquez-Luna *et al.*, 2011). Asimismo, se ha documentado que la presencia de queroseno en un cultivo de frijol no afecta drásticamente las poblaciones de bacterias diazotróficas, ya que se encontró una población de 4 x 10<sup>6</sup> UFC g raíz<sup>-1</sup> con una concentración de 2500 mg queroseno kg<sup>-1</sup> en suelo del rizoplano, y de BFNA-BHC de 3 x 10<sup>6</sup> UFC g raíz<sup>-1</sup> con una concentración de 500 mg queroseno kg<sup>-1</sup> de suelo rizosférico, donde la actividad de la nitrogenasa se reportó entre 0,1345 y

19,1060 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> vial<sup>-1</sup> (Hernández *et al.*, 2004a). En tanto, que Pérez-Vargas y sus colaboradores (2000) señalaron que las bacterias diazotróficas hidrocarbonoclastas son capaces de reducir hasta 75 % del total de hidrocarburos que conforman al queroseno. Estudios realizados en el Colegio de Postgraduados (Estado de México) han reportado la presencia de bacterias diazotróficas hidrocarbonoclastas pertenecientes a los géneros de *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Xanthomonas*, en suelos contaminados de La Venta, Tabasco (Esquivel-Cote *et al.*, 2015) con la capacidad de producir ácido indol acético, sintetizar la enzima ACC desaminasa y biodegradar alcanos derivados del diésel hasta un 90 % (datos no publicados).

## **Perspectivas del uso de RPCV en la fitorremediación de suelos contaminados en México**

La perspectiva de la restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México se basa en estudios moleculares para esclarecer la expresión de genes que codifican a enzimas catalíticas implicadas en la biodegradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos presentes en rizobacterias hidrocarbonoclastas y en conocer el impacto que provoca la presencia de hidrocarburos en la eficiencia de los mecanismos promotores del crecimiento vegetal, por ejemplo, la fijación de nitrógeno atmosférico durante el proceso de fitorremediación. De igual manera, se requiere de estudios enfocados al aislamiento del ADN directamente del suelo para conocer la diversidad microbiana no cultivable de bacterias diazotróficas con potencial hidrocarbonoclasta en suelos contaminados con petróleo. Lo anterior resalta la importancia de la complementariedad que debe considerarse entre la ciencia básica y la ciencia aplicada, con el fin de hacer más eficientes los procesos de biorremediación y fitorremediación, complementados con la bioaumentación o bioestimulación de los sistemas contaminados.

## **Agradecimientos institucionales**

Beca posdoctoral otorgada por CONACYT a Esquivel-Cote Rosalba en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

## Bibliografía

- ABELES, F.B.; MORGAN, P.W.; SALTVEIT, M.E.JR. 1992. Ethylene in plant biology, Second Edition, Academic Press.
- AFZAL, M.; KHAN, S.; IQBAL, S.; SAJJAD-MIRZA, M.; KHAN, Q.M. 2013. Inoculation method affects colonization and activity of *Burkholderia phytofirmans* PsJN during phytoremediation of diesel-contaminated, International Biodeterioration and Biodegradation, 85:331-336.
- AGBOGIDI, O.M.; ERUOTOR, P.G.; AKPAROBI, S.O.; NNAJI, G.U. 2007. Evaluation of crude oil contaminated soil on the mineral nutrient elements of maize (*Zea mays* L.), Journal of Agronomy, 6:188-193.
- AGNELLO, A.C.; BAGARD, M.; VAN HULLEBUSCH, E.D.; ESPOSITO, G.; HUGUENOT, D. 2016. Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation, Science of the Total Environment, (Disponible: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.061>).
- AGUADO-SANTACRUZ, G.A.; MORENO-GÓMEZ, B.; JIMÉNEZ-FRANCISCO, B.; GARCÍA-MOYA, E.; PRECIADO-ORTIZ, R.E. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis, Revista Fitotecnia Mexicana, 35(1):9-21.
- AHEMAD, M.; KIBRET, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective, Journal of King Saud University – Science, 26:1-20.
- AL-AWADHI, H.; AL-MAILEM, D.; DASHTI, N.; KHANAFER, M.; RADWAN, S.S. 2012. Indigenous hydrocarbon-utilizing bacterioflora in oil-polluted habitat in Kuwait, two decades after the greatest man-made oil spill, Archives of Microbiology, 194:689-705.
- ALEXANDER, M. 1994. Biodegradation and bioremediation, Academic Press, San Diego
- AL-MAILEM, D.M.; ELIYAS, M.; RADWAN, S.S. 2013. Oil-bioremediation potential of two hydrocarbonoclastic, diazotrophic *Marinobacter* strains from hypersaline areas along the Arabian Gulf coasts, Extremophiles, 17:463-470.
- ALRUMMAN, A.S.; STANDING, S. B.; PATON, G.I. 2014. Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity, Journal of King Saud University-Science, 27:31-41.
- AMBRAZAITIENE, D.; ZUKAUSKAITE, A.; JAKUBAUSKAITE, V.; REIKAITE, R.; ZUBRICKAITE, M.; KARCAUSKIENE, D. 2013. Biodegradation activity in the soil contaminated with oil products, Zemdirbyste Agriculture, 100(3):235-242.
- ANDREA, M.M. 2015. O uso de minocas como bioindicadores de contaminação de solos, Acta Zoológica Mexicana, 26(2):12-15.
- ARGUMEDO-DELIRA, R.; ALARCÓN, A.; FERRERA-CERRATO, R.; PEÑA-CABRIALES, J.J.;ALMARAZ, J.J. 2012. Tolerance and growth of eleven *Trichoderma* strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzo[a]pyrene, Journal of Environmental Management (Special Issue), 95:S291-S299.

- ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W.T. JR. 1997. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions, *Advance in Agronomy*, 62:45-151.
- ARSHAD, M.; SALEEM, M.; HUSSAIN, S. 2007. Perspectives of bacterial ACC deaminase, *Trends in Biotechnology*, 25(8):356-362.
- ATLAS, R.M.; HAZEN, T.C. 2011. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in US history, *Environmental Science and Technology*, 45(16):6709-6715.
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture, *Canadian Journal of Microbiology*, 36:591-608.
- BELIMOV, A.A.; HONTZEAS, N.; SAFRONOVA, V.I.; DEMCHINSKAYA, S.V.; PILUZZA, G.; BULLITTA, S.; GLICK, B.R. 2005. Cadmium-tolerant plant growth promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.), *Soil Biology and Biochemistry*, 37:241-250.
- BELIMOV, A.A.; SAFRONOVA, V.I.; SERGEYEVA, T.A.; EGOROVA, T.N.; MATVEYEVA, V.A.; TSYGANOV, V.E.; BORISOV, A.Y.; TIKHONOVICH, I.A.; KLUGE, C.; PREISFELD, A.; DIETZ, K.J.; STEPANOK, V.V. 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase, *Canadian Journal of Microbiology*, 47:642-652.
- BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L.M.P. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents, *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 Suppl):1044-1051.
- BENTO, R.A.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; PITARD, R.M.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO DA SILVA, E.M.; DE LUCENA, T.S.R.; TEIXEIRA, G.L.F.H.; MARTINS, L.F.; GARCIA, T.V.A. 2012. Selection of leguminous trees associated with symbiont microorganisms for phytoremediation of petroleum-contaminated soil, *Water, Air and Soil Pollution*, 223:5659-5671.
- BISHT, S.; PANDEY, P.; KAUR, G.; AGGARWAL, H.; SOOD, A.; SHARMA, S.; KUMAR, V. 2014. Utilization of endophytic strain *Bacillus* sp. SBER3 for biodegradation of polyaromatic hydrocarbons (PAH) in soil model system, *European Journal of Soil Biology*, 60:67-76.
- BLAHA, D.; PRIGENT-COMBARET, C.; SAJJAD, M.M.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography, *FEMS Microbiol Ecology*, 56:455-470.
- CARSON, K.C.; MEYER, J.; DILWORTH, M.J. 2000. Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria, *Soil Biology and Biochemistry*, 32:11-21.
- CASTRO-MANCILLA, Y.V.; CASTRO-MEZA, B.I.; DE LA GARZA-REQUENA, F.R.; RIVERA-ORTIZ, P.; HEYER-RODRÍGUEZ, L.; ORTIZ-CARRIZALES, Y.P. 2013. Variación de las poblaciones microbianas del suelo por la adición de hidrocarburos, *Terra Latinoamericana*, 31:221-230.
- CERQUEIRA, V.S.; HOLLENBACH, E.B.; MABONI, F.; VAINSTEIN, M.H.; CAMARGO, F.B.O.; PERALBA, M.C.R.; BENTO, F.M. 2011. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures, *Biosource Technology*, 102(23):11003-11010.
- COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria, *Critical Review in Microbiology*, 21(1):1-8.

- CRUZ-HERNÁNDEZ, A.; TOMASINI-CAMPOCOSIO, A.; PÉREZ-FLORES, L.J.; FERNÁNDEZ-PERRINO, F.J.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M. 2013. Inoculation of seed-borne fungus in the rhizosphere of *Festuca arundinacea* promotes hydrocarbon removal and pyrene accumulation in roots, *Plant Soil*, 362:261-270.
- CURL, E.A.; TRUELOVE, B. 1986. *The rhizosphere*, Advanced Series in Agricultural Sciences, Springer-Verlag, Berlín.
- DAKORA, F.D.; PHILLIPS, D.A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments, *Plant and Soil*, 245:35-47.
- DAS, R.; TIWARY, B.N. 2014. Production of indole acetic acid by a novel bacteria strain of *Planomicrobium chinense* isolated from diesel oil contaminated site and its impact on the growth of *Vigna radiata*, *European Journal of Soil Biology*, 62:92-100.
- DASHTI, N.; ALI, N.; ELIYAS, M.; KHANAFER, M.; SORKHOH, N.A.; RADWAN, S.S. 2015. Most hydrocarbonoclastic bacteria in the total environment are diazotrophic, which highlights their value in the bioremediation of hydrocarbon contaminants, *Microbes Environment*, 30(1):70-75.
- DE JUANA, S.J.M. 2003. La energía. En: De Juana, S.J.M. (ed.) *Energías renovables para el desarrollo*, Paraninfo, España.
- DELLAGNEZZE, B.M.; DE SOUSA, G.V.; MARTINS, L.L.; DOMINGOS, D.F.; LIMACHE, E.E.; DE VASCONCELLOS, S.P.; Da Cruz, G.F.; DE OLIVEIRA, V.M. 2014. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs, *Marine Pollution Bulletin*, 89(1-2):191-200.
- DENARO, R.; CRISAFI, F.; RUSSO, D.; GENOVESE, M.; MESSINA, E.; GENOVESE, L.; CARBONE, M.; CIAVATTA, M.I.; FERRER, M.; GOLYSHIN, P.; YAKIMOV, M.M. 2014. *Alcanivorax borkumensis* produces an extracellular siderophore in iron-limitation condition maintaining the hydrocarbon-degradation efficiency, *Marine Genomics*, 17:43-52.
- DES-MARAIS, D.L.; JUENGER, T.E. 2010. Pleiotropy, plasticity, and the evolution of plant abiotic stress tolerance, *Annals of the New York Academy of Science*, 1206:56-79.
- DINDAR, E.; TOPAC, S.F.O.; SAVAS, B.H. 2013. Bioremediation of petroleum-contaminated soil, *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 7(19):39-47.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(2):107-149.
- DOBEREINER, J.; PEDROSA, F.A. 1987. *Nitrogen fixing bacteria in nonleguminous plants*, Science Tech Publishers, Madison.
- DONG, R.; GU, L.; GUO, C.; XUN, F.; LIU, J. 2014. Effect of PGPR *Serratia marcescens* BC-3 and AMF *Glomus intraradices* on phytoremediation of petroleum contaminated soil, *Ecotoxicology*, 23:674-680.
- ECKFORD, R.; COOK, F.D.; SAUL, D.; AISLABIE, J.; FOGHT, J. 2002. Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel-contaminated Antarctic soils, *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10):5181-5185.
- EL-TARABILY, K.A. 2008. Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes, *Plant and Soil*, 308:161-174.



- ESQUIVEL-COTE, R.; NOLASCO-VARONA, E.; FERRERA-CERRATO, R.; ALARCÓN, A. 2015. Bacterias fijadoras de nitrógeno en suelos contaminados con petróleo, Memorias del XL Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo, San Luis Potosí, México, pp. 173-178.
- ESQUIVEL-COTE, R.; RAMÍREZ-GAMA, R.M.; TSUZUKI-REYES, G.; OROZCO-SEGOVIA, A.; HUANTE, P. 2010. *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency, *Plant and Soil*, 337:65-75.
- ESSIEN, J.; UDOUKPO, F.; ETESIN, U.; ETUK, H. 2013. Activities of hydrocarbon-utilizing and diazotrophic bacteria in crude oil impacted mangrove sediments of the Qua Iboe Estuary, Nigeria, 16(2):165-174.
- FAN, S.; LI, P.; GONG, Z.; REN, W.; HE, N. 2008. Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Chemosphere*, 71:1593-1598.
- FARALDO-GÓMEZ, J.D.; SANSOM, M.S. 2003. Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(2):105-116.
- FASSBENDER, H.W.; BORNEMISZA, E. 1987. Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina, IICA, San José, Costa Rica.
- FATIMA, K.; AFZAL, M.; IMRAN, A.; KHAN, Q.M. 2015. Bacterial rhizosphere and endosphere populations associated with grasses and trees to be used for phytoremediation of crude oil contaminated soil, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94:314-320.
- FERRERA-CERRATO, R.; ALARCÓN, A. 2013. Microorganismos rizosféricos durante la fitorremediación de hidrocarburos del petróleo en suelos. En: Alarcón, A.; Ferrera-Cerrato, R. (ed.). Biorremediación de suelos y aguas contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos, Trillas, México.
- FERRERA-CERRATO, R.; ALARCÓN, A. 2007. Rizósfera: interacción suelo, planta y microorganismos. En: Fuentes-Dávila, G.; Ferrera-Cerrato, R. (ed.). Ecología de la raíz, Sociedad Mexicana de Patología, México.
- FERRERA-CERRATO, R. 2000. Microorganismos de la rizosfera y su potencial en la degradación de hidrocarburos. En: Quintero-Lizaola, R.; Reyna-Trujillo, T.; Corlay-Chee, L.; Ibañez-Huerta, A.; García-Calderón, N.E. (ed.). La edafología y sus perspectivas al siglo XXI. Tomo II, Colegio de Postgraduados, Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad Autónoma Chapingo, México.
- FODELIANAKIS, S; ANTONIOU, E.; MAPELLI, F.; MAGAGNINI, M.; NIKOLOPOULOU, M.; MARASCO, R.; BARBATO, M.; TSIOLA, A.; TSIKOPOULOU, I.; GIACCAGLIA, L; MAHJOUBI, M.; JAOUANI, A.; AMER, R.; HUSSEIN, E.; AL-HORANI, F.A.; BENZHA F.; BLAGHEN, M.; MALKAWI, H.I.; ABDEL-FATTAH, Y.; CHERIF, A.; DAFFONCHIO, D.; KALOGERAKIS, N. 2015. Allochthonous bioaugmentation in *ex situ* treatment of crude oil-polluted sediments in the presence of an effective degrading indigenous microbiome, *Journal of Hazardous Materials*, 287:78-86.
- Gałazka, A.; Król, M.; Perzyński, A. 2012. The efficiency of rhizosphere bioremediation with *Azospirillum sp.* and *Pseudomonas stutzeri* in soils freshly contaminated with PAHs and diesel fuel, *Journal of Environmental Studies*, 21(2):345-353.

- GALLEGO, J.L.R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J.F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation, *Biodegradation*, 12:325-335.
- GARCÍA, E.; FERRERA-CERRATO, R.; ALMARÁZ, J.J.; RODRÍGUEZ, R.; GARCÍA, E. 2013. Biodegradación de queroseno en la rizosfera de gramíneas en condiciones de invernadero, *Agronomía Costarricense*, 37(2):125-134.
- GHOSH, S.; PENTERMAN, J.N.; LITTLE, R.D.; CHÁVEZ, R.; GLICK, B.R. 2003. Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedlings growth of canola, *Brassica campestris*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 41:277-281.
- GIRLANDA, M.; PEROTTO, S. 2005. A century of rhizosphere research: fungal interactions with plant's hidden half, *Mycological Research*, 109(10):1058-1061.
- GLICK, B. R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications, *Scientifica*, Hindawi Publishing Corporation, 2012:1-15.
- GLICK, B.R.; TODOROVIC, B.; CZARNY, J.; CHENG, Z.; DUAN, J.; MCCONKEY, B. 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase, *Critical Reviews in Plant Science*, 26:227-242.
- GLICK, B.R.; PENROSE, D.M.; LI, J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria, *Journal of Theoretical Biology*, 190:63-68.
- HERNÁNDEZ, A.E.; GUTIÉRREZ-CASTORENA, M.C.; RUBIÑOS-PANTA, J.E.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. 2004c. Remoción de hidrocarburos totales del petróleo por microorganismos hidrocarbonoclastas y bioestimulación de la rizosfera de maíz. En: Hernández, A.E.; Rubiños, P.J.E.; Alvarado, L.J. (ed.). Restauración de suelos contaminados con hidrocarburos: conceptos básicos, Colegio de Postgraduados, México.
- HERNÁNDEZ, A.E.; FERRERA-CERRATO, R.; GUTIÉRREZ-CASTORENA, M.C.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; RUBIÑOS-PANTA, J.E.; FERNÁNDEZ-LINARES, L. 2004b. Bacterias y hongos hidrocarbonoclastas de rizosfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo. En: Hernández, A.E.; Rubiños, P.J.E.; Alvarado, L.J. (ed.). Restauración de suelos contaminados con hidrocarburos: conceptos básicos, Colegio de Postgraduados, México.
- HERNÁNDEZ, A.E.; FERRERA-CERRATO, R.; FERNÁNDEZ, L.L.; RODRÍGUEZ, V.R. 2000. Efecto del petróleo sobre las poblaciones de bacterias hidrocarbonoclastas rizosféricas y no rizosféricas de *Chamaecrista nictitans*. En Quintero-Lizaola, R.; Reyna-Trujillo, T.; Corlay-Chee, L.; Ibáñez-Huerta, A.; García-Calderón, N.E. (ed.). La edafología y sus perspectivas al siglo XXI. Tomo II, Colegio de Postgraduados, Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad Autónoma Chapingo, México.
- HERNÁNDEZ, A.E.; FERRERA-CERRATO, R.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. 2004a. Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico en rizosfera de frijol contaminada con keroseno. En: Hernández, A.E.; Rubiños, P.J.E.; Alvarado, L.J. (ed.). Restauración de suelos contaminados con hidrocarburos: conceptos básicos, Colegio de Postgraduados, México.
- HERNÁNDEZ-ACOSTA, E.; FERRERA-CERRATO, R.; RODRÍGUEZ, V.R. 2003. Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico en rizósfera de frijol contaminada con queroseno, *Terra Latinoamericana*, 21:81-89.

- HESHAM A.E.L.; MAWAD, A.M.M.; MOSTAFA, Y.M.; SHOREIT, A. 2014. Biodegradation ability and catabolic genes of petroleum-degrading *Sphingomonas koreensis* strain ASU-06 isolated from Egyptian oily soil, Hindawi Publishing Corporation, 2014:1-10.
- HONG, S.H.; RYU, H.; CHO, K.S. 2011. Rhizoremediation of diesel-contaminated soil using the plant growth-promoting rhizobacterium *Gordonia* sp. S2RP-17, Biodegradation, 22(3):593-601.
- HUANG, X.D.; EL-ALAWI, Y.; PENROSE, D.M.; GLICK, B.R.; GREENBERG, B.M. 2004. A multiprocess phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils, Environmental Pollution, 130:465-476.
- JOHN, R.C.; ITAH, A.Y.; ESSIEN, J.P.; IKPE, D.I. 2011. Fate of nitrogen-fixing bacteria in crude oil contaminated wetland ultisol, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 87:343-353.
- JONER, E.J.; LEYVAL, C. 2003. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza, Environmental Science and Technology, 37:2371-2375.
- KHAN, S.; AFZAL, M.; IQBAL, S.; KHAN, Q.M. 2013. Plant-bacteria partnerships for remediation of hydrocarbon contaminated soils, Chemosphere, 90:1317-1332.
- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. En: Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Gilbert-Clarey, Tous, Francia.
- KLOEPPER, J.W.; ZABLOTOWICK, R.M.; TIPPING, E.M.; LIFSHITZ, R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. En: Keister, D.L.; Cregan, P.B. (ed.). The rhizosphere and plant growth, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos.
- LA JORNADA ECOLÓGICA, NÚMERO ESPECIAL, 2 DE AGOSTO DE 2010.(Disponible: <http://www.jornada.unam.mx/2010/08/02/eco-f.html>) Visitado el 15 de septiembre de 2016.:
- LEE, S.H.; LEE, W.S.; LEE, C.H.; KIM, J.G. 2008.: Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes, Journal of Hazardous Materials, 153:892-898.
- LIMA DO CARMO, F.; FRAGOSO DOS SANTOS, H.; FERREIRA-MARTINS, E.; DIRK VAN ELSAS, J.; SOARES-ROSADO, A.; SILVA-PEIXOTO, R. 2011. Bacterial structure and characterization of plant growth promoting and oil degrading bacteria from rhizospheres of mangrove plants, The Journal of Microbiology, 49(4):535-543.
- LIN, T.C.; SHEN, F.T.; CHANG, J.C.; YOUNG, C.C.; ARUN, A.B. 2009. Hydrocarbon degrading potential of bacteria isolated from oil-contaminated soil, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 40:580-582.
- LIU, W.; HOU, J.; WANG, Q.; DING, L.; LUO, Y. 2014. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria and their effects on phytoremediation of petroleum-contaminated saline-alkali soil, Chemosphere, 117:303-308.
- M'RASSI A. G.; BENSALAH, F.; GURY, J.; DURAN, R. 2015. Isolation and characterization of different bacterial strains for bioremediation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons, Environmental Science and Pollution Research, 22(20):15332-15346.

- MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; RYU, J.; SA T.M. 2006. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*, *Planta*, 224:268-278.
- MALDONADO-CHÁVEZ, E.; RIVERA-CRUZ, M.C.; IZQUIERDO-REYES, F.; PALMA-LÓPEZ, D.J. 2010. Efectos de rizosfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleo crudo nuevo e intemperizado, *Universidad y Ciencia*, 26(2):121-136.
- MANSUR, A.A.; ADETUTU, E.M.; KADALI, K.K.; MORRISON, P.D.; NURULITA, Y.; BALL, A.S. 2014. Assessing the hydrocarbon degrading potential of indigenous bacteria isolated from crude oil tank bottom sludge and hydrocarbon-contaminated soil of Azzawiya oil refinery, Libya, *Environment Science and Pollution Research*, 21:10725-10735.
- MARGESIN, R.; LABBE, D.; SCHINNER, F.; GREER, C.W.; WHYTE, L.G. 2003. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6):3085-3092.
- MARSCHNER, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants, Second edition, Academic Press.
- MARTÍNEZ, M.V.E.; LÓPEZ, S.F. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso, *Terra Latinoamericana*, 19(1):9-17.
- MARTINEZ-RABELO, F.; HERNÁNDEZ-CASTELLANOS, B.; BAROIS-BOULLARD, I. 2015. Desarrollo de la lombriz de tierra *Amyntas corticis* en un suelo contaminado con antraceno, *Memorias del XL Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo*, San Luis Potosí, México, pp. 608-611.
- MARUYAMA, A.; ISHIWATA, H.; KITAMURA, K.; SUNAMURA, M.; FUJITA, T.; MATSUO, M.; HIGASHIHARA, T. 2003. Dynamics of microbial populations and strong selection for *Cycloclasticus pugetii* following the Nakhodka oil spill, *Microbial Ecology*, 46:442-453.
- MORGAN, P.; WATKINSON, R.J. 1989. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment, *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 8:305-333.
- MURATOVA, A.Y.; TURKOVSKAYA, O.V.; ANTONYUK, L.P.; MAKAROV, O.E.; POZDNYAKOVA, L.I.; IGNATOV, V.V. 2005. Oil-oxidizing potential of associative rhizobacteria of the genus *Azospirillum*, *Microbiology*, 74(2):210-215.
- MUSAT, F.; HARDER, J.; WIDDEL, F. 2006. Study of nitrogen fixation in microbial communities of oil-contaminated marine sediment microcosms, *Environmental Microbiology*, 8:1834-1843.
- NAVEED, M.; MITTER, B.; YOUSAF, S.; PASTAR, M.; AFZAL, M.; SESSITSCH, A. 2014. The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics, *Biology and Fertility of Soils*, 50:249-262.
- NDUNG'U-MAGIROI, K.W.; HERRMANN, L.; OKALEBO, J.R.; OTHIENO, C.; PYPERS, P.; LESUEUR, D. 2012. Occurrence and genetic diversity of phosphate-solubilizing bacteria in soils of differing chemical characteristics in Kenya, *Annals of Microbiology*, 62:897-904.
- NICKELL, L.,G. 1982. Plant growth regulators. Agricultural Uses, Springer-Verlag, Berlín.
- NIE, M.; WANG, Y; YU, J.; XIAO, M.; JIANG, L.; YANG, J. 2011. Understanding plant-microbe interactions for phytoremediation of petroleum polluted soil, *Plos One*, 6(3):e17961.
- OSUJI, L.C.; NWOYE, I. 2007. An appraisal of the impact of petroleum hydrocarbons on soil fertility: the Owaza experience, *African Journal of Agricultural Research*, 2(7):318-324.

- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid, *Canadian Journal Microbiology*, 42:207-220.
- PAWLIK, M.; SEGET, Z.P. 2015. Endophytic bacteria associated with *Hieracium piloselloides*: their potential for hydrocarbon-utilizing and plant growth-promotion, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 78:13-14.
- PEREIRA, L. 2013. Persistent organic chemicals of emerging environmental concern. En: Malik, A.; Grohmann, E.; Akhtar, R. (ed.). *Environmental deterioration and human health: natural and anthropogenic determinants*, Springer, Países Bajos.
- PÉREZ-VARGAS, J.; GARCÍA-ESQUIVEL, G. 2013. Microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre en la biorremediación. En: Alarcón, A.; Ferrera-Cerrato, R. (ed.). *Biorremediación de suelos y aguas contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos*, Trillas, México.
- PÉREZ-VARGAS, J.; POGGI-VARALDO, G.; CALVA-CALVA, E.; RÍOS-LEAL, R.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; FERRERA-CERRATO, R.; ESPARZA-GARCÍA, F. 2000. Nitrogen fixing bacteria capable of utilizing kerosene hydrocarbons as a sole carbon source, *Water Science and Technology*, 5-6:407-411.
- PIEHLER, M.F.; SWISTAK, J.C.; PINCKNEY, J.L.; PAERL, H.W. 1999. Stimulation of diesel fuel biodegradation by indigenous nitrogen fixing bacterial consortia, *Microbial Ecology*, 38:69-78.
- PRANTERA, M.T.; DROZDOWICZ, A.; GOMES, S.L.; SOARES, R.A. 2002. Degradation of gasoline aromatic hydrocarbons by two N<sub>2</sub>-fixing soil bacteria, *Biotechnology Letters*, 24:85-89.
- QUIAO, J.; ZHANG, C.; LUO, S.; CHEN, W. 2014. Bioremediation of highly contaminated oilfield soil: bioaugmentation for enhancing aromatic compounds removal, *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 8(2):293-304.
- RICHARDSON, A.E. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants, *Functional Plant Biology*, 28(9):897-906.
- RIVERA-CRUZ, M.C.; TRUJILLO-NARCÍA, A.; FERRERA-CERRATO, R.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; VOLKE-HALLER, V.; SÁNCHEZ-GARCÍA, P.; FERNÁNDEZ-LINARES, L. 2006. Fitorremediación de suelos con benzo(a)pireno mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc., *Universidad y Ciencia*, 22(1):1-12.
- RIVERA-CRUZ, M.C.; FERRERA-CERRATO, R.; SÁNCHEZ-GARCÍA, P.; VOLKE-HALLER, V.; FERNÁNDEZ-LINARES, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. 2004. Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc], *Agrociencia*, 38(1):1-12.
- RIVERA-CRUZ, M.C.; FERRERA-CERRATO, R.; VOLKE, V.; RODRÍGUEZ, R.; FERNÁNDEZ, L. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo, *Terra Latinoamericana*, 20(4):423-434.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, *Biotechnology Advances*, 17(4-5):319-339.
- RUSIN, M.; GOSPODAREK, J.; NADGÓRSKA-SOCHA, A. 2015. The effect of petroleum-derived substances on the growth and chemical composition of *Vicia faba*, *Journal and Environmental Studies*, 24(5):2157-2166.

- SAUL, D.J.; AISLABIE, J.M.; BROWN, C.E.; HARRIS, L.; FOGHT, J.M. 2005. Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica, *FEMS Microbiology Ecology*, 53:141-155.
- SCHALK, I.J.; HANNAUER, M.; BRAUD, A. 2011. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance, *Environmental Microbiology*, 13(11):2844-2854.
- SCHROEDER, R.H.A.; DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ, V.I.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, L. 1999. Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano, *Terra Latinoamericana*, 17(2):159-174.
- SGROY, V.; CASSÁN, F.; MASCIARELLI, O.; DEL PAPA, M.F.; LAGARES, A.; LUNA, V. 2009. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:371-381.
- SORKHOH, N.A.; ALI, N.; DASHTI, N.; AL-MAILEM, D.M.; AL-AWADHI, H.; ELIYAS, M.; RADWAN, S.S. 2010. Soil bacteria with the combined potential for oil utilization, nitrogen fixation, and mercury resistance, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64:226-231.
- STAIJEN, I.E.; MARCIONELLI, R.; WITHOLT, B. 1999. The PalkBFGHJKL promoter is under carbon catabolite repression control in *Pseudomonas oleovorans* but not in *Escherichia coli* alk<sup>+</sup> recombinants, *Journal of Bacteriology*, 181(5):1610-1616.
- SUN, F.L.; WANG, Y.S.; SUN, C.C.; PENG, Y.L.; DENG, C. 2012 Effects of three different PAHs on nitrogen-fixing bacterial diversity in mangrove sediment, *Ecotoxicology*, 21:1651-1660.
- SUN, W.; DONG, Y.; GAO, P.; FU, M.; TA, K.; LI, J. 2015. Microbial communities inhabiting oil-contaminated soils from two major oilfields in Northern China: implications for active petroleum-degrading capacity, *Journal of Microbiology*, 53(6):371-378.
- SUSLOW, T.V.; KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N.; BURR, T.J. 1979. Beneficial bacteria enhance plant growth rhizobacteria, *California Agriculture Experiment Station*, 33:15-17.
- TAKETANI, R.G.; DOS SANTOS, H.F.; VAN ELSAS, J.D.; SOARES, R.A. 2009. Characterization of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm, *Antonie van Leeuwenhoek*, 96:343-354.
- TANG, J.; WANG, M.; WANG, F.; SUN, Q.; ZHOU, Q. 2011. Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil, *Journal of Environmental Sciences*, 23(5):845-851.
- TARA, N.; AFZAL, M.; ANSARI, T.M.; TEHSEEN, R.; IQBAL, S.; KHAN, Q.M. 2014. Combined use of alkane-degrading and plant growth promoting bacteria enhanced phytoremediation of diesel contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 16(7-12):268-1277.
- TESAR, M.; REICHENAUER, T.G.; SESSITSCH, A. 2002. Bacterial rhizosphere populations of black poplar and herbal plants to be used for phytoremediation of diesel fuel, *Soil Biology and Biochemistry*, 34:1883-1892.
- TRUJILLO-NARCIA, A.; RIVERA-CRUZ, M.; LAGUNES-ESPINOZA, L.C.; PALMA-LÓPEZ, D.J.; SÁNCHEZ-SOTO, S.; RAMÍREZ-VALVERDE, G. 2014. Uso de fertilizantes orgánicos en la enmendación de un fluvisol restaurado tras la contaminación con petróleo, *Interciencia*, 39(4):266-273.

- TSUBOI, S.; YAMAMURA, S.; NAKAJIMA-KAMBE, T.; IWASAKI, K. 2015. Diversity of alkane hydroxylase genes on the rhizoplane of grasses planted in petroleum-contaminated soils, *Springer Plus*, 4:526.
- VÁZQUEZ-LUNA, D. 2015. Biological indices of toxicity in tropical legumes grown in oil-contaminated soil, *Ecological Indicators*, 53:43-48.
- VÁZQUEZ-LUNA, M.; MONTIEL-FLORES, A.; VÁZQUEZ-LUNA, D.; HERRERA-TENORIO, D.F. 2011. Impacto del petróleo crudo en el suelo sobre la microbiota de vida libre fijadora de nitrógeno, *Subtropical Agroecosystems*, 13:511-523.
- VIÑAS, M.; SABATE, J.; ESPUNY, M.J.; SOLANAS, A.M. 2005. Bacterial community dynamic sand polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote contaminated soil, *Applied and Environmental Microbiology*, 71:7008-7018.
- WALKER, T.S.; BAIS, H.P.; GROTEWOLD, E.; VIVANCO, J.M. 2003. Root exudation and rhizosphere biology, *Plant Physiology*, 132:44-51.
- WANG, Y.H.; IRVING, H.R. 2011. Developing a model of plant hormone interactions, *Plant Signaling and Behavior*, 6(4):494-500.
- WARSHAWSKY, D.; CODY, T.; RADIKE, M.; REILMAN, R.; SCHUMANN, B.; LADOW, K.; SCHNEIDER, J. 1995. Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light, *Chemico-Biological Interactions*, 97(2):131-148.
- WU, B.; LU, D.N.; LIU, Z. 2012. Dynamic changes in functional genes for nitrogen cycle during bioremediation of petroleum-contaminated soil, *Huanjing Kexue/Environmental Science*, 33:2068-2074.
- WU, B.; LAN, T.; LU, D.; LIU, Z. 2014. Ecological and enzymatic responses to contamination, *Environmental Science*, 16:1501-1509.
- WYSZKOWSKA, J.; KUCHARSKI, J. 2000. Biochemical properties of soil contaminated by petrol, *Polish Journal of Environmental Studies*, 9(6):479-485.
- WYSZKOWSKA, J.; KUCHARSKI, M.; KUCHARSKI, J. 2006. Application of the activity of soil enzymes in the evaluation of soil contamination by diesel oil, *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(3):501-506.
- XUN, F.; XIE, B.; LIU, S.; GUO, C. 2015. Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation, *Environmental Science and Pollution Research*, 22:598-608.
- YAN, L.; PENTTINEN, P.; SIMOJOKI, A.; STODDARD, F.L.; LINDSTRÖM, K. 2015. Perennial crop growth in oil-contaminated soil in a boreal climate, *Science of the Total Environment*, 532:752-761.
- YAVARI, S.; MALAKAHMAD, A.; SAPARI, N.B. 2015. A review on phytoremediation of crude oil spills, *Water Air and Soil Pollution*, 226(8):226-279.
- YOUSAF, S.; ANDRIA, V.; REICHENAUER, T.G.; SMALLA, K.; SESSITSCH, A. 2010. Phylogenetic and functional diversity of alkane degrading bacteria associated with Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) and birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) in a petroleum oil contaminated environment, *Journal of Hazardous Materials*, 184:523-532.

ZAVALA-CRUZ, J.; GAVI-REYES, F.; ADAMS-SCHROEDER, R.H.; FERRERA-CERRATO, R.; PALMA-LÓPEZ, D.J.; VAQUERA-HUERTA, H.; DOMÍNGUEZ-EZQUIVEL, J.M. 2005. Derrames de petróleo en suelos y adaptación de pastos tropicales en el Activo Cinco Presidentes, Tabasco, México, *Terra Latinoamericana*, 23(3):293-302.

ZHUANG, X.; CHEN, J.; SHIM, H.; BAI, Z. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation, *Environmental International*, 33:406-413.



## CAPÍTULO 11

### Remediación de suelos contaminados con biodiésel

Paola R. Ríos<sup>1</sup> y Lidia Giuffré<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Edafología. Departamento de Recursos Naturales y Ambiente. Universidad de Buenos Aires. Avda. San Martín 4453, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Email: giuffre@agro.uba.ar

#### Introducción

En los últimos años la economía mundial tuvo como uno de sus pilares energéticos al petróleo, recurso que se fue agotando, y además se fueron incrementando los costos de extracción, con la complicación que estudios geológicos muy serios calculan una declinación inexorable de la producción de petróleo hacia el año 2020. En la era del conocimiento, una de las grandes preocupaciones de los técnicos y científicos más calificados pasa por encontrar fuentes de energía, de fácil acceso y generadoras de productos económicamente competitivos a partir del desarrollo de tecnologías avanzadas respetuosas del ambiente (Molina, 2009).

El biodiésel surgió como una interesante opción ya que es capaz de aprovechar diversas materias primas, proviene de una fuente renovable y el nivel bruto de esas emisiones es muy inferior al de las generadas por la combustión de origen fósil. Por sus características químicas y la baja contaminación ambiental que genera su combustión, se proyecta como una prometedora fuente de energía renovable sobre todo para los países donde las reservas de combustibles fósiles son escasas. En realidad, si se consideran las externalidades o costos ambientales relacionados con la producción de los cultivos, la ecuación ambiental cambia (Ríos *et al.*, 2010) y hay que tener en cuenta además los costos del petróleo, que últimamente son bajos, en la decisión de producir o no biodiésel. Históricamente la utilización de combustibles fósiles llevó a la contaminación de los suelos con hidrocarburos (Saterback *et al.*, 2000), convirtiéndose en importantes contaminantes medioambientales (Verma *et al.*, 2006). El derrame accidental del petróleo ha causado graves daños al ecosistema natural, y a pesar de los procesos físicos y biológicos en los suelos, los hidrocarburos pueden persistir por largo tiempo (Atlas, 1991; Chaîneau *et al.*, 1995, 2000). A lo largo

del siglo XX, se ha registrado en casi todo el mundo, un incremento vertiginoso en la cantidad de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo y sus derivados.

El derrame de combustible es considerado uno de los accidentes ambientales más difíciles de mitigar o remediar. Asimismo, estos tipos de derrames se están volviendo más frecuentes debido a diversos factores, entre los cuales se halla el mal estado de las vías de circulación, como el accidente sucedido con derrame de 9000 galones de diésel en la Quebrada del Toro (Perú). En esta situación se efectuó una bioremediación en pilas con bacterias provenientes de Japón en una simbiosis compuesta por más de 80 tipos de microorganismos de origen natural, entre los cuales destacan tres: bacterias acidolácticas, bacterias fototrópicas, y levaduras, lográndose eliminar la contaminación (Rodríguez Bazán, 2009).

En Argentina existen precedentes de derrame de biodiésel puro (100 %) en las proximidades de la ciudad de San Lorenzo, a 139 km al sur de Santa Fe. La fuga del biocombustible fue vertida en las aguas del río Paraná generando una mancha de 100 km<sup>2</sup> y afectando varias ciudades en los alrededores (Perfil, 2008). En la actualidad, la influencia del biodiésel en el suelo no ha sido totalmente comprendida, es por ello que es relevante ampliamente en el estudio del ciclo de vida del biodiésel en el suelo dado que este actúa como aceptor y depósito final de los residuos generados por la surgente industria de los biocombustibles (Cardona Villada, 2007).

La comercialización de mezclas biodiésel-diésel pueden producir impactos ambientales no deseados cuando existen derrames. Se ha estudiado para estos casos la bioremediación con *Pseudomonas putida* en suelos contaminados con esta mezcla; se concluyó que la remediación ha sido efectiva en 24 días de incubación, lo que sería una aplicación muy interesante como agente biodegradante en este tipo de contaminación (Sunar *et al.*, 2013).

Numerosos estudios reportan la biodegradación de hidrocarburos aromáticos y alcanos bajo condiciones aeróbicas (Gallego *et al.*, 2002; Saliven *et al.*, 2004), con técnicas de enriquecimiento de nutrientes (Meckenstock *et al.*, 2000; So y Young, 2001; Ehrenrich *et al.*, 2000), y bajo condiciones anaeróbicas (Grishchenkov *et al.*, 2000). Sin embargo, el único estudio de biodegradabilidad de biodiésel reportado hasta el momento es el efectuado por Zhang *et al.* (1998), quienes, después de investigar la degradación de varios tipos de biodiésel y compararlos con la degradación de un diésel comercial, así como mezclas de diésel con biodiésel, concluyeron que el biodiésel es fácilmente biodegradable en ambientes acuáticos, y su biodegradabilidad es mayor que la del diésel comercial.

El biodiésel es menos tóxico para los organismos del suelo, experimenta fácilmente biodegradación aeróbica y se observó que las mezclas que contienen una mayor

cantidad de biodiésel suelen facilitar la biodegradación (De Mello *et al.*, 2007; Demirbas, 2009; Makareviciene y Janulis, 2003 y Prince *et al.*, 2008).

La degradación biológica (biodegradación) consiste fundamentalmente en la oxidación de estos compuestos por parte de las bacterias heterótrofas del suelo en su metabolismo respiratorio, con el objeto de conseguir energía para su mantenimiento y crecimiento. Los compuestos orgánicos pueden ser metabolizados bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas por los procesos bioquímicos de los microorganismos.

Las estrategias de biorremediación natural incluyen atenuación natural, bioestimulación, bioaumentación, landfarming (arado, fertilización y riego del terreno para aumentar la degradación), adición de compost y fitorremediación (Skipper, 1999). La biorremediación en el suelo puede ser promovida estimulando a los microorganismos nativos del suelo con la introducción de nutrientes y oxígeno (bioestimulación) (Seklemova *et al.*, 2001) o a través de la inoculación o enriquecimiento de microorganismos en el suelo (bioaumentación) (Richard y Vogel, 1999; Barathi y Vasudevan, 2001). Existen dos tipos diferentes de fitorremediación: “in planta” y “ex planta”, según se realice la degradación del contaminante dentro de la propia planta o fuera de ella. En el primer caso (in planta), la planta absorbe el contaminante y lo incluye dentro de ella, mientras que en el segundo caso (ex planta), dicha degradación se realiza en la zona de la rizósfera, debido a los exudados radicales y a la mayor actividad que existe en la zona (CSIC, 2007).

La fitorremediación es citada como una alternativa tecnológica amigable con el ambiente que logra remediar los suelos afectados con diversos tipos de contaminantes. Cubillos *et al.* (2014) citan su utilización para derrames de hidrocarburos, utilizando leguminosas (*Clitoria ternatea*, *Phaseolus coccineus* y *Cicer arietinum*) y gramíneas (*Brachiaria híbrido* y *brizantha* y *Panicum máximum*), y también a *Medicago sativa*, con una remoción de un 50 % de hidrocarburos del suelo.

El proceso de degradación biológica es de gran importancia en la degradación de los hidrocarburos y otros compuestos orgánicos que entran en contacto con el suelo. Es así, que el conocimiento de la estructura y funcionalidad de las poblaciones microbianas nativas del suelo en el que se efectúa la remediación, su modificación con el tiempo y su variación según las condiciones del medio que las rodea es fundamental para comprender el éxito o fracaso en el proceso de remediación (Corona *et al.*, 2005). El alcance de la biorremediación del suelo depende del tipo de suelo, de las propiedades buffer, de la actividad biológica, del tipo de biota, de la longevidad de los contaminantes, de la toxicidad y de la movilidad del agua en el suelo. La caracterización física, química y biológica del suelo es fundamental para conocer si la atenuación natural y bioestimulación son viables como técnicas de saneamiento.

Además debe tenerse en cuenta que la biodisponibilidad de los contaminantes varía con el tipo de hidrocarburo y las características del suelo (Plaza *et al.*, 2005).

Las propiedades del suelo y la actividad de la población microbiana autóctona afectan el grado de biorremediación, es por ello que la caracterización del sitio es prioritaria para decidir cuál es el método más apropiado para la biorremediación (Bento *et al.*, 2005). Doran *et al.* (1996) presentaron una serie de propiedades que afectan la funcionalidad y calidad del suelo, y que afectarán consecuentemente la tasa de degradación de hidrocarburos en suelos. Esta se encuentra condicionada por parámetros fisicoquímicos como la temperatura, pH, contenido de sales, presencia de nutrientes, contenido de oxígeno, tamaño y distribución de partículas, capacidad reguladora (Margesin y Shinner, 2001).

Los principales nutrientes limitantes en la degradación microbiana de los hidrocarburos de petróleo que han sido históricamente estudiados fueron el nitrógeno (N) y el fósforo (P) (Zhuo y Crawford, 1995; Ting *et al.*, 1999). Algunos autores (Sarkar *et al.*, 2005) sostienen que ambos (N y P) son restrictivos para la degradación biológica aunque otros (Margesin y Shinner, 2001; Walecka *et al.*, 2006) plantean que el primero (N) es mucho más crítico debido a su mayor demanda biológica.

Los productos del petróleo una vez introducidos en el medioambiente cambian todas las condiciones del sistema biológico dependiendo de su concentración. Los microorganismos son ampliamente usados como indicadores de salud ecológica porque ellos tienen la capacidad de responder de modo relativamente rápido ante la presencia de contaminantes (Hayat *et al.*, 2002). La actividad biológica es el principal mecanismo para eliminar el petróleo y demás hidrocarburos del suelo. Un indicador microbiano es capaz de representar diversas propiedades del ambiente de una manera integrada (Gregorich *et al.*, 1994; Powlson *et al.*, 2001; Winndig *et al.*, 2005) porque los microorganismos responden sensiblemente a cambios en el ambiente y al estrés, ya que se encuentran en íntima relación con el ambiente que los rodea (Winding *et al.*, 2005). Los ensayos microbiológicos incluyen generalmente como indicadores de la contaminación con hidrocarburos a metodologías tales como el carbono de la biomasa microbiana (CBM), respiración, y actividad enzimática.

Para estudiar qué sucede con la biomasa microbiana, Hawrot-Paw y Martynus (2011) utilizaron biodiésel para mezclar con diésel para agregar en una concentración de 5 % a suelos franco arcillo arenosos y franco limosos. En este experimento, el agregado de biodiésel en la mezcla produjo menor biomasa microbiana durante todo el experimento, que duró 24 días.

El efecto que produce los hidrocarburos sobre los microorganismos del suelo ha sido bien documentado (Labud *et al.*, 2007; Lorenz y Kandeler, 2005; Megharaj *et al.*,

2000). El tamaño de la comunidad microbiana suele declinar con la presencia de contaminantes, Van der Wader *et al.*, (1995) encontraron que la mayor degradación de hidrocarburos reportada presentaba la más alta correlación con el parámetro de respiración del suelo.

La diversidad funcional (Df) es un componente de la diversidad microbiana que ha recibido poca atención (Zak *et al.*, 1994). Incluye diferentes funciones y varios procesos físicos influenciados por los microorganismos (Giller *et al.*, 1997). La descomposición de residuos es llevada a cabo por organismos heterotróficos que representan el mayor componente de la diversidad funcional microbiana (Zak *et al.* 1994; Giller *et al.*, 1997). Se considera que la diversidad catabólica es un indicador práctico de la diversidad funcional de la microbiota del suelo (Sparling *et al.*, 2000).

Alvear *et al.* (2007) señalaron que las actividades biológicas son excelentes bioindicadores de la calidad del suelo. La hidrólisis de la FDA incluye la actividad de enzimática hidrolítica extracelulares involucradas en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes del suelo. Las enzimas responsables de la hidrólisis del FDA son las esterasas, proteasas y lipasas que están involucradas en la descomposición de los residuos. Generalmente más del 90 % de la energía del sistema del suelo se debe a la actividad de los descomponedores, por ello la estimación de la actividad de los descomponedores prevé un buen indicador de la actividad microbológica total.

En un ensayo en el que se utilizaron como contaminantes biodiésel, glicerol y un cultivo mixto de organismos provenientes de una laguna contaminada (Lemos *et al.*, 2013), se observó que por bioaumentación degradaron la mezcla de ambos contaminantes y proveyeron mayor remoción de HTP al final del proceso (111 días).

En la actualidad se han realizado ensayos biológicos que han demostrado efectos citotóxicos y genotóxicos, por lo tanto, considerando su efecto dañino sobre los organismos expuestos a suelos contaminados con biodiésel, se considera que debe revisarse cuidadosamente este aspecto para asegurar la calidad ambiental (Morais Lemea *et al.*, 2012). En esta contribución se evalúa y compara atenuación natural, bioestimulación orgánica e inorgánica, bioaumentación y fitorremediación como técnicas de remediación en suelos contaminados con biodiésel. Si bien ha sido demostrado que el biodiésel tanto puro como en mezclas son una interesante alternativa, han sido escasas las investigaciones acerca del impacto sobre el sistema edáfico.

## Metodología

### Diseño experimental

Para evaluar y comparar la degradación del biodiésel se realizó un ensayo a campo. Se utilizaron parcelas de 0,8 x 1 m sobre un suelo de una textura franco limosa con un horizonte superficial de 30 cm, correspondientes a un Argiudol típico, de la localidad de Pilar, provincia de Buenos Aires, con un diseño experimental completamente aleatorizado. El diseño constó de 6 tratamientos con 3 repeticiones (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Descripción de los tratamientos empleados para evaluar la degradación de biodiésel.

	Tratamiento y descripción
S	Testigo
SB	Atenuación natural: suelo contaminado con biodiésel
SBF	Bioestimulación inorgánica: suelo contaminado con biodiésel y bioestimulado con fertilizante nitrogenado
SBC	Bioestimulación orgánica: suelo contaminado con biodiésel y bioestimulado con compost
SBM	Bioaumentación: suelo contaminado con biodiésel e inoculado con bacterias degradadoras de hidrocarburos
SBL	SBL Fitorremediación: suelo contaminado con biodiésel y sembrado con <i>Lolium multiflorum</i> L.

El nivel de contaminación con biodiésel fue del 20 % del peso seco del suelo. El fertilizante utilizado como fuente de nitrógeno fue urea y la dosis para aplicar se calculó sobre la óptima relación C:N para el desarrollo de la actividad biológica determinada por varios autores: 33:1 (Zitrides, 1983; Riser-Roberts, 1998; Sarkar *et al.*, 2005). La dosis de fertilizante aplicada para el tratamiento de bioestimulación inorgánica fue de 800 mg por parcela. En los tratamientos bioestimulados por compost (C/N: 11, pH 6,1, CE: 1,05) la relación en base seca, suelo-compost fue de 1:0,3 ya que varios trabajos encontraron dicha relación como adecuada para la degradación de hidrocarburos (Stegmann *et al.*, 1991; Namkoong *et al.*, 2002). La dosis aplicada de compost en los tratamientos bioestimulación orgánica fue de 1,2 kg. La dosificación del compuesto microbiano utilizado en los tratamientos de bioaumentación se basó en las dosis óptimas recomendadas por el laboratorio fabricante: la dosis inicial fue de 2 g.m<sup>-2</sup>

<sup>3</sup>.g HTP, mientras que la dosis de mantenimiento aplicada cada 15 días fue de 0,5 g.m<sup>-3</sup>.g HTP, durante el primer mes.

En el tratamiento de fitorremediación se sembró *Lolium multiflorum* L. con una densidad de 50 grm<sup>-2</sup>, ajustándose el contenido de agua del suelo mediante el riego durante 1 mes hasta la implantación de la pastura. Posteriormente se mantuvo el ensayo con las condiciones ambientales del sitio.

## **Muestreo**

Se extrajeron muestras simples a una profundidad de 0-20 cm para cada uno de los tratamientos. El muestreo se realizó en el tiempo 0 (T0), al mes (T1), a los 3 meses (T3) y a los 6 meses (T6) de haber comenzado el ensayo.

## **Determinaciones analíticas**

Se realizaron las siguientes determinaciones físicas, químicas y microbiológicas para todos los ensayos: Textura: se determinó a través del análisis de tamaño de partícula propuesta por Boyoucos (1927) y se expresó como % de arena (%A), arcilla (%AR) y limo (%L); Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP): se determinaron mediante el método EPA 418,1 (1978); pH: se efectuó mediante la utilización de un electrodo de vidrio precalibrado sobre una suspensión suelo: agua de 1:2,5 (Page ,1982); nitratos (NO<sub>3</sub>): según el método de diazotación con Snedd (Page ,1989); Fósforo extractable (P): fue determinado según la metodología propuesta por Bray y Kurtz (1945) y Carbono orgánico total (COT): fue evaluado utilizando el método de oxidación húmeda de Walkley y Black (Nelson y Sommers, 1982).

Las determinaciones microbiológicas fueron: Carbono de la biomasa microbiana (CBM): se determinó por el método de fumigación extracción propuesto por Vance *et al.* (1987); Respiración basal (Resp): se incubaron 20 g de suelo fresco en condiciones óptimas de temperatura (25 °C) y humedad (90 %) durante 7 días, según lo propuesto por Jenkinson y Powlson (1976). Hidrólisis de (FDA): se incubó el suelo con diacetato de fluoresceína, se determina la fracción coloreada liberada metabólicamente, midiendo absorbancia a la longitud de onda de 439 nm de las soluciones de FDA obtenidas (Adam y Duncan 2001).

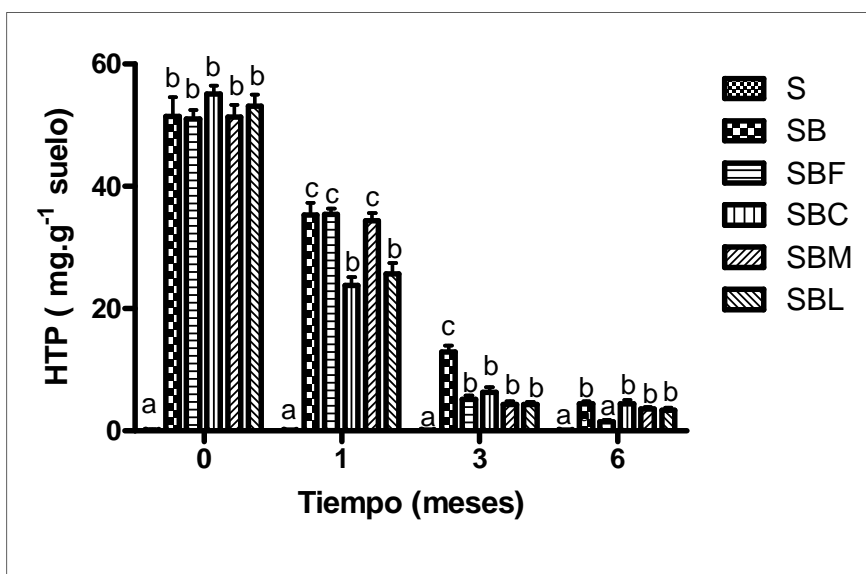
## Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el programa estadístico INFOSTAT 1.1. (Infostat, 2002) mediante análisis de varianza y Test de Tukey para comparar medias entre tratamientos ( $P < 0,05$ ), y se efectuó una matriz de correlación entre las variables estudiadas.

## Resultados y discusión

### Contenido de hidrocarburos

En la Figura 1 se observan los valores medios de HTP y sus respectivos desvíos estándar. Al inicio del ensayo puede observarse que entre los tratamientos contaminados no se encuentran valores estadísticamente significativos, parten de un mismo nivel de contaminación.



**Figura 1.** Valores medios de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) para los tratamientos y tiempos de muestreo analizados. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos para cada tiempo de muestreo. S: testigo, SB: atenuación natural, SBF: estimulación inorgánica, SBC: bioestimulación orgánica, SBM: bioaumentación, SBL: fitorremediación.

En T1 se puede observar que entre los tratamientos contaminados el de bioestimulación orgánica (SBC) y fitorremediación (SBL) presentaron valores de menor



nivel de HTP estadísticamente significativos. Es decir que al mes de realizada la contaminación lograron degradar más rápidamente el biodiésel. En el tratamiento de fitorremediación, el establecimiento de las plántulas y de la actividad rizosférica, junto con el riego que se aplicó durante este período de manera de favorecer la implantación de la pastura, podrían ser los factores que generaron una mayor actividad biológica acelerando el proceso degradativo del contaminante.

En los tratamientos de estimulación inorgánica (SBF), atenuación natural (SB) y bioaumentación (SBM), la disminución del pH del suelo podría ser la causa de que no se exprese el potencial degradativo de las bacterias inoculadas como las nativas. Respecto a la bioestimulación inorgánica, Seklemova *et al.* (2001) en un ensayo a campo encontraron que el contenido de nutrientes no tiene efecto en la descontaminación en suelos forestales contaminados con diésel. Sin embargo Gallego *et al.*, (2002) evaluaron las técnicas de bioremediación *in situ* y demostraron que con la adición de nitrógeno y fósforo es posible degradar hasta 90 % del contenido de diésel en el suelo.

En T3 el tratamiento de atenuación natural (SB) resultó ser el tratamiento menos eficiente en la degradación del biodiésel, diferenciándose estadísticamente de los restantes tratamientos. Esto mismo fue corroborado por Romaniuk *et al.*, (2007) al comparar diferentes técnicas de remediación, utilizando diferentes productos comerciales en suelos contaminados con diferentes hidrocarburos: el tratamiento de atenuación natural resultó ser el más lento y menos eficiente. Sin embargo algunos autores han considerado dicha técnica de remediación como "costo-efectiva", y de bajo riesgo (Corona-Ramírez e Iturbe-Argüelles, 2005). Los restantes tratamientos (SBC, SBF, SBM, SBL) no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Sin embargo, en el Cuadro 4.1 se observa que solo los tratamientos (SBC, SBM, SBL) lograron a los 3 meses niveles de HTP a partir de los cuales un suelo se considera remediado, según las normas holandesas:  $5 \text{ mg.g}^{-1}$  de HTP (Frank, 1999). Bento *et al.* (2005) destacaron a la bioaumentación como una de las técnicas con mayor eficiencia para la descontaminación de diésel en el suelo. A los 6 meses (T6) todos los tratamientos lograron valores inferiores a los  $5 \text{ mg.g}^{-1}$  de HTP. Sin embargo el tratamiento de bioestimulación orgánica (SBC) presentó un valor estadísticamente similar a la situación testigo, con valores de HTP inferiores estadísticamente significativos, a los restantes tratamientos.

En el Cuadro 2 se presenta la evolución del contenido de HTP para los tratamientos a lo largo del tiempo de remediación, en él se muestra el análisis estadístico entre tiempos de muestreo.

**Cuadro 2.** Valores medios de HTP para todos los tratamientos y diferencias encontradas entre los distintos momentos de muestreo. Todos los tratamientos mostraron un descenso estadísticamente significativo entre T0 y T3. Sin embargo entre T3 y T6 no se observó diferencias estadísticas.

		<b>Tiempo (meses)</b>			
		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>
<b>Tratamientos</b>	<b>S</b>	0,10 a	0,05 a	0,11 a	<b>0,5 a</b>
	<b>SB</b>	51,36	35,33 b	12,91	<b>4,37 a</b>
	<b>SBF</b>	55,08	35,39 b	6,34 a	<b>4,37 a</b>
	<b>SBC</b>	50,99	23,84 b	<b>4,27 a</b>	<b>1,46 a</b>
	<b>SBM</b>	53,13	25,64 b	<b>4,90 a</b>	<b>3,37 a</b>
	<b>SBL</b>	53,31	34,34 b	<b>4,28 a</b>	<b>3,57 a</b>

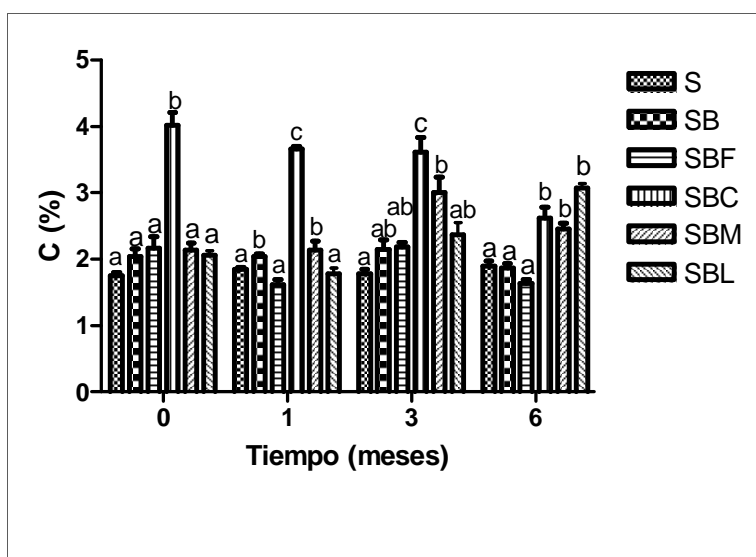
Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) de HTP entre tiempo de muestreo para cada tratamiento. S: testigo, SB: atenuación natural, SBF: estimulación inorgánica, SBC: bioestimulación orgánica, SBM: bioaumentación, SBL: fitorremediación.

## **Variables físico químicas del suelo**

El contenido medio de carbono oxidable para los distintos tratamientos y muestreos se presenta en la Fig. 2. El contenido de carbono en el suelo es indicador de la fertilidad de este. En T0 la incorporación de un sustrato orgánico en el tratamiento de bioestimulación orgánica produjo un lógico incremento, diferenciándose estadísticamente de los restantes tratamientos. Sin embargo los demás tratamientos no presentaron diferencias significativas entre los sí.

En T6 se observa que los tratamientos de bioaumentación (SBM), bioestimulación orgánica (SBC) y fitorremediación (SBL) mostraron los mayores valores de carbono, estadísticamente significativos, respecto a los demás tratamientos y al testigo. Este comportamiento, ya avanzado el ensayo, podría deberse a una concentración de cadenas parcialmente descompuestas (Serrano *et al.*, 2006).

En el Cuadro 3 se presenta el análisis estadístico del contenido de carbono en T0, sin considerar al tratamiento de bioestimulación orgánica. Puede observarse que los tratamientos contaminados con biodiésel presentan valores estadísticamente superiores al testigo, demostrando que parte de los hidrocarburos son considerados en la determinación del carbono del suelo.



**Figura 2.** Valores medios del carbono oxidable (%) para los tratamientos y tiempos de muestreo analizados. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P<0,05$ ) entre tratamientos para cada tiempo de muestreo. S: testigo, SB: atenuación natural, SBF: estimulación inorgánica, SBC: bioestimulación orgánica, SBM: bioaumentación, SBL: fitorremediación.

**Cuadro 3.** Contenido de carbono orgánico (%) en T0.

	S	SB	SBF	SBM	SBL
% C	1,75 a	2,04 b	2,07 b	2,14 b	2,17 b

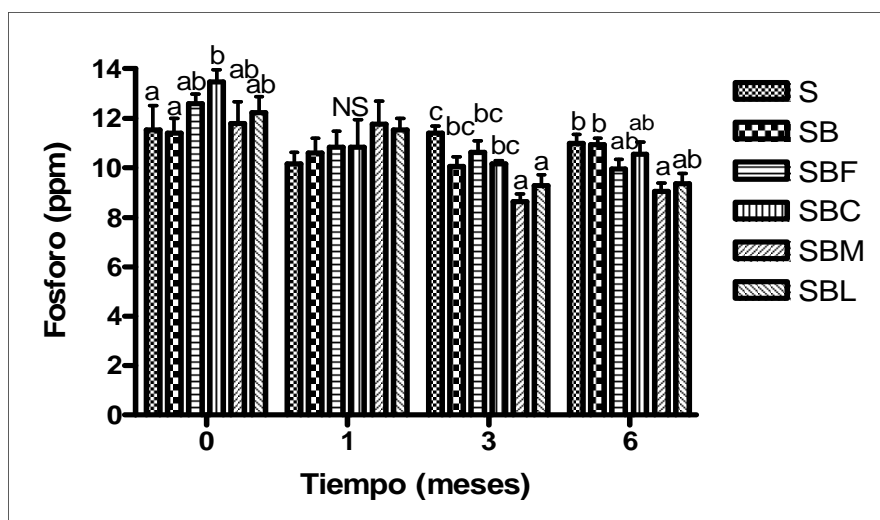
Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P<0,1$ ) entre tratamientos. S: testigo, SB: atenuación natural, SBF: estimulación inorgánica, SBC: bioestimulación orgánica, SBM: bioaumentación, SBL: fitorremediación.

## Nutrientes

En la Figura 3 se presentan los valores medios de fósforo en el suelo con sus respectivos desvíos estándar. En T0 solo el tratamiento de bioestimulación orgánica presentó valores superiores diferenciándose estadísticamente de los restantes tratamientos. Esto resulta lógico debido a la incorporación de un sustrato orgánico rico en nutrientes. (Cuadro 3). En T3 los tratamientos contaminados SBM y SBL presentaron niveles más bajos estadísticamente significativos de fósforo respecto del testigo. Esto podría estar asociado a la utilización del fósforo por parte de la biomasa microbiana involucrada en la degradación del biodiésel, y de las plantas en SBL para

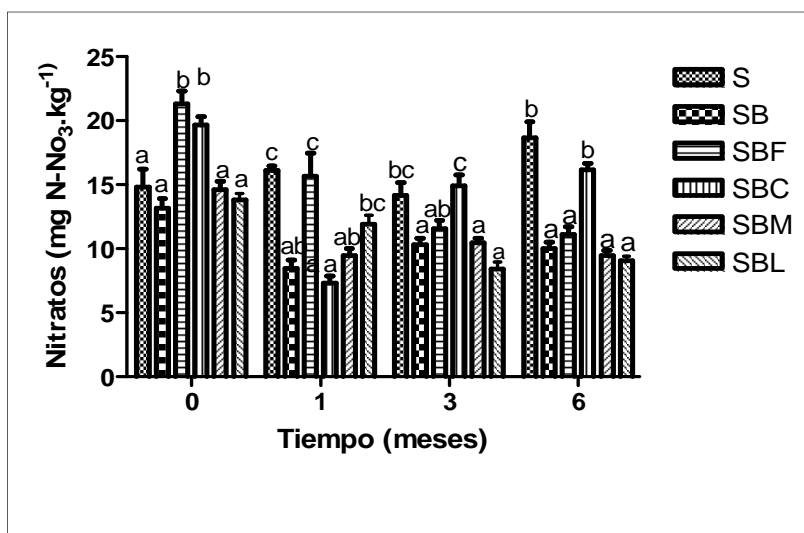
el desarrollo de la biomasa forrajera y por la proliferación de microorganismos que se generan en la rizósfera producto de los exudados radicales.

En T6 el tratamiento de bioaugmentación (SBM) presentó el nivel más bajo de fósforo en suelo estadísticamente significativo.



**Figura 3.** Valores medios del contenido de fósforo en el suelo para los tratamientos y tiempos de muestreo analizados. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos para cada tiempo de muestreo. S: testigo, SB: atenuación natural, SBF: estimulación inorgánica, SBC: bioestimulación orgánica, SBM: bioaugmentación, SBL: fitorremediación.

En la Figura 4 se presentan los valores medios de nitratos en suelo. Al principio del ensayo (T0) se observa que solo los tratamientos estimulados con fertilizante (SBF) y el tratamiento bioestimulado con compost (SBC) presentan valores estadísticamente superiores al resto. Esto resulta lógico ya que el fertilizante incorporado es la urea, a base de nitrógeno, y en el caso de compost debido a la presencia de sustancias nitrogenadas de fácil metabolización.



**Figura 4.** Valores medios del contenido de nitratos en suelo para los tratamientos y tiempos de muestreo analizados. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos para cada tiempo de muestreo. S: testigo, SB: atenuación natural, SBF: estimulación inorgánica, SBC: bioestimulación orgánica, SBM: bioaumentación, SBL: fitorremediación.

Al mes (T1) se observa que el tratamiento estimulado a base de fertilizante (SBF) presentó el mayor nivel de nitrógeno. El tratamiento de bioestimulación orgánica (SBC) presentó el menor nivel de nitratos en suelo. La disminución respecto de T0 y el menor nivel presentado en T1 podrían estar asociado a la utilización del nitrógeno por la abundante biomasa microbiana propia del compost.

En T3 el tratamiento bioestimulado con compost (SBC) presentó el mayor nivel de nitrógeno, revirtiendo el menor nivel en T1. Este comportamiento podría estar asociado por un lado a la mineralización de la abundante materia orgánica, poniendo en disponibilidad sustancias carbonadas y por otro lado, en dicho momento se encontraron los menores niveles de HTP en suelo, por lo cual las sustancias carbonadas presentes en el biodiésel comienzan a ser limitantes produciendo una disminución del tamaño de la biomasa microbiana, liberando el nitrógeno que tenían inmovilizado.

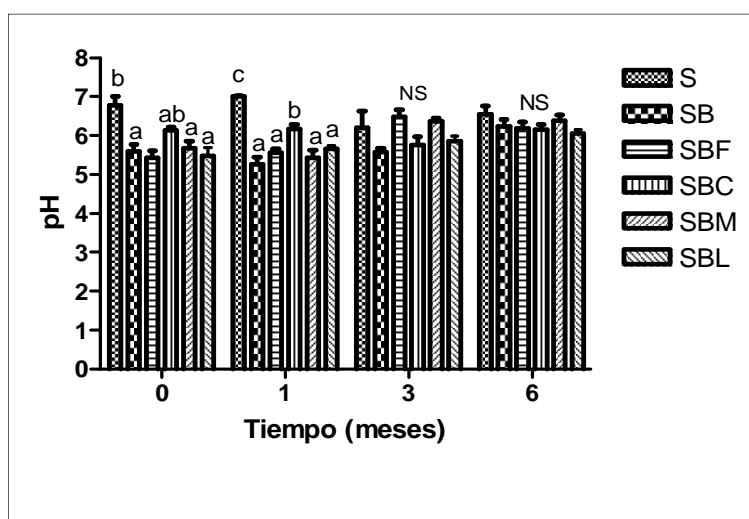
Los menores niveles de nitratos que resultaron estadísticamente significativos fueron presentados por los tratamientos de bioaumentación (SBM), atenuación natural (SB) y fitorremediación (SBL).

En T6 el tratamiento testigo (S) y bioestimulación con compost (SBC) presentaron los mayores niveles de nitratos en suelo diferenciándose estadísticamente de los restantes tratamientos. En el caso del compost esta mayor disponibilidad de nitratos se debe a la liberación de los nitratos que estaban inmovilizados en la biomasa, en el

caso del tratamiento testigo podría deberse a la mineralización de la materia orgánica del suelo.

En la Figura 5 se muestran los valores medios y el desvío estándar del pH del suelo. Al inicio del ensayo (T0) la contaminación con biodiésel en los diferentes tratamientos de contaminación produjo una disminución estadísticamente significativa en el valor de pH del suelo respecto a la situación testigo en todos los tratamientos, excepto la bioestimulación orgánica (SBC).

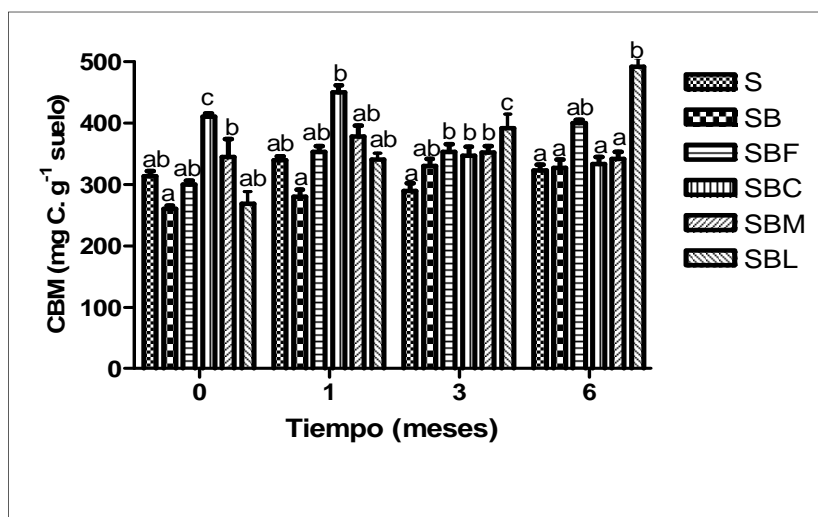
En T1, los tratamientos mostraron similar comportamiento que en T0, con SBC con un pH más cercano a la neutralidad, pero todos los tratamientos resultaron con valores menores, estadísticamente significativos, respecto al testigo. Sin embargo en T3 y T6 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos.



**Figura 5.** Valores medios del pH del suelo para los tratamientos y tiempos de muestreo analizados. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos para cada tiempo de muestreo. S: testigo, SB: atenuación natural, SBF: estimulación inorgánica, SBC: bioestimulación orgánica, SBM: bioaumentación, SBL: fitorremediación.

### Variables microbiológicas

En la Figura 6 se presentan los valores medios de carbono de la biomasa microbiana (CBM), indicador del tamaño de la población microbiana en el suelo. Al inicio del ensayo puede observarse que el tratamiento estimulado con compost (SBC) presentó el mayor valor seguido por la bioaumentación (SBM), diferenciándose estadísticamente entre sí, con valores superiores al testigo (S).



**Figura 6.** Valores medios de carbono de la biomasa microbiana para los tratamientos y tiempos de muestreo analizados. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos para cada tiempo de muestreo. S: testigo, SB: atenuación natural, SBF: estimulación inorgánica, SBC: bioestimulación orgánica, SBM: bioaumentación, SBL: fitorremediación.

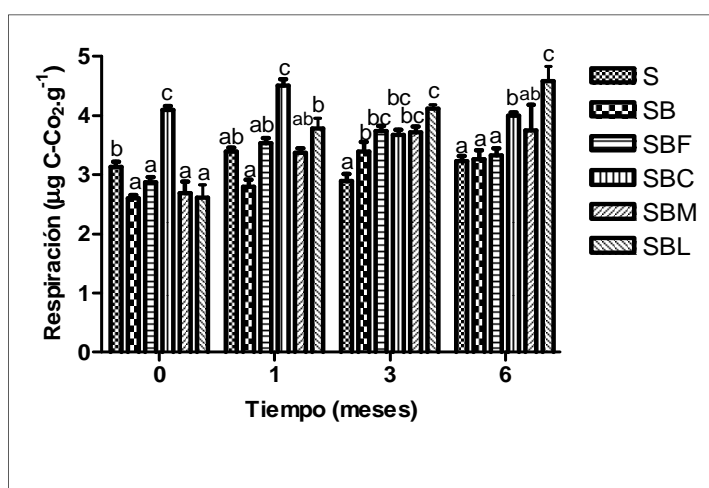
Al mes de la contaminación (T1) solamente el tratamiento estimulado con compost (SBC) presentó un mayor nivel estadísticamente significativo de biomasa microbiana. Boopathy (2000) planteó que como producto de la contaminación los microorganismos son afectados por el efecto tóxico que inhibe claramente la actividad metabólica en los primeros estadios de la contaminación. Sin embargo superado dicho período de estrés los microorganismos gradualmente se van adaptando al contaminante y los hidrocarburos son utilizados como fuente de carbono y energía.

A los tres meses (T3) los tratamientos estimulados con compost (SBC), fertilizado (SBF) y el tratamiento de bioaumentación (SBM) presentaron valores estadísticamente similares en cuanto a la población microbiana. Esto resulta lógico ya que en dicho momento hay menor valor de biodiésel (HTP), lo que produce una disminución en el tamaño de la población por deficiencias de estructuras carbonadas que son utilizadas como fuente de energía. Sin embargo, el tratamiento de fitorremediación presentó la mayor biomasa microbiana diferenciándose estadísticamente de los restantes tratamientos. Este incremento está asociado a la actividad biológica de los microorganismos de la rizósfera. Cunningham *et al.*(1996) encontraron que la mayor degradación de hidrocarburos ocurre alrededor de la rizósfera debido a que la planta exuda componentes orgánicos a través de las raíces, que incrementan la densidad, diversidad y actividad de los microorganismos alrededor de esta, y son

microorganismos degradadores de hidrocarburos. Esto mismo fue corroborado por Siciliano y Germida (1998).

A los 6 meses (T6), donde todos los tratamientos alcanzaron el nivel de descontaminación establecido por las normas holandesas, el tratamiento de fitorremediación (SBL) presentó el mayor nivel de biomasa microbiana con diferencia estadísticamente significativa respecto a los demás tratamientos. A pesar de tener bajos valores de HTP que son la fuente de carbono para los microorganismos, los exudados y secreciones de las plantas generan condiciones propicias para el desarrollo de una abundante biomasa microbiana.

En la Figura 7 se observan los valores medios de respiración del suelo, indicador de la actividad biológica de este. Al inicio del ensayo los tratamientos de estimulación inorgánica (SBF), atenuación natural (SB), bioaumentación (SBM) y fitorremediación (SBL) presentaron valores de actividad biológica estadísticamente inferiores a la situación testigo. Este comportamiento podría estar asociado a los cambios en el ambiente generados por la contaminación con biodiésel. Sin embargo el tratamiento bioestimulado con compost (SBC) presentó el mayor nivel de respiración, estadísticamente significativo, poniendo en evidencia la mayor actividad biológica. Esto resulta lógico debido a la incorporación del compost que introdujo una gran masa y diversidad de microorganismos, por ello los mayores niveles de CBM y con la incorporación de un sustrato rico en carbono y nutrientes, se generaron las condiciones óptimas para el desarrollo de la actividad heterotrófica. Por ello esta mayor actividad biológica y población microbiana (CBM) se tradujeron en una rápida disminución de biodiésel en el suelo (Figura 4).



**Figura 7.** Valores medios de respiración basal para los tratamientos y tiempos de muestreo analizados. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamietos para cada tiempo de muestreo. S: testigo, SB: atenuación natural, SBF: estimulación inorgánica, SBC: bioestimulación orgánica, SBM: bioaumentación, SBL: fitorremediación.

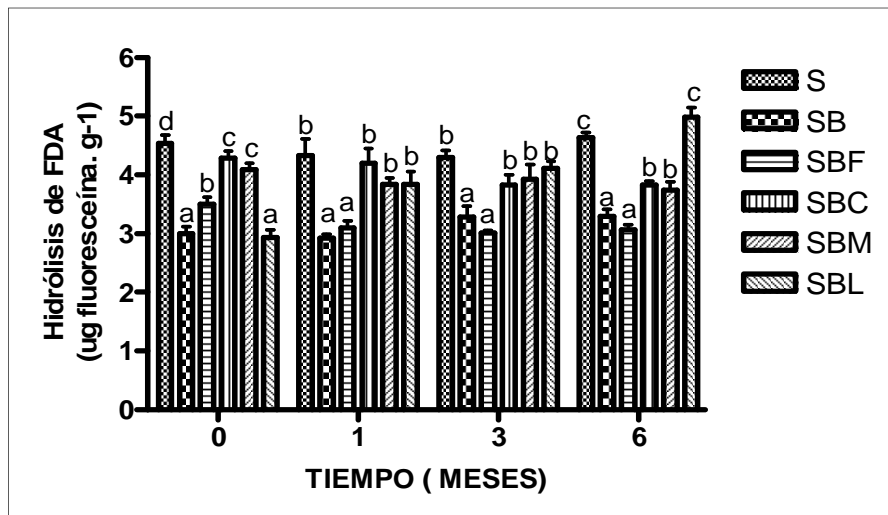


En T1 se observa que SBC presenta niveles estadísticamente superiores de actividad respiratoria, actuando en la degradación del biodiésel, y en el tratamiento de atenuación natural (SB) presentó el menor nivel de respiración en comparación de los restantes tratamientos. En T3 y en T6 el tratamiento de fitorremediación (SBL) presentó los mayores niveles de respiración microbiana. Esta alta actividad biológica está asociada al efecto de la actividad promovida por las sustancias carbonadas secretadas por las raíces, ya que el biodiésel presenta un bajo nivel en dicho momento de muestreo (Figura 1).

En T6 debe destacarse el segundo nivel más elevado en respiración presentado por el tratamiento de bioestimulación orgánica (SBC), con valores superiores estadísticamente significativos respecto a atenuación natural (SB) y bioestimulación inorgánica (SBF). Esto está asociado a los aportes de carbono de la materia orgánica ya que el contenido de biodiésel en este momento de muestreo en el suelo presenta niveles muy bajos.

### **Hidrólisis de diacetato de fluoresceína**

En la Figura 8 se presentan los valores medios de hidrólisis de diacetato de fluoresceína (Adam y Duncan, 2001) que es aceptado como un método preciso y simple para determinar la actividad biológica del suelo. Las enzimas responsables de la hidrólisis de FDA no son específicas, sino que en este proceso están involucradas esterasas, proteasas y lipasas que participan en la descomposición de los residuos y ciclado de nutrientes. Al inicio del ensayo (T0) la contaminación con biodiésel produjo que todos los tratamientos contaminados presentaran valores estadísticamente menores que los del testigo (S) de hidrólisis de FDA poniendo en evidencia que la contaminación tuvo un efecto negativo sobre la actividad enzimática del suelo.



**Figura 8.** Valores medios de hidrólisis de diacetato de fluoresceína para los tratamientos y tiempos de muestreo analizados. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamientos para cada tiempo de muestreo. S: testigo, SB: atenuación natural, SBF: estimulación inorgánica, SBC: bioestimulación orgánica, SBM: bioaumentación, SBL: fitorremediación.

El tratamiento de bioestimulación orgánica (SBC) y de bioaumentación (SBM) presentará la mayor actividad en la hidrólisis de FDA. El agregado de compost, además de incorporar una abundante biomasa de microorganismos también aporta nutrientes y una gran capacidad buffer. Esto mismo fue encontrado por Lee *et al.*, (2008), quienes al comparar diferentes sustratos encontraron que la incorporación de compost presentó el mayor nivel de hidrólisis de FDA. Ellos plantean que esta mayor actividad enzimática se debe al alto contenido de carbono de fácil degradación propio del compost. Además Wellman *et al.*, (2001) reportan que la incorporación de materia orgánica provee una mejora en las propiedades físicas y químicas como la aireación, la capacidad de retención de agua, el pH, el intercambio catiónico y que esto influye en la población microbiana y puede estimular la capacidad degradadora de hidrocarburos. La mayor actividad en el tratamiento de bioaumentación está asociada a la incorporación de bacterias degradadoras de hidrocarburos.

Al mes (T1) los tratamientos bioestimulación orgánica (SBC), bioaumentación (SBM) y fitorremediación (SBL) presentaron niveles estadísticamente semejantes al testigo con referencia a la hidrólisis de FDA. En estos tratamientos la disminución del contenido del biodiésel HTP estuvo acompañada con un aumento en la respiración del suelo y una mayor biomasa microbiana. En los casos del tratamiento SBC y SBM la mayor actividad fue explicada en el párrafo anterior, y para SBL se corresponde a la promoción de la actividad biológica por parte de los exudados radicales. La situación

testigo era de esperarse que presente un alto nivel debido a que no se la contaminó con biodiésel. En T3 los tratamientos mostraron el mismo comportamiento que en T1. Al finalizar el ensayo en T6, el tratamiento de fitorremediación (SBL) presentó el mayor nivel estadísticamente significativo de hidrólisis de FDA junto con la situación testigo. Esta mayor actividad en el tratamiento fitorremediado está asociada no solo a las secreciones radiculares, sino también a las mejores condiciones generales del suelo. A pesar de que el FDA es tenido en cuenta como un indicador de biodegradación en los suelos contaminados con hidrocarburos, Lee *et al.* (2008) no lo consideraron como una medida para estimar la biorremediación porque en sus ensayos no observó una disminución de la hidrólisis de FDA después de lograr reducir los HTP. Esto mismo fue observado en el tratamiento de fitorremediación (SBL) a pesar de que presentó valores muy bajos de HTP la hidrólisis del FDA continuó incrementándose. Podría ser que al encontrarse el medio natural libre de hidrocarburos, vuelve a su equilibrio y se aumenta la actividad microbiana.

Los tratamientos de bioaumentación (SBM) y bioestimulación orgánica (SBC) mostraron valores intermedios significativos de actividad biológica. Para SBM puede haber una disminución del contenido de cadenas carboxílicas, fuente de energía debido de los bajos niveles de HTP. Sin embargo en el caso de SBC, a pesar de que mostró una elevada biomasa microbiana y elevado nivel de respiración no presentó el mayor nivel de hidrólisis de FDA (Rios *et al.*, 2014).

La baja actividad encontrada en el tratamiento de atenuación natural (SB) se contrapone con lo encontrado por Bento *et al.* (2005) que observaron un continuo incremento en la actividad enzimática hasta el final del experimento.

## **Análisis de correlación entre las variables más relevantes**

En el Cuadro 4 se presenta en el análisis de correlación entre las variables más relevantes dentro de las variables físicas, químicas y microbiológicas:

- La respiración correlacionó en manera positiva con el carbono de la biomasa microbiana y contenido de carbono del suelo y negativamente con el contenido de nitratos.
- El contenido de HTP correlacionó de manera negativa con el pH y positiva con el contenido de nitratos.

- La hidrólisis del FDA correlacionó en forma negativa con el contenido HTP y positivamente se relacionó con el pH, el contenido de carbono (%), respiración y el carbono de la biomasa microbiana.

El contenido de HTP correlacionó en forma positiva con el contenido de nitratos y en forma negativa con el pH de suelo. La contaminación con biodiésel tuvo un efecto negativo sobre el pH del suelo, es decir, que los tratamientos que tuvieron mayores niveles de biodiésel presentaron menores niveles de pH en el suelo, poniendo en evidencia los cambios ambientales que genera la contaminación. La disminución del contenido de hidrocarburos va acompañada de una disminución del contenido de nitratos, resultando lógico ya que los nitratos son fuente esencial para el desarrollo de la biomasa microbiana encargada de la degradación del contaminante (Ríos, 2013).

Existió una fuerte correlación positiva de la respiración con el CBM. Es decir, que el mayor tamaño de la comunidad microbiana (CBM) estuvo acompañada de una mayor actividad biológica. Esta misma correlación fue encontrada por Yao *et al.* (2000) y corroborada por Dawson *et al.* (2007). La respiración se correlacionó en forma positiva con el carbono del suelo. Es decir, que la actividad biológica se ve estimulada con mayor fertilidad del suelo, el carbono orgánico es fuente esencial de energía y nutrientes para el desarrollo de la actividad biológica y multiplicación celular. La respiración se correlacionó en forma negativa con el contenido de nitratos en el suelo. Esta relación confirma que los nitratos son esenciales para los microorganismos ya que ante el incremento de la biomasa microbiana se observó una disminución de dicho nutriente.

**Cuadro 4.** Matriz de correlación de las variables físicas, químicas y microbiológicas involucradas en la

Parámetros		Físico - Químicas					Microbiológicas		
		HTP	pH	Ce	%C	P	CBM	Resp	FDA
Físico - Químicas	HTP	1							
	pH	-0,54**	1						
	% C	-0,16	0,003	0,27*	1				
	NO <sub>3</sub>	0,28*	0,22	0,31*	-0,23				
	P	0,67**	-0,31*	0,46*	-0,23*	1			
	CBM	-0,28	0,13	0,20	0,62 **	-0,17	1		
Microbiológico	Resp	-0,28	0,07	0,20	0,66**	-0,20	0,94 **	1	
	FDA	-0,37**	0,42**	-0,07	0,46**	-0,09	0,43**	0,43**	1

suelo; Ce conductividad eléctrica; %C carbono orgánico; NO<sub>3</sub> nitratos, P fósforo Bray Kurtz; CBM carbono de la biomasa microbiana; Resp respiración; FDA hidrólisis de diacetato de fluoresceína. \*P< ,05, \*\*P<0,01

La correlación entre hidrólisis de FDA y respiración fue encontrada por Lee *et al.* (2008), sin embargo, dichos autores no encontraron correlación del FDA con el tamaño de la población microbiana. También se encontró que la hidrólisis de FDA se vio estimulada con mayores contenidos de carbono del suelo, es decir, que cuanto mayor materia orgánica presenta el suelo se favorece la actividad enzimática. Además se determinó que el contenido de HTP afecta negativamente la actividad enzimática y como consecuencia el ciclado de nutrientes.

En el Cuadro 5 se presentan los valores resultantes de la correlación entre FDA entre los diferentes momentos de muestreo y el contenido de HTP. Puede observarse que a lo largo del ensayo la actividad enzimática estuvo afectada de manera negativa respecto del contenido de HTP en el suelo. Esto pone en evidencia la sensibilidad que presenta dicha técnica.

**Cuadro 5.** Coeficiente de correlación entre HTP y FDA en los diferentes momentos de muestreo.

Tiempo	coeficiente de correlación	nivel de significancia
0	-0,56	0,02
1	-0,75	0,004
3	-0,59	0,01
6	-0,49	0,04

## Conclusiones

Los tratamientos de estimulación orgánica (SBC), bioaumentación SBM y fitorremediación (SBL) resultaron ser los tratamientos más eficientes ya que lograron a los 3 meses el nivel de remediación.

El contenido de HTP correlacionó con el pH y nitratos. La contaminación con biodiésel produjo una disminución del pH del suelo, el cual se fue incrementando con la disminución del contenido de biodiésel. El contenido de nitratos al inicio del ensayo en el suelo fue superior en los tratamientos estimulados con compost y fertilizante. La degradación de biodiésel estuvo acompañada de un marcado descenso en el contenido de nitratos en el suelo que podría deberse a la inmovilización de dicho nutriente por parte de la abundante biomasa microbiana.

La hidrólisis de FDA correlacionó con el pH, %C, respiración, carbono de la biomasa microbiana y contenido de HTP. La relación negativa de la hidrólisis FDA con el HTP y la biomasa microbiana sugiere que las variables microbiológicas son sensibles a los efectos perjudiciales de la contaminación.

## Bibliografía

- ADAM, G.; DUNCAN, H. 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbiol activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol. Biochem.* 33, 943–951.
- ALVEAR, M.; URRRA, C.; HUAQUILAO, R.; ASTORGA, M.; REYES, F. 2007. Biological activities and aggregates stability in a soil from Chilean temperate forest under two successionalstages and seasonal changes. *J. Soil Sc. Plant Nutr.* 7 (3) 200 (38-50).
- ATLAS R.M. 1991. Microbial hydrocarbon degradation—bioremediation of oil spills. *Journal of Chem. Techn. Biotechn.* 52,149–156.
- BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* fluorescence isolated from a petroleum contaminated soil. *Environ. Int.* 26, 413–416.

- BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. 2005. Comparative bioremediation of soil contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation. *Biores. Techn.* 96. 1049- 1055.
- BOOPATHY, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Biores. Techn.* 74. 63-67.
- BRAY, R.H.; KURTZ, L.T. 1945. Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Sci.* 59, 39-45.
- CARDONA VILLADA, W. 2007. Biocombustibles: verdades y mitos. (Disponible:[www.chilecientifico.cl/index](http://www.chilecientifico.cl/index) Visitado el 12 de marzo de 2016.
- CSIC. CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, ESPAÑA. 2007. Usos alternativos para lodos procedentes de la depuración de aguas residuales urbanas: biorrecuperación de suelos contaminados con hidrocarburos en ambientes semiáridos. (Disponible: [http://www.biorrehid.cebas.csic.es/ant\\_fitorremediacion.html](http://www.biorrehid.cebas.csic.es/ant_fitorremediacion.html). Visitado el 25 de octubre de 2016.
- CORONA-RAMIREZ, L.; ITURBE-ARGUELLES, R. 2005. Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ingeniería Investigación y Tecnología VI. 2.* 119-126.
- CUBILLOS, J.; PULGARÍN, P.; GUTIÉRREZ, J.; PAREDES, D. 2014. Fitorremediación en aguas y suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. *Ingeniería y Competitividad*, vol. 16 (1): 131-146.
- CHAINEAU, C.H.; MOREL, J.L.; OUDOT, J. 1995. Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings. *Envir. Sci. Techn.* 29, 1615–1621.
- CHAINEAU, C.H.; MOREL, J.L.; OUDOT, J. 2000. Biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of Maize (*Zea mays* L.). *J. Envir. Qual.* 29, 569–578.
- DAWSON, J.J.C.; GODSIFFE, E.J.; THOMPSON, L.P.; RALEBITSO-SENIOR, T.K.; KILLHAM, K.S.; PATON, G.I. 2007. Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. *Soil Biol Biochem.* 39. 164-177.
- DEMELLO, J.A.; CARMICHAEL, C.A.; PEACOCK, E.E.; NELSON, R.K.; AREY, J.S.; REDDY, C.M. 2007. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea an initial study. *Mar.Poll.Bull.* 54,894–904.
- DEMIRBAS, A. 2007. Importance of biodiesel as transportation fuel. *Energ. Policy* 35, 4661–4670.
- DEMIRBAS, A. 2009. Political, economic and environmental impacts of biofuels: a review. *Appl. Energy* 86, 108–S117.
- DORAN, J.W.; PARKIN, T.B. 1996. Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. En: Doran, J.W.; Jones, A.J. (ed.). *Methods for Assessing Soil Quality. SSSA Special Pub. 49, Soil Sci. Soc. Am., Madison, WI*, pp. 25-37.
- EHRENRIK, P.; BEHREND, A.; HARDER, J.; WIDDEL, F. 2000. Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 173: 58–64.
- EPA METHOD 418.1. 1978. Test method for evaluating total recoverable petroleum hydrocarbon (spectrophotometric, infrared). United States Government Printing Office, Washington, D. C., p. 9.
- GALLEGO, L.R.; LAREDO, J.; LLAMAS, J.F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. 2002. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation.* 12: 325–335.
- GILLER, K.E.; BEARE, M.H.; LAVELLE, P.; IZAC, A.M.N.; SWIFT, M.J. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Appl. Soil Ecol.* 6, 3–16.

- GREGORICH, E.G.; CARTER, M.R.; ANGERS, D.A.; MONREAL, C.M.; ELLERT, B.H. 1994. Towards a minimum data set to Assess soil organic matter quality in Agricultural soils. *Can. J. Soil Sci.* 74, 367–385.
- GRISHCHENKOV, V.G.; TOWNSEND, R.T.; McDONALD, T.J.; AUTENRIETH, R.L.; BONNER, J.S., BORONIN, A.M. 2000. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process. Biochem.* 35: 889–896.
- HAWROT-PAW, M.; MARTYNUSPOLISH, M. 2011. The Influence of Diesel Fuel and Biodiesel on Soil Microbial Biomass. Short Communication. *J. of Envir. Stud.* 20 (2): 497-501.
- HAYAT, S.; AHMAD, I.; AZAM, Z.M.; AHMAD, A.; INAM, A.; SAMIULLAH, S. 2002. Effect of longterm application of oil refinery waste water on soil health, with special reference to microbiological characteristics. *Bioresource Technology* 84, 159–163.
- INFOSTAT. VERSIÓN 1.1. 2002. Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina.
- JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.* 8: 209–213.
- LABUD, V.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T. 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere* 66:1863–1871.
- LEE, S-H.; OH, B-II.; KIM, J. 2008. Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. *Biores. Techn.* 99 2578–2587.
- LEMO, D.A.; CARDOSO, S.L.; VIEIRA, P.A.; CARDOSO, V.L. 2013. Bioremediation of Soil Contaminated with Biodiesel and Glycerin - Results of Soil Microbial Adaptation Through Evidence Contaminants Removal. *Chemical Engineering Transactions* Vol. 32: 463–468.
- LORENZ, K.; KANDELER, E.; 2005. Biochemical characterization of urban soil profiles from Stuttgart, Germany. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1373–1385.
- MAKAREVICIENE, V.; JANULIS, P. 2003. Environmental effect of rapeseed oil ethyl ester. *Renew. Energy* 28, 2395–2403.
- MARGESIN, R.; SHINNER, F. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3127–3133.
- MECKENSTOCK, R.U.; ANNWEILER, E.; MICHAELIS, W.; RICHNOW, H.H.; SCHINK, B. 2000. Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2743–2747.
- MEGHARAJ, M.; SINGLETON, I.; McCLURE, N.C.; NAIDU<sup>1</sup>, R. 2000. Influence of petroleum hydrocarbon contamination on microalgae and microbial activities in a long-term contaminated soil. *Archives in Envir. Contam. Toxic.* 38, 439–445.
- NAMKOONG, W.; HWANG, E.Y.; PARK, J.; CHOI, J. 2002. Bioremediation of diésel contamination soil whit composting. *Envir. Pollut.* 119. 23–31.
- NELSON, D.W.; SOMMERS, L.E. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. Page AL (Ed). *Methods of soil analysis. Part 2. Am.Soc. Agr.,EUA, Agronomy* 9, 539–579.
- Page AL. 1982. Ed. *Methods of soil Analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties.* 2nd Edition. Madison, Wisc. EUA, American Society of Agronomy (Agronomy Series n.º 9).
- PERFIL. 2008. Alerta en el río Paraná por un derrame de biodiésel. (Disponible: [http://www.perfil.com/contenidos/2008/02/15/noticia\\_0059.html](http://www.perfil.com/contenidos/2008/02/15/noticia_0059.html)) Visitado el 10 de mayo de 2016.
- PLAZA, G.; NATECZ-JAWAKI, G.; ULGIH, K.; BRIDMON, R.L. 2005. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere* 59, 289–296.



- POWLSON, D.S.; HIRSCH, P.R.; BROOKE, P.C. 2001. The role of soil microorganisms in soil organic matter conservation in the tropics. *Nutr. Cycl. Agroeco.* 61, 41–51.
- PRINCE, R.C.; HAITMANEK, C.; LEE, C.C. 2008. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. *Chemosphere* 71, 1446–1451.
- RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. 1999. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *Int. Biodet. Biod.* 44, 93–100.
- RÍOS, R.P.; KIRSANOV, N.; ROMANIUK, R.; GIUFFRÉ, L. 2010. Remediación de suelos contaminados con biodiésel: diversidad funcional microbiana. 2010 CIACVI. Congreso Iberoamericano de Ambiente y Calidad de Vida. 27 de septiembre al 1 de octubre, Catamarca 2010: 381.
- RÍOS, R.P. 2013. Biodiésel: estudio de su degradabilidad bajo atenuación natural y bioestimulada en suelo. Tesis de maestría.
- RÍOS, R.P.; GIUFFRÉ, L, ROMANIUK, R. 2014. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on remediation of biodiesel contaminated soils. *Journal of Agri-Food and Applied Sciences.* 2(7): 191–195.
- RISER-ROBERTS, E. 1998. Remediation of petroleum contaminated soil. Biological, physical and chemical processes. CRC Press LCC, Boca Raton, F-L.
- RODRÍGUEZ BAZÁN, J.M. 2009. Mitigación y biorremediación de suelos contaminados por el derrame de combustible diésel en la Quebrada del Toro, Camaná. (Disponible: [http://www.uap.edu.pe/Investigaciones/Esp/Revista\\_10\\_Esp\\_03.pdf](http://www.uap.edu.pe/Investigaciones/Esp/Revista_10_Esp_03.pdf). Visitado el 17 de abril de 2016.
- ROMANIUK, R.; BRANDY, J.F.; RÍOS, R.P.; GIUFFRÉ, L. 2007. Atenuación natural y remediación inducida en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ciencia del Suelo.* (Argentina). 25(2): 139–149.
- SARKAR, D., FERGUSON, M. DATTA, R.; BIRNBAUM, S. 2005. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution.* 136,( 1): 187–195.
- SATERBACK, A.; TOY, R.J.; McMMain, B.J.; WILLIAMS, M.P.; DORN, P.B.; 2000. Ecotoxicology and analytical assessment of effects of bioremediation on hydrocarbon-containing soils. *Envir. Toxicol. Chem.* 19, 2643–2652.
- SEKLEMOVA, E.; PAVLOVA, A.; KOVACHEVA, K.; 2001. Biostimulation based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation* 12, 311–316.
- SICILIANO, S.D.; GERMIDA, J.J. 1998. Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. *Environmental Reviews* 6, 65–79.
- SKIPPER, H.D. 1999. Bioremediation of contaminated soils. En: Sylvia, D.M. (ed.). *Principles and Applications of Soil Microbiology.* Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, pp. 469–481.
- SO, C.M.; YOUNG, L.Y. 2001. Anaerobic biodegradation of alkanes by enriched consortia under four different reducing conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:473–478.
- SPARLING, G.P.; SCHIPPER, L.A.; HEWITT, A.E.; DEGENS, B.P. 2000. Resistance to cropping pressure of two New Zealand soils with contrasting mineralogy. *Aus. J. Soil Res.* 38, 85–100.
- STEGMANN, R.; LOTTER, S.; HEERENKLAGE, J. 1991. Biological treatment of oil contaminated soils in bioreactors. En: Hinchee, R.E.; Offenbuttel, R.E. (ed.). *On-Site Bioremediation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon treatment.* Butterworth-Heinemann, Oxford, Reino Unido, pp. 188–208.
- SUNAR, N.M.; EMPARAN, Q.; KARIM, A.T.A.; NOOR, S.F.M.; MASLAN, M.; MUSTAFA, F.; KHALED, N. 2013. Bioremediation of Biofuel-Soil Contamination by Using *Pseudomonas putida*, *Advanced Materials Research*, Vol. 845, pp. 138–145.

- Ting, Y.P.; Hu.H.L.; Tan, H.M. 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbon in soil microcosms. *Resours. Environ. I Biotechn.* 2. 197–218.
- VAN DER WADER, J.J.; DIJKHUIS, E.D.; HENSSEN, M.J.C.; KEUNING, S. 1995. Enzyme assays as indicators for bioremediation. En: Hinchee, R. E., Douglas G.S., Ong, S. K. (Eds.), *Monitoring and verification of bioremediation*. Battelle Press, pp. 59–63.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19 (6):703–707.
- VERMA, S.; PRUTHI, R. 2006. Oil Slude degradation by bacteria from Ankleshwar, India. *Internat. Biodet. Biodeg.*57:207–213.
- WALECKA-HUTCHISON, C.M.; WALWORTH, J.L. 2006. Assessment of C:N Ratios and Water Potential for Nitrogen Optimization in Diesel Bioremediation. *Bioremediation Journal* Vol 10.
- WELLMAN, D.E.; ULERY, A.L.; BARCELONA, M.P.; DUERR-AUSTER, S. 2001. Animal waste-enhanced degradation of hydrocarbon- contaminated soil. *Soil and Sediment Contaminat.* 10, 511–523.
- WINDING, A.; HUND-RINKE, K.; RUTGERS, M. 2005. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotox. Environ. Safety.* 62, 230–248.
- ZAK, J.C.; WILLING, M.R.; MOORHEAD, D.L.; WILDMAN, H.G. 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1101–1108.
- ZHANG, X.; PETERSON, C.; RECE, D.; HAWS, R.; MOLLER, G. 1998. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. *Trans. ASAE.* 41: 1423–1430.
- ZHUO, E.; CRAWFORD, R. 1995. Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasolina biodegradation in soil. *Biodegradation* 6. 127–140.
- ZITRIDES, T. 1983. Biodecontamination of spill site. *Poll. Eng.* 15, 25–27..

## CAPÍTULO 12

### Biorremediación de suelos afectado por residuos

Lucrecia Brutti<sup>1</sup>, Marcelo Beltrán<sup>1</sup>, Ernesto Giardina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Suelos CIRN-INTA de los Reseros y Nicolás Repetto s/n 1686 Hurlingham, Buenos Aires,

<sup>2</sup>Cátedra de Edafología, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Av. San Martín 4453, Buenos Aires 1417, Argentina

### Introducción

#### Problemática de los residuos a nivel mundial

La situación mundial referida a los residuos es variada y complicada, los países industrializados poseen diversos sistemas de tratamientos para sus residuos y poseen residuos tóxicos difíciles de manejar si no se realiza separación en origen. Los países con poca industrialización han manejado el tema de maneras diversas y en muchos casos directamente no existen políticas definidas al respecto. Esto trae como consecuencia basurales a cielo abierto donde se disponen todo tipo de residuo sin clasificar y donde los tóxicos son distribuidos en el suelo y en las aguas superficiales y hasta en las profundas por medio de los lixiviados que genera el material orgánico. El aire se contamina por generación de biogás o por quemas espontaneas o intencionales liberando dioxinas y furanos. El método más usado es el destino final de los residuos en rellenos sanitarios instalados y manejados con menor o mayor tecnología aplicada correctamente o no (Tchobanoglous *et al.*, 1994; Seoanez Calvo *et al.*, 1999)

#### Problemática de los residuos a nivel nacional

Argentina hace varios años ha comenzado con la separación en origen de los residuos domiciliarios y el resultado mejor se ha alcanzado en centros urbanos pequeños. El material orgánico es el principal actor en la producción de líquidos lixiviados alcanzando proporciones de hasta el 50 % en la basura domiciliaria. La descomposición anaeróbica de los residuos orgánicos al interior del relleno libera agua y esta acarrea consigo contaminantes diversos y microorganismos de los demás residuos. Así mismo el relleno sanitario es un reactor anaeróbico que genera biogás cuya principal composición es el metano, gas que si se elimina a la atmósfera es altamente contaminante

## **Destino de los residuos (reciclado, reuso y reducción)**

La clasificación en origen del residuo urbano implica un nuevo destino que podría ser un reciclado como el caso de los envases de plástico, de cartón o de papel, también del orgánico cuando se destina a compostaje, elaboración de biogás o lombricompuesto. En ciertos casos con poco esfuerzo el residuo se reutiliza total o parcialmente como podría ser el caso de un electrodoméstico o de equipos electrónicos. En otros casos solo reducimos volumen por ejemplo armando fardos con los plásticos o también en el caso de algunos tratamientos citados para el material orgánico, compostaje, biogás, lombricompuesto su transformación también implica disminución de volumen y reuso (Alvarado *et al.*, 2010; Brutti, 2001; Brutti, 2003).

## **Legislación nacional y en la provincia de Buenos Aires Argentina**

La Ley N° 1854 Gestión integral de residuos sólidos urbanos (2006), conocida como “Basura Cero”, tiene como principio la reducción progresiva de la disposición final de los residuos sólidos urbanos. El Decreto 639/07 (09/05/2007) reglamenta la Ley N° 1854, mientras que el Decreto 760/08 (01/07/2008) aprueba la reglamentación del artículo 9 de esa ley, modifica el decreto 639/07 y designa la autoridad de aplicación, entre otros conceptos.

La resolución 40/2011 de gestión integral de residuos sólidos urbanos es la norma del Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible (OPDS) que marca el procedimiento para que los municipios de la provincia de Buenos Aires presenten sus programas de gestión integral de residuos sólidos urbanos.

La Resolución N°1143/2002 dictada por el Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible (OPDS) regula la disposición de residuos sólidos urbanos (RSU) en rellenos sanitarios. Indica que estos deberán establecerse “en áreas cuya zonificación catastral sea Rural” y cómo deben ser la aislación de su base y taludes laterales, entre otros varios aspectos.

La Ley N° 13.592 Gestión integral de residuos sólidos urbanos (2006/2007) las bases de la gestión residuos sólidos y delimita las responsabilidades del gobierno provincial y los municipios. Por su parte, la Ley 13.657 suspende el artículo 12° y modifica el 8° de la Ley 13.592 y otorga más plazo para que los municipios “manifiesten su continuidad o no con lo estipulado en el artículo 3° de la norma precitada y notificar de ello a CEAMSE y a la Autoridad Ambiental Provincial”.

La Ley 25.916 Gestión de residuos domiciliarios (desde 2004) establece que los centros de disposición final son los “especialmente acondicionados y habilitados por la autoridad competente para la disposición permanente de los residuos” y pide para su habilitación “la aprobación de una Evaluación de Impacto Ambiental, que contemple la ejecución de un Plan de Monitoreo de las principales variables ambientales durante las fases de operación, clausura y postclausura” de los rellenos sanitarios. Da plazo hasta 2019 (15 años) para la adecuación de las distintas jurisdicciones al conjunto de disposiciones de la ley.

Define al Consejo Federal de Medio Ambiente (COFEMA) como el “organismo de coordinación interjurisdiccional” en cuanto al manejo de residuos urbanos.

La Ley 25.675 Política ambiental nacional (desde 2002) le da marco al conjunto de las políticas ambientales en la Argentina. Establece una serie de principios ambientales como los de prevención, sustentabilidad y responsabilidad. Este último implica que los generadores de efectos degradantes del ambiente son responsables de los costos de las acciones preventivas y correctivas de recomposición.

La Ley 25.612 Gestión integral de residuos industriales y de actividades de servicios (desde 2002) establece los presupuestos mínimos sobre el tratamiento de los residuos industriales –de los que excluye a los residuos domiciliarios, biopatogénicos, radiactivos y derivados del uso normal de aviones y embarcaciones– y crea registros de sus generadores.

La ley 24.051 de residuos peligrosos (desde 1992) regula todo lo relacionado con los residuos peligrosos, desde cómo se definen hasta su transporte y disposición final. Crea el Registro Nacional de Generadores y Operadores de Residuos Peligrosos.

La Constitución Nacional en su artículo 41 (desde 1994) consagra el derecho “a un ambiente sano, equilibrado, apto para el desarrollo humano” y obliga a recomponer el daño ambiental. También manda a las autoridades a proveer “información y educación ambientales”.

En la legislación chilena el título VI Del Cierre y Abandono en su artículo 53 del Decreto Sanitario N.º 189 del 18/08/05. Reglamento sobre condiciones sanitarias y de seguridad básica en los rellenos sanitarios establece que el plan de Cierre debe destacar al menos lo siguiente:

- 
- a. Obras y actividades, tales como la mantención de la cobertura final y del sistema de intercepción perimetral de escorrentías superficiales.
  - b. Operación, mantención y seguimiento de los sistemas necesarios para ciertos riesgos para la salud y el medio ambiente, tales como los de manejo de lixiviados y biogás.
  - c. Operación y mantenimiento de los sistemas de monitoreo y control.
  - d. Uso y destino futuro del relleno sanitario incluidas las obras y actividades que se realizarán.



**Figura 1.** De izquierda a derecha planta productora de electricidad a partir del biogás del relleno sanitario del Complejo Ambiental Norte III y etapa cerrada con recuperación natural de la vegetación. Foto: Lucrecia Brutti.

### **Residuo orgánico urbano**

En lo referente a rellenos sanitarios, el residuo orgánico que llega aquí proviene de las podas de parques y jardines, de los cortes de césped y de los restos de los hogares, restaurantes, mercados y ferias libres, de residuos alimenticios. Podría incluirse el material de las agroindustrias.

Los tratamientos controlados de los residuos orgánicos implican métodos aeróbicos como el compostaje (en sistema abierto o cerrado) y lombricompostaje o anaeróbico como la producción de biogás. El compostaje incompleto denominado sanitización que podría continuar en un proceso de lombricultura. La incineración para obtener vapor de agua y destinarlo a calefacción como es el caso de la ciudad de Uppsala en Suecia.

Los rellenos sanitarios son lugares ideales para realizar estos procedimientos dado que necesitan materia orgánica degradada y estabilizada para mejorar la calidad de los suelos que se utilizan en sus etapas de cierre parcial o total.

Tratándose del relleno sanitario que necesitaría cerrarse por etapas y recuperar el área, el compostaje sería una opción. Según la normativa de calidad de compost chilena N.º 2880 se define compost al producto constituido principalmente por materia orgánica que resulta del proceso de compostaje.

El proceso de compostaje implica la biodegradación controlada de la materia orgánica de las materias primas. Las materias primas son en este caso residuos, productos o subproductos de origen animal o vegetal factibles de ser compostado.

Los rellenos sanitarios pueden recibir residuo domiciliario y todo aquel que se les semeje por lo tanto las podas de ramas, los cortes de césped, el material orgánico limpio de las ferias de frutas y hortalizas podrían ser usados para ser transformado para estos fines al igual que los lodos de depuradoras de aguas servidas domiciliarias que no incluyan vertido industrial (Brutti, 2001; Alvarado *et al.*, 2002).



**Figura 2.** Planta clasificadora de residuos en el Parque de Tecnologías Ambientales de San Juan, Argentina. Foto: Lucrecia Brutti.

### Clasificación de los residuos en origen

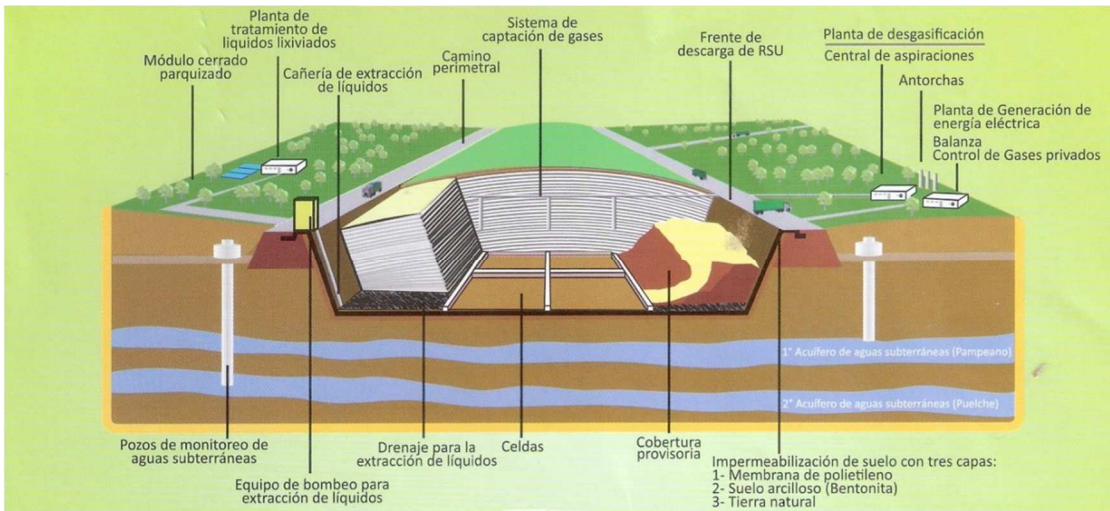
La separación de residuos puede hacerse en origen o en lugares especiales con maquinarias clasificadoras. Por costo y por resultado final en cuanto a calidad y rendimiento es conveniente la separación en origen.



**Figura 3.** De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. Bajo mesada con tachos para separación de residuos domiciliaria. Contenedores para clasificación de residuos en lugar de acopio (Estocolmo, Suecia). Acopio de residuos clasificados en la CEAMSE, Complejo Ambiental Norte III. Clasificación de residuos en San Juan Capital, Argentina.

## Relleno sanitario

Un relleno sanitario es una obra ingenieril que implica un estudio de impacto ambiental anterior a su establecimiento. Un trabajo de construcción, otro de operación, un cierre y un monitoreo operacional de la tarea y sus externalidades durante y con posterioridad al cierre (Tchobanoglous, 1994).



**Figura 4.** Esquema de un relleno sanitario construido bajo la normativa vigente contemplando el manejo de las externalidades que afectan al ambiente y con el aprovechamiento del biogás.

Como se había comentado lo más conveniente es la clasificación *in situ* de los residuos, la separación en origen. Este procedimiento toma tiempo y necesita educación de la población.

En Argentina hay ejemplos exitosos en distintas provincias como el caso de Federal y Crespo en la provincia de Entre Ríos, Rauch en la provincia de Buenos Aires, La ciudad de San Juan en la provincia del mismo nombre. El CEAMSE en Buenos Aires.





**Figura 5.** De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. Relleno sanitario en actividad, disponiendo y compactando. Etapa de relleno sanitario completada mostrando los taludes y el trabajo de la máquina de mantenimiento de la superficie.

### **Externalidades de un relleno sanitario, los contaminantes. Componentes tóxicos.**

Cuando se aborda la problemática de los rellenos sanitarios casi siempre se hace hincapié sobre todo lo que tiene que ver con la calidad y cantidad de materiales que se vuelcan en ellos, pecando no pocas veces, por la falta de entendimiento de lo que sucede dentro del relleno con tales materiales.

Una de las externalidades que producen los rellenos sanitarios son los líquidos lixiviados. Pero, ¿qué son esos lixiviados? Según Cruz *et al.*, 2001 los lixiviados son líquidos que se generan por la liberación del exceso de agua de los residuos sólidos y por la percolación de agua pluvial a través de los estratos de residuos sólidos que se encuentran en las fases de composición. El lixiviado es considerado como el principal y gran contaminante de un relleno. En la bibliografía, existen numerosos estudios en los que se presentan evidencias de cómo estos líquidos pueden contaminar aguas superficiales y subterráneas (Cossu *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2001), por lo que la estimación de su producción a lo largo de la vida del relleno sanitario y la variación de su composición son datos valiosos para planear adecuadamente las obras de control que minimicen impactos negativos al medioambiente. (Jensen y Christenssen, 1999; Kennedy y Everett, 2001).

El lixiviado de un relleno sanitario es un agua residual compleja, con considerables variaciones en la composición y el flujo volumétrico (Trebouet *et al.*, 2001).

Si bien es cierto que la calidad del lixiviado está en función de la composición de los materiales volcados en él, los procesos, junto con el manejo de estos y las condiciones ambientales, y particularmente físicas del lugar, hacen al resultado final, definiendo entonces si hay contaminación o no, y qué tipo de daño y sobre qué o quiénes. (Borzzaconi *et al.*, 1996).

Otro aspecto por demás saliente dentro de los rellenos (su funcionamiento) está en función de la cantidad de oxígeno del proceso de descomposición, la edad del relleno, así como la capa, segmento o sector del cual estemos hablando.

En la evolución de los rellenos existen (y muchas veces coexisten) etapas acidogénicas con otras metanogénicas, de ahí la importancia de utilizar algunos materiales ricos en Ca como para moderar estas etapas como para no generar problemas aún más serios.

Pero ¿qué es un relleno sanitario?

Cuando se habla de relleno sanitario, se hace referencia a un sitio de disposición final de residuos. Los mecanismos de ingeniería de los rellenos sanitarios pretenden reducir los impactos negativos de los residuos en el medioambiente. Estos están compuestos básicamente por una suerte de depresión en el terreno elegido para tal fin, cubierta dicha depresión por una membrana inferior, junto con un sistema de recolección de líquidos (lixiviados), un sistema de recolección de gases, y en algunos casos, una cobertura. Pero quede claro que no necesariamente todos los rellenos sanitarios cuentan con esta serie de elementos.

Tal membrana inferior, por lo general está constituida por polietileno de alta densidad (PEAD), y por debajo de ella, puede también contener una o más capas de arcilla.

Respecto del sistema de colección de líquidos, sabemos que consiste en caños ubicados en el fondo del relleno. El líquido ingresa dentro de estos caños, y debido a la inclinación propia del terreno, o bien la que por ingeniería haya sido dada, por gravedad, o succionados con bombas, debería ser dirigido hacia la planta de tratamiento de líquidos, cuando existe. Y aquí encontramos otra arista importante referida a la peligrosidad de los rellenos sanitarios. Si bien no existe un modelo exclusivo en la construcción de un relleno, podríamos orientar nuestra atención hacia que todos los lixiviados y las aguas residuales generadas pasaran por la planta de tratamiento de lixiviados, de manera que finalmente se busque obtener un efluente que cumpla con los requerimientos ambientales exigidos por la autoridad ambiental competente. Algunos sistemas de tratamiento de los lixiviados están conformados por un desarenador (pretratamiento), por dos lagunas de sedimentación (tratamiento primario), por el tratamiento biológico (tratamiento secundario) y el tratamiento físico – químico (tratamiento terciario). Procesos que se ubicarán en la parte más baja del relleno.

Para someter el lixiviado al tratamiento secundario y posteriormente el terciario, debería existir una estación de bombeo desde la laguna de sedimentación, de manera que las impulsara hacia el tratamiento secundario. Así mismo, después de tratado el lixiviado en la planta, sería conveniente

contemplar la posibilidad de que este efluente se bombee a un sistema de riego para las plantas ornamentales sembradas en toda el área del relleno.

El cubrimiento es una capa de protección que procura frenar la entrada de agua, y así evitar la formación de más lixiviado. Está formada generalmente por una membrana plástica o una capa arcillosa, cubierta por una capa de arena o suelo muy permeable, tapada a su vez por una capa de tierra fértil.

Eugenio Giraldo, ingeniero civil, de la Universidad de Los Andes. MSc. Ingeniería Ambiental y Ph. D. en Ingeniería Ambiental, University of Massachussets, EUA; profesor asociado del Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental de la Universidad de Los Andes, en su trabajo “Tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios, avances recientes”, aclara que “A pesar de la creciente conciencia mundial sobre la necesidad de Reducir, Reusar y Reciclar los materiales que fluyen a través de la sociedad, la implementación real de estas políticas ha encontrado numerosos obstáculos que han impedido su materialización en hechos concretos. Parte del problema se encuentra en la poca internalización de los costos ambientales en que se incurre en la producción de bienes que finalmente se descartan convirtiéndose en residuos. La comparación final sobre qué hacer con un bien descartado se hace en términos de las alternativas para su manejo final, –mas no en los impactos ambientales que generó su producción, distribución y uso–, siendo con frecuencia la alternativa más económica su disposición en un relleno sanitario”.

Quedaría claro, a través de lo expresado hasta ahora, que la problemática casi se circunscribe al tratamiento de los lixiviados. Si bien entonces existen numerosas caracterizaciones de los lixiviados en donde se hace énfasis en su alto poder contaminante, se podría concluir sin temor a equivocarnos que estos contienen toda característica contaminante principal, es decir, alto contenido de materia orgánica, alto contenido de nitrógeno y fósforo, presencia abundante de patógenos e igualmente de sustancias tóxicas como, metales pesados y constituyentes orgánicos. Características por demás importantes ya que nos indican qué es lo que toca removerle a los lixiviados durante su tratamiento. No obstante ello, desde el punto de vista de la selección de la tecnología, somos conscientes de que existen otras características, cualidades y atributos que, sin ser necesariamente contaminantes, pueden afectar el funcionamiento de los procesos de tratamiento.

Volviendo otra vez sobre el tópico “calidad de los lixiviados”, es común encontrar concentraciones mucho mayores de DBO (demanda biológica de oxígeno), amoníaco, metales y sustancias precipitables; ello encierra implicancias por demás importantes en la operatividad y el rendimiento de los procesos de tratamiento; debiendo recurrir a adaptaciones sobre tecnología conforme a casos y cuestiones locales. Consecuencia de ello, los lixiviados de las áreas de los rellenos sanitarios que han sido recientemente rellenadas producen un lixiviado altamente contaminante, denominado lixiviado joven. (Giraldo, 2001).

**Cuadro 1.** Características conceptuales de un líquido lixiviado.

Característica	Lixiviado joven	Lixiviado viejo
DBO	Muy alto	Bajo
DQO	Muy alto	Alto
Amoníaco	Muy alto	Alto
Fósforo	Usualmente deficiente	Suficiente
pH	Muy bajo	Bajo
Detergentes	Muy altos	Bajos
Sales disueltas	Muy altas	Relativamente bajas
Agentes incrustantes (Fe, Ca, Mg)	Muy altos	Bajos
Metales pesados	Muy altos	Bajos

DBO: demanda bioquímica de oxígeno; DQO: demanda química de oxígeno

Fuente: Universidad de los Andes. Tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios: avances recientes. Eugenio Giraldo.



**Figura 6.** De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. Piscina de percolado en el CEAMSE, Buenos Aires, Argentina. Piscina líquido percolado relleno sanitario cerrado Lepanto, San Bernardo, Chile. Bandejas de evaporación de líquidos percolados, relleno Sanitario Santiago Poniente, Chile. Fotos: Lucrecia Brutti.

Entonces, en cuanto a alternativas de tratamiento se podrá deducir hasta ahora que existen no pocos sistemas que combinan distintas tecnologías, muchas de ellas sobre la prueba-error, sabiendo que los sistemas naturales, lagunas y humedales artificiales también se han propuesto como alternativas para el tratamiento de lixiviados. Estos tienen la ventaja de la simplicidad en su operación, y la posibilidad de lograr diferentes niveles de tratamiento, desde un pretratamiento, hasta un tratamiento terciario en caso de necesitarse.

Entonces, si la problemática radica en la acumulación de precipitados, en la combinación de las lagunas y de los humedales, pueden manejar adecuadamente muchos de los problemas donde, además de precipitados, encontraríamos la formación de espumas, la toxicidad a los microorganismos, y las variaciones en cargas hidráulicas y orgánicas.

Un muy breve análisis de costos respecto de tecnologías para el tratamiento de lixiviados deja en claro que dicha tecnología ha probado ser muy competitiva en comparación con otras alternativas, mientras tales análisis financieros tengan en cuenta los costos de capital, de operación y de mantenimiento de los sistemas. De tal forma que se puedan llegar a conclusiones respecto al costo real por volumen de lixiviado tratado en un relleno sanitario, y mientras también se tengan en cuenta el valor del costo del terreno para utilizar para tal fin. Pero a partir de la premisa que en tales terrenos por la naturaleza misma de los diseños de los rellenos sanitarios, en donde existe la necesidad de tener áreas de amortiguamiento visual, de ruido, y de olores, estas áreas, que usualmente están localizadas en los alrededores del relleno, podrían utilizarse como parte de los sistemas naturales de tratamiento; en especial en el caso de los humedales, según indica Eugenio Giraldo.

En el caso de los humedales artificiales, su aplicación al tratamiento de los lixiviados es relativamente nueva, debiendo buscar experiencias en Estados Unidos y en Europa principalmente.

Se descarta del presente comentario que el tratamiento de los lixiviados de los rellenos sanitarios es un problema difícil de atacar, tal vez, sin exageración, uno de los problemas más desafiantes en la ingeniería del tratamiento de las aguas residuales. Y ello queda al descubierto a través de la gran cantidad de tecnologías y de investigación que se vienen realizando. Por suerte aún hay mucho campo para la innovación. Queda claro que lo más racional sería no producir lixiviados, o bien producir lixiviados con cualidades menos contaminantes. Sin embargo, conforme a comentarios del ingeniero Giraldo, esta solución se podrá dar cuando se mire de una manera global el flujo de materiales en la sociedad y se internalicen los costos ambientales en todo el ciclo de los materiales, desde su producción, transformación, distribución, uso y descarte. Mientras tanto es muy probable que los lixiviados continúen siendo un problema apremiante de la sociedad.



**Figura 7.** De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. Emplazamiento de pilas y máquina volteadora. Acopio de material degradado. Foto: Lucrecia Brutti.

### **Cierre de un relleno colmatado de basura o de una etapa en un relleno sanitario**

El plan de cierre de un relleno sanitario se lleva a cabo una vez completada la capacidad del relleno y su objetivo es que este siga funcionando eficazmente como una unidad para el control ambiental de los residuos durante un período, que en promedio podría extenderse a unos 25 años; si bien existen rellenos sanitarios de Europa donde luego de 100 años hay producción de biogás. (UCV 1997).

La idea sería biorremediar la zona si bien aquí jugarían dos conceptos: el primero se define como bioprofilaxis caso en el cual se utilizan tecnologías que evitan la contaminación, y el segundo concepto es la biorremediación que implica aplicar un conjunto de metodologías que principalmente se valen de la biología y devuelven un ser natural al que estaba o similar. (Beider y Brutti, 2015).

Un programa de cierre debe contemplar:

- a) Diseño de cobertura final.
- b) Programas de monitoreo de gases.
- c) Programa de manejo de líquidos lixiviados.
- d) Programa de monitoreo de aguas subterráneas.
- e) Programa manejo de aguas lluvia.
- f) Programa de medición asentamientos.

#### g) Recuperación del área.

A continuación se desarrollan los puntos que se relacionan con la temática de este libro

##### a) Diseño de la cobertura final

Es la estructura que se instala sobre la cobertura normal de la celda una vez que han finalizado las obras de recepción y disposición de residuos. Esta asegura el confinamiento de la masa de residuos al interior del relleno sanitario. (EMERES, 1995 y 2000).

La función de la cobertura es la siguiente:

- Como barrera entre los residuos confinados y la agresividad del medio externo, ya sea infiltración de aguas lluvia, vientos, proliferación de vectores, presencia de personas o animales que puedan alterar el normal desarrollo de la estructura del relleno.

- Como barrera entre el medioambiente y la agresividad potencial de los residuos; sean salida incontrolada de gases, peligro de incendios o explosivos, levantamiento de residuos por efecto del viento y posibles afloramiento de líquidos percolados.

Sobre la cobertura de 25 cm que va sobre la última celda del relleno, comienza la instalación de una capa de material homogéneo, bien graduado, con un coeficiente de permeabilidad de aproximadamente  $10^{-4}$  cm/seg. El material utilizado está exento de bolones, ladrillos, escombros y basura. El espesor final de esta cobertura es de 40 cm, colocados en el terreno en capas de 20 cm, el que es compactado con maquinaria adecuada. Posteriormente se coloca una lámina de polietileno de baja densidad de 0,2 mm de espesor en planchas de un ancho mínimo de 10 metros traslapando los empalmes al menos 50 cm. La finalidad de esta lámina es proteger la integridad de la capa de 40 cm, actuando como una barrera que impide la infiltración de agua que puede provocar erosión en la estructura. El sello intermedio y final se realiza empleando tierra arcillosa que tenga un grado de permeabilidad adecuado para evitar infiltración de aguas lluvias. (Botadero Plazuelas, 2009).

##### g) Recuperación del área

Es la etapa final y una de las más importantes del plan de cierre de un relleno sanitario, la cual debe cumplir con lo establecido en la normativa ambiental vigente. Esta comienza a ejecutarse una vez terminadas las operaciones que se realizan dentro del plan de cierre del relleno sanitario, las que se relacionan con la obra en ejecución de la cobertura final. (Espinace *et al.*, 1988).

Los objetivos que se persiguen con un plan de recuperación del área son básicamente dos:

- Proteger la cobertura final que podría ser dañada por efecto de los agentes erosivos del viento y de las precipitaciones.

- Mejorar considerablemente el entorno, dando origen a áreas verdes que permitan devolver el paisaje natural que estaba antes de ser construido el relleno sanitario.

Según Tchobanoglous (1994), como es deseable tener espacios abiertos en las zonas urbanas, los rellenos sanitarios cerrados representan una oportunidad única para la recuperación del terreno, a través del establecimiento de parques, zonas de recreo, reservas naturales, jardines botánicos, canchas de golf, producción de cosechas e incluso complejos comerciales. La

selección del uso final de un relleno sanitario clausurado depende de las necesidades de la comunidad y de los fondos disponibles para el proyecto de recuperación. Por ejemplo, los parques con pocas atracciones y con un hábitat destinado a la fauna requerirían menos inversiones que campos de golf y zonas de recreo multifuncional.

Todos los usos finales mencionados anteriormente tienen una cosa en común: requieren de una revegetación para lograr satisfacer el objetivo de proteger la salud humana y el medioambiente. Los objetivos de recuperación son muy claros, pero esto no quiere decir que debamos dejar de reflexionar brevemente en torno al tema de la dificultad en cuanto a seleccionar la metodología y el sistema de recuperación más adecuado. Las experiencias indican que hay posturas distintas entre diferentes tendencias de ingenieros y especialistas con experiencia en el tema. La dificultad para seleccionar la metodología y el sistema de recuperación se explica por cuatro razones:

- Las condiciones del emplazamiento del relleno sanitario.
- Las condiciones previas en las que se encuentra el terreno, las cuales son necesarias para desarrollar proyectos de recuperación.
- La recuperación no se produce inmediatamente, sino que tiene lugar durante un largo período, aproximadamente 25 años. Esto se traduce en depositar mucho tiempo, trabajo y dinero en el mantenimiento del área. No existen todavía experiencias suficientes para saber cómo proceder mejor.

No existe una solución única de recuperación del área de un relleno sanitario, sino que existen variadas tendencias tecnológicas, niveles de desarrollos del conocimiento y criterios para enfrentar el tema. Esto indica que todavía no se ha encontrado la tecnología más adecuada que proceda a recuperar el área de un relleno sanitario (Espinace *et al.*, 1990).





**Figura 8.** De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo forestación y cancha de fútbol, establecimiento de doca (*Mesembrianthemum chilensis*) en el relleno sanitario cerrado de Lepanto, San Bernardo, Chile.

Factores que limitan el crecimiento de las especies vegetales en un exrelleno sanitario controlado. Los siguientes factores citados por Tchobanoglous (1994) limitan el crecimiento de las especies vegetales establecidas en exrellenos sanitarios controlados:

a) Toxicidad de los gases generados para las raíces

Los principales gases producidos por la descomposición de los residuos en un exrelleno sanitario clausurado son el  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ . Se ha comprobado que altas concentraciones de  $\text{CO}_2$  son directamente tóxicas para las plantas, aunque el  $\text{CH}_4$  aisladamente no es fitotóxico. Su daño proviene de su capacidad para provocar el desplazamiento del oxígeno, produciéndose condiciones anaerobias que son perjudiciales para las plantas. Estos dos elementos representan el 95 % del volumen total y el 5 % restante está compuesto por sulfuro de hidrógeno, el amoníaco, el hidrógeno, mercaptano, etileno, entre otros. El  $\text{H}_2\text{S}$  y el  $\text{C}_2\text{H}_4$  son fitotóxicos para las plantas. (Harte *et al.*, 1995).

b) Bajo suministro de oxígeno

El espacio poroso del suelo está constituido por poros grandes que retienen oxígeno y por poros pequeños que retienen humedad entre lluvias y riegos. Los procesos de compactación del suelo con maquinaria pesada en los rellenos reducen dicho espacio y perjudican el buen crecimiento de las plantas que depende del suministro de oxígeno en sus raíces.

c) Baja capacidad de intercambio catiónico

Se relaciona con la habilidad del suelo para absorber y retener nutrientes. La materia orgánica coloidal y las arcillas son los principales puntos de intercambio catiónico. Los suelos utilizados en los rellenos sanitarios carecen de materia orgánica siendo incapaces de absorber y retener nutrientes así como de prevenir su lixiviación fuera de la zona de raíces.

d) Bajo contenido de nutriente

El suelo utilizado para la cobertura final de un relleno sanitario normalmente procede de la fuente más fácilmente disponible y más barata. Como consecuencia los suelos tienen una baja calidad de textura y de contenido nutricional.

e) Baja capacidad para retener agua

La capacidad de un suelo para retener agua depende de su propiedad física; la textura del suelo y la compactación son los factores más importantes. La compactación con maquinaria pesada reduce el tamaño de los poros y evita la entrada y la retención en el suelo de cantidades adecuadas de agua.

f) Baja humedad del suelo

Con la técnica de la compactación en los rellenos sanitarios disminuye el espacio poroso, provocando una disminución en la capacidad del suelo para retener el agua y se incrementa la escorrentía, provocando la erosión y suelos más secos. La discontinuidad del suelo proviene de la laminación de los residuos y del material de cobertura y puede impedir la subida del agua a través del suelo por capilaridad.

La erosión es otro factor que limita el establecimiento de especies vegetales en exrellenos sanitarios controlados y pueden mencionarse los siguientes factores que provocan este problema:

1) Erosión provocada por el agua de lluvia

El agua de lluvia escurre en capas poco profundas más o menos uniformes a lo largo de la superficie del talud del relleno. Mientras mayor es el desnivel y la longitud del talud mayor es la velocidad del agua que escurre y por lo tanto mayor es la posibilidad de que se produzcan problemas de erosión en el suelo.

2) Erosión provocada por el viento

La acción del viento puede levantar y romper la carpeta final de cubrimiento del relleno sanitario.

### **Cubierta de suelo en el programa de recuperación del área**

El tipo de destino agrícola forestal que se pretenda dar a un antiguo relleno sanitario será en función del grado de estabilidad del terreno y del espesor de la capa final de cubrimiento. Si en el relleno sanitario terminado se van a sembrar algunas especies vegetales en particular, el espesor de la capa de cubrimiento final de tierra debe ser suficiente y debe presentar condiciones de soporte vegetal adecuadas para las especies que se van a sembrar. En la mayoría de los casos es suficiente un recubrimiento final de suelo de aproximadamente 60 cm bien compactado. Según

el tipo de especie arbórea o arbustiva que se desee introducir puede ser necesario que el recubrimiento final requiera un espesor mayor.

Es importante considerar la disposición que debiera tener la cobertura final del relleno sanitario para mantener una cubierta vegetal sin la incidencia mayor de gases y metales pesados, asegurando así un mayor desarrollo de las especies implantadas para lo cual es de vital importancia la adecuada eliminación de gases del vertedero. En relación con lo anterior, es también importante considerar el espesor de la cubierta final donde se desarrollarán las especies vegetales. Se estima que un espesor de 50-60 cm sería suficiente para la vegetación praterse y 70-80 cm para la arbustiva. (Espinace *et al.*, 1990; Trellez, 1976).

El programa de recuperación del área en un exrelleno sanitario incluye la preparación del sustrato o cobertura de suelo como una mezcla de materiales que posea básicamente las siguientes características:

- Mejor equilibrio entre macroporos y microporos.
  - Mejor intercambio de gases entre el suelo y la atmósfera.
  - Mejor retención y movimiento de agua en el suelo.
  - Buena infiltración del agua en el suelo.
  - Buen drenaje y permeabilidad.
  - Buen desarrollo de la estructura y de los agregados.
  - Buena respuesta a la erosión.
  - Buen contenido de materia orgánica.
  - Buena relación físico-química.
- Buena capacidad de intercambio catiónico.

Construir la cubierta de suelo donde se desarrollaran las especies herbáceas establecidas necesita su tiempo y para que esto ocurra es fundamental incorporar materia orgánica sobre la cubierta de suelo donde se depositarán las semillas y crecerán las raíces de las plántulas. Esta materia orgánica conviene que esté previamente estabilizada y ello se consigue con un proceso de degradación controlado que se puede obtener a través del material de compostaje. La siembra de especies herbáceas exige el aporte de una capa vegetal y un abonado orgánico o químico. Se considera que la incorporación de materia orgánica estabilizada es la solución más económica, sencilla y de mejores resultados dado que mejora la actividad química, física y biológica del suelo. El compost es utilizado en la recuperación del terreno ya que tiene la propiedad de mejorar la estructura del suelo, buena capacidad de retener agua y la posibilidad de facilitar la movilidad de los nutrientes en el suelo. (Brutti, 2004).

Se utilizan terrazas como estructuras de relleno para nivelar el terreno en laderas y pendientes inclinadas que funcionan como mecanismos de control de drenaje al actuar como una superficie permeable que aumenta la filtración del agua y reduce el escurrimiento y la erosión en el suelo. Los terraplenes de la terraza deben tener un cruce gradual con la pendiente para permitir tanto la

filtración como el escurrimiento gradual del agua superficial. Se debe tener cuidado con compactar todas las áreas del terraplén para hacerlas estables y usar una cubierta vegetal adicional para hacerla más estable. (Sharma y Lewis, 1994).

El suelo es un ser vivo, un recurso natural formado por miles de años que además de servir como sustento para las plantas, hospeda un sistema biológico activo –microorganismos– que participa en el ciclo de los nutrientes para los cultivos (Beider y Brutti, 2015). El hombre debe ofrecer sobre el cofre de basura un suelo para que las plantas y los organismos vivos que lo habitan tengan soporte, aireación, nutrientes y agua. Es conveniente imaginar al menos los tres horizontes principales del suelo y tratar de imitarlos.



**Figura 9.** De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, riego por cintas en el terreno del relleno sanitario cerrado, impermeabilizado, Lo Errazuriz. Zona empastada (*Bromus unioloides*, *Cynodon dactylon*, *Eragrostis lugens*, *Stypa hialina*) con especies espontaneas del lugar. Cultivos de plantas aromáticas, medicinales y calabazas. Foto: Lucrecia Brutti.

## Experiencias de recuperación del área

### Experiencia 1

Los objetivos del plan de cierre del relleno sanitario de Los Vásquez-San Miguel de Tucumán, Argentina, que funcionó entre 1996 hasta 2004 se definieron así:

1. Aislamiento o confinamiento ambiental.
2. Reducción del pasivo ambiental.
  - 2 a. Generar metodologías ambientalmente viables y técnicamente efectivas mediante la investigación y desarrollo biotecnológico.
  - 2 b. Desarrollar proyectos alternativos que posibiliten el financiamiento externo.

La cobertura final se hizo con suelo proveniente de las excavaciones en el nuevo centro de San Miguel de Tucumán, la cual presenta en su composición arcilla de fundamental importancia para la impermeabilización somital, luego de esta capa de aproximadamente de 50 cm se depositó tierra negra apta para la siembra y crecimiento de la alfombra vegetal (Venney *et al.*, 2005 ).

### Experiencia 2

En el exrelleno sanitario de Lo Errázuriz la recuperación del área se trabajó como un parque más, ya que a los inicios del año 1987 se carecía de antecedentes para aplicar un criterio de selección de las especies para utilizar. Originalmente se estableció un parque que privilegió las especies nativas y actualmente cuenta con especies arbóreas tales como eucaliptus (*Eucaliptus globulus* y *E. camaldulensis*), acacias (*Acacia caven*, *A. melanoxylon*, *A. Dealbata*), fresno común (*Fraxinus excelsior*), miosporo (*Miosporum sp*), melia (*Melia azedarach*), parquinsonia (*Parkinsonia aculeata*), quillay (*Quillaja saponaria*), pimienta (*Schinus molle*). En los taludes doca (*Mesembryanthemum chilensis*) y rayo de sol (*Mesembrianthemum gramineum*), en los sectores anegadizos diente de león (*Taraxacum officinalis*), en un sector pantanoso tifa (*Typha sp.*). Las especies herbáceas que tiene actualmente el parque son la festuca (*Festuca sp.*), ballica (*Lolium sp.*), trébol (*Trifolium sp.*), pasto bermuda (*Cynodon sp.*). Todas estas especies introducidas son las que han mostrado un mejor desarrollo durante el proceso de reinserción. El área recuperada funciona actualmente como un área verde y una zona de juegos infantiles que tiene a cargo la Empresa Metropolitana de Residuos Sólidos (Brutti, 2004). El mantenimiento de la carpeta herbácea se realizó con alfombras de césped cultivadas en el invernadero con un método sustentable de producción sobre polietileno en bandejones separados por listones de madera y con riego presurizado en abanico (Brutti y Alvarado, 2008).



**Figura 10.** De arriba hacia abajo. Jardín al ingreso de las oficinas, plantando doca (*Mesembryanthemum chilensis*), arborización de taludes, corte de césped. Relleno Sanitario cerrado Lo Errazuriz.

### Experiencia 3

Balardini (1995) trabaja en Italia con más de 21 especies, determinó que las especies arce (*Acer negundo*), aliso italiano (*Alnus cordata*), carpe negro europea (*Ostrya carpinifolia*), encino del pantano (*Quercus rubra*) y acacio (*Robinia pseudoacacia*) presentaron una sobrevivencia del 100 % después de 4 años de evaluación en el relleno sanitario. Así mismo la especie aliso (*Alnus glutinosa*), fresno de flor (*Fraxinus ornus*) presentaron altos niveles de sobrevivencia de los árboles los que superaron el 70 %. (La Marca *et al.*, 1995).

### Experiencia 4

El manual de operaciones para el plan de cierre del basurero actual de San Juan de Nicaragua 2004 se refiere al mantenimiento de un Plan de Cierre (Min. De Amb y Rc. Nat.). Por un lado, algunos tipos de cubierta vegetal (césped o grama) pueden requerir la limpieza por lo menos dos veces al año. La limpieza puede ayudar en la supresión de la mala hierba y estimular el

crecimiento, puede aumentar el vigor de cierta especie de hierba. Por otro lado, ciertos tipos de cubierta (hierba o césped nativos) requieren la limpieza con menos frecuencia (una vez cada tres años) y pueden ser convenientes para ciertos tipos de clima e instalaciones donde es preferible un requerimiento de bajo mantenimiento. Para ciertos tipos de cobertura vegetales la fertilización puede ser necesaria para sostener un crecimiento vegetal deseable. Los tiempos de fertilización se deben basar en el tipo presente de cubierta.

La fertilización puede ser necesaria para ciertas hierbas, mientras que la vegetación nativa puede requerir poco o nada de fertilizante una vez establecida. Los insecticidas se pueden utilizar para eliminar las poblaciones de insectos perjudiciales para la vegetación. Los insecticidas se deben seleccionar y aplicar cuidadosamente considerando los potenciales efectos sobre la calidad del agua superficial.

Después de la capa de arcilla se cubrirá con 30 centímetros de tierra negra de alto contenido de materia orgánica a fin de sembrar pastos, árboles, o arbustos mejorando así las condiciones paisajísticas

Las especies forestales que se utilizaran deberán tener como mínimo 50 cm de altura, poseer buenas características morfológicas y fisiológicas, además de adaptarse muy bien a la zona, ser capaces de soportar condiciones de suelo y contaminación poco favorables, con raíces superficiales.

Las especies que se pueden utilizar son las siguientes: *Acacia decumens*, *Allnus jurulensis*, *Fraxinus* sp., *Viburnum pichinchense*, *Joseanthus crassilanatus*, quillotocto (*Tecoma stans*), acacia japonesa, además de otras como zapallo, algodón y árboles forrajeros como el nacedero (*Trichanthera gigantea*) y el chachafruto (*Erythrina edulis*) o las que la autoridad ambiental recomiende según las condiciones ecológicas del sector. La siembra de los árboles debe realizarse en forma triangular (tresbolillo) con distancias de 3 metros entre planta y planta.

Es de competencia del municipio realizar el control y seguimiento en cuanto a este proceso mediante el mantenimiento mensual de las especies arbóreas aquí sembradas durante los tres próximos años.

## **Bibliografía**

ALVARADO, P.; SANTIBAÑEZ, C.; VARNERO, M.; BRUTTI, L. 2002. Evaluación económica de una planta de compostaje de residuos vegetales, con diversos sistemas de manejo. 53 Congreso Agronómico de Chile, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

ALVARADO, P.; MARTIN, A.; BRUTTI, L.; PÉREZ, A. 2010. Humus de lombriz, reemplazando a la turba, en fórmulas de sustratos para la producción de plantines de hortalizas. Segundo Congreso Argentino de Sustratos Concordia, 02-05 de noviembre de 2010, Entre Ríos.

- BALLARDINI, P. 1995. The Environmental Regeneration of Landfill Site: Inventory of The Arboreal Patrimony. Sardinia, 95 Fifth International Landfill Symposium, 02-06 de octubre de 1995, S Margherita di Pula, Cagliari, Italia.
- BEIDER, A.; BRUTTI, L. 2015. Bioremediación: Una cruzada para recuperar las tierras deterioradas. INTA informa 2015, Año XIII N.º 151 / Marzo 2015 ISSN: 2362-5287
- BORZZACONI, L.; LÓPEZ, I.; OHANIAN, M.; VIÑAS, M. 1996. Degradación anaerobia de lixiviado de relleno sanitario y post-tratamiento aerobio, IV Seminario-Taller Latinoamericano sobre tratamiento anaerobio de aguas.
- BRUTTI, L.; ALVARADO, P. 2008. Sistema de producción sustentable de alfombras de césped utilizando diversos sustratos orgánicos 5.º Congreso Argentino de Floricultura y Plantas Ornamentales, 04-07 de noviembre de 2008, Corrientes.
- BRUTTI, L. 2004. Recuperación de suelo de un ex relleno sanitario. CD de la Conferencia Técnica "Relleno sanitario para América Latina". Buenos Aires, Argentina.
- BRUTTI, L.; VALLEJOS, V. 2012. Uso de biosólidos en la rehabilitación de áreas en el relleno sanitario Santiago Poniente, Chile Revista electrónica chilena, Avances en Ciencias e Ingeniería vol. 3 N.º1 ISSN: 0718-8706.
- BRUTTI, L. 2001. Sistemas de compostaje: factores críticos del proceso de compostaje, disco compacto correspondiente al Seminario Taller Internacional Manejo de Residuos Sólidos orgánicos para una agricultura limpia, Centro de Agricultura y Medio Ambiente, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.
- BRUTTI, L. 2003. Aprovechamiento de biogas de los rellenos sanitarios. Mini foro empresario IBEROEKA, 30 y 31 de julio de 2003, Buenos Aires.
- COSSU, R.; HAARSTAD, K.; LAVAGNOLO, M.; LITTARU, P. 2001. Removal of municipal solid waste COD and NH<sub>4</sub>-N by phyto-reduction: A laboratory-scale comparison of terrestrial and aquatic species at different organics.
- CRUZ, R.; ORTA, M.; SÁNCHEZ, J.; ROJAS, M. 2001. Estimación de la generación de lixiviados en rellenos sanitarios mediante un balance de agua en serie, Memorias del AMCRESPAC, Querétaro, México.
- DING, A.; ZHANG, Z.; FU, J.; CHENG, L. 2001. Biological control leachate from municipal landfill, Elsevier Science Ltd, (disponible: [www.elsevier.com/locate/ecoleng](http://www.elsevier.com/locate/ecoleng). Visitado el 10 de octubre de 2016.
- EMPRESA METROPOLITANA DE RESIDUOS SÓLIDOS (EMERES). 1995. Programa de cierre ex relleno sanitario Lo Errazuriz. Santiago, Chile.
- ESPINACE, R.; PALMA, J. 1990. Problemas Geotécnicos de los Rellenos Sanitarios, Revista Ingeniería Civil del CEDEX, N.º 77, Edición octubre, noviembre y diciembre, Madrid, España.
- ESPINACE, A.R.; OLAETA, C.J.A.; PRADO, M.O.; SZANTO, N.M. 1988. Utilización de vertederos controlados. Informe final presentado al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT), Proyecto Fondecyt N.º 408. Santiago Chile.
- GIRALDO, E. 2001. Tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios: avances recientes. Revista de ingeniería, (14), 44-55.
- HARTE, J.; HOLDREN, C.; SCHNEIDER, R.; SHIRLEY, C. 1995. Guía de las sustancias contaminantes. El libro de los tóxicos de la A a la Z. Editorial Grijalbo S.A., México D.F.
- JENSEN, D.; CHRISTENSEN, T. 1999. Colloidal and dissolved metals in leachates from four danish Inasfills, Water Residual, Vol. 33, N.º.9, Reino Unido.



KENNEDY, L.; EVERETT, J. 2001. Microbial degradation of simulated landfill leachate: solid iron/sulfur interaction, Elsevier Science Ltd, (disponible: [www.elsevier.com/locate/ecoleng/aer](http://www.elsevier.com/locate/ecoleng/aer). Visitado el 26 de noviembre de 2016).

LA MARCA, O.; SANESI, G.; GAMBI, L. 1995. Study of the Vegetation in Landfill Restoration Project: First Result. Sardinia, 95 Simposio Internacional Landfill, de 02 al 06 de octubre de 1995, S Margherita di Pula, Cagliari, Italia.

MINISTERIO DE AMBIENTE Y LOS RECURSOS NATURALES. Agencia Española de Cooperación Internacional. Proyecto Araucanía Río San Juan 2004, Manual de operaciones y Plan de Cierre del Basurero actual de la localidad de San Juan de Nicaragua. Río San Juan. Managua. Nicaragua, (disponible: [www.bvsde.org.ni](http://www.bvsde.org.ni) consultado 15 de junio de 2015)

PLAN DE CIERRE BOTADERO PLAZUELAS. 2009. Disponible: [www.laflorida-narino.gov.co](http://www.laflorida-narino.gov.co) consultado 14 de julio de 2015.

SHARMA, H.D.; LEWIS, S.P. 1994. Waste Containment Systems, Waste Stabilization, and Landfills-Design and Evaluation, Wiley, Nueva York.

SEOANEZ CALVO. M.; CHACON AUGE, A.; GUTIERREZ DE OJESTO, A.; ANGULO AGUADO, E. 1999. Contaminación del suelo: estudios, tratamiento y gestión. Ediciones Mundi-Prensa.

TCHOBANOGLIOUS, G.; THEISEN, VIGIL, S. 1994. Gestión integral de residuos sólidos. Vol. 2. M<sup>c</sup> Graw – Hill. Madrid, España.

TREBOUET, D.; SCHLUMPF, J.; JAQUEN, P.; QUEMENEUR, F. 2001. Stabilized landfill leachate treatment by combined physicochemical-nanofiltration processes, Elsevier Science Ltd, (disponible: [www.elsevier.com/locate/waters](http://www.elsevier.com/locate/waters). Consultado 14 de julio de 2015

TRELLEZ, R. 1976. Aspectos sobre la selección, implantación y mantenimiento del tapiz de cobertura de rellenos sanitarios. Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires. BS. AS., Argentina.

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAISO, ESCUELA DE INGENIERÍA EN CONSTRUCCIÓN. 1997. Diseño de un plan de cierre y rehabilitación de áreas utilizadas como vertederos o rellenos sanitarios. Informe Final. Comisión Nacional del Medio Ambiente (CONAMA).

VENNEY, M.; GIMENEZ, M.; LOPEZ, F. 2005. Plan de Cierre del Relleno Sanitario Los Vázquez, S.M. de Tucumán. Empresa Transportes 9 de Julio S.A. (Disponible: [www.bvsde.patio.org/bvsacd/ISWA/plan.pdf](http://www.bvsde.patio.org/bvsacd/ISWA/plan.pdf) consultado 23 de julio de 2015).

## CAPÍTULO 13

### Utilización de especies vegetales para la recuperación de rellenos sanitarios

Lucrecia Brutti<sup>1</sup>, Ernesto Giardina<sup>2</sup>, Marcelo Beltrán<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Suelos CIRN-INTA de los Reseros y Nicolas Repetto s/n 1686 Hurlingham Buenos Aires,

<sup>2</sup>Cátedra de Edafología, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Av. San Martín 4453, Buenos Aires 1417, Argentina.

### Introducción

#### Limitaciones nutricionales para el establecimiento de las plantas en un relleno sanitario

Los suelos afectados por basurales a cielo abierto o por un relleno sanitario mal controlado acumulan nutrientes en cantidades tóxicas para las plantas.

Las plantas dependen de los nutrientes del suelo para su crecimiento y desarrollo. Está demostrado que los elementos esenciales para el desarrollo de todas las plantas son diecisiete, todos ellos desempeñan funciones muy importantes en la vida de la planta y cuando están presentes en cantidades muy limitadas pueden producir graves alteraciones y reducir notablemente el crecimiento; algunos de estos nutrientes son usados por las plantas en mayor cantidad, es por eso que se pueden clasificar como macronutrientes y micronutrientes.

De los diecisiete elementos esenciales para todas las plantas, nueve son requeridos en grandes cantidades: Carbono (C), Hidrógeno (H), Oxígeno (O), Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Azufre (S); estos se conocen como macronutrientes o elementos primarios. Por esta razón, el crecimiento de la planta puede reducirse notablemente cuando hay escasez de uno o varios de ellos en el suelo. El resto de los nutrientes son denominados micronutrientes debido a que son necesarios en menores cantidades: Hierro (Fe), Zinc (Zn), Manganeso (Mn), Boro (B), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo), Cloro (Cl), Niquel (Ni).

Existe un rango óptimo de estos nutrientes para que los vegetales puedan desarrollarse y realizar su ciclo de vida normalmente. Si los valores se encuentran por debajo de este rango, las plantas sufren deficiencia y, como se comentó anteriormente, se pueden ver muy afectadas; pero si los valores se encuentran por encima de este rango, pueden llegar a ser tóxicos; esto dependerá del nutriente y del cultivo.

La toxicidad depende de las condiciones del suelo, el material original, el manejo de los cultivos (fertilización, riego, etc.) y de la cercanía a zonas industriales, mineras, basurales a cielo abierto y rellenos sanitarios mal manejados. Una de las principales diferencias entre los animales y las

plantas es que el primer grupo absorbe los nutrientes en forma orgánica y el segundo grupo los absorbe principalmente en forma inorgánica. La inclusión de residuos como baterías, electrodomésticos, electrónicos, tarros con restos de pinturas en la disposición final de los residuos lleva a que estos sean acarreados por las aguas lluvias o por los líquidos percolados y elementos tales como el cobre, el hierro, el cadmio, el plomo afecten la salud de las plantas, de los animales y del hombre.

### **Elementos tóxicos para el establecimiento de las plantas en un relleno sanitario**

En suelos utilizados como rellenos sanitarios se pueden encontrar elementos tóxicos para los cultivos y elementos que son nutrientes esenciales, pero al estar en altas concentraciones son también perjudiciales para la implantación y el desarrollo de las plantas (Taiz y Zeiger, 1998).

Dentro de los elementos tóxicos se pueden citar:

Sodio (Na): además de ser un elemento perjudicial para la estructura del suelo, debido al efecto dispersante de sus partículas, es tóxico para los cultivos ya que produce disminución del crecimiento de la raíz y necrosis en las hojas. Residuos orgánicos de origen principalmente animal pueden incrementar su concentración en suelos utilizados como rellenos sanitarios. (Mengel y Kirkby, 2000).

Aluminio (Al): es uno de los elementos que se encuentra en mayor concentración en el suelo, pero su disponibilidad para las plantas está por lo general en bajas concentraciones, en rellenos sanitarios su concentración puede ser mayor debido a que los residuos de zonas urbanas pueden tener alta concentración de Al ya que es utilizado para la construcción, empaquetamiento, transporte, materiales eléctricos, alimentos no perecederos, etc. (Harte *et al.*, 1991). En cultivos susceptibles, debido al Al, se reduce el crecimiento de las raíces y de los tallos, y las hojas pueden tomar un color púrpura (similar a la deficiencia de fósforo, ya que afecta el metabolismo del fosfato) (Matsumoto, 1980).

Plomo (Pb): es uno de los metales pesados cuya fuente principal de contaminación es la combustión de gasolina o la actividad industrial; en rellenos sanitarios se puede encontrar principalmente en baterías, recipientes de aditivos para combustibles y pinturas con base de plomo. Si bien no se han encontrado situaciones de toxicidad a campo, a nivel experimental se ha detectado que el plomo puede afectar seriamente el crecimiento de los cultivos (Malone *at al.*, 1974).

Cadmio (Cd): también afecta a los cultivos y se puede encontrar en altas concentraciones en suelos cercanos a minas, zonas industriales o por aplicación de barros cloacales provenientes de industrias. En rellenos sanitarios, se puede encontrar debido a la presencia de baterías, desechos metálicos galvanizados y plásticos. El mayor problema no es el efecto tóxico en las plantas, sino su acumulación en ellas que luego pueden ser consumidas por los humanos causando efectos tóxicos en su salud. En Japón, por ejemplo, existe un caso emblemático donde el consumo de

arroz con altas concentraciones de cadmio disminuía las funciones del riñón y afectaba el metabolismo del calcio y del fósforo produciendo enfermedades en los huesos. Para el caso de otros metales pesados como el mercurio y el titanio, ocurre algo similar al cadmio en el sentido que las plantas lo pueden tolerar en altas concentraciones, que son inaceptables para la dieta animal y humana (Marschner, 1978).

Dentro del grupo de elementos esenciales, estos serán tóxicos si se encuentran en altas concentraciones. Las condiciones del suelo, el material original, el manejo de los cultivos (fertilización, riego, etc.) y la cercanía a zonas industriales, mineras, basurales a cielo abierto y rellenos sanitarios mal manejados son condiciones que pueden incrementar su concentración y transformarlos de nutrientes en elementos tóxicos. Una de las principales diferencias entre los animales y las plantas es que el primer grupo absorbe los nutrientes en forma orgánica y el segundo grupo los absorbe principalmente en forma inorgánica.

La inclusión de residuos como baterías, electrodomésticos, electrónicos, tarros con restos de pinturas en la disposición final de los residuos lleva a que estos sean acarreados por las aguas lluvias o por los líquidos percolados y elementos tales como el cobre (Cu), hierro (Fe), cloro (Cl), manganeso (Mn), Níquel (Ni) y zinc (Zn), nutrientes esenciales terminen siendo tóxicos para los cultivos.

Los síntomas de toxicidad del Fe se manifiestan como necrosis en las hojas (manchas de color castaño), y disminución de la biomasa radicular. Esto disminuye el crecimiento de la planta y el rendimiento del cultivo (Ottow, 1983). El Mn en altas concentraciones también puede afectar el rendimiento de los cultivos, como el caso del maíz y del girasol. Los síntomas son similares a los producidos por la toxicidad del hierro y puede inducir la deficiencia de otros nutrientes como el magnesio y el calcio. Para tratar esta toxicidad se deben incorporar nutrientes antagonistas al hierro y al manganeso como puede ser el calcio. Este se aplica en forma de yeso agrícola o carbonato de calcio principalmente. De esta manera se incrementa el pH, entonces disminuye la disponibilidad de esos micronutrientes, entrando en valores accesibles para las plantas (Rufy *et al.*, 1979).

Zinc (Zn): provoca una reducción en el crecimiento de las raíces y la expansión de las hojas seguidas por clorosis como por ejemplo en el caso del cultivo de soja (Rauser, 1973).

Cloro (Cl): produce puntas quemadas y caída de las hojas, bronceado y clorosis (Reisenauer *et al.*, 1973). Los cítricos, papas, lechugas y algunas leguminosas son muy susceptibles al exceso de este.

Cobre(Cu): en exceso produce efectos negativos en la membrana plasmática de las células (Daniels *et al.*, 1972).

Níquel (Ni): es un micronutriente que las plantas necesitan en muy bajas concentraciones, pero sus efectos tóxicos se producen debido a efectos en el metabolismo del nitrógeno y su acumulación en forma de amonio que produce necrosis en las hojas, uno de los cultivos más sensibles a la toxicidad del níquel es la avena (Mishra y Kar, 1974).

Por lo tanto en caso de encontrarse alguno de estos elementos en concentraciones perjudiciales para los cultivos, se deberán utilizar especies tolerantes a su exposición o mejorar la calidad del suelo a través del uso de por ejemplo compost de residuos domiciliarios sumado a cortes de césped y podas arbóreas, lodos provenientes de aguas servidas sanitizados y compostados que aporten nutrientes y ayuden a disminuir la concentración de elementos no deseados.

Así como los nutrientes en cantidades excesivas producen alteraciones a los vegetales cuando se necesita biorremediar un suelo afectado por residuos suelen ser una limitante dado que los suelos apropiados no son susceptibles de trasladarse, es necesario por lo tanto armar un suelo *in situ* con materiales que provengan de otro lugar y que den a los vegetales que serán usados en este proceso sostén, nutrientes, suficiente aireación y agua para su crecimiento y desarrollo. Para este objetivo se usa compost de residuos domiciliarios sumado a cortes de césped y podas arbóreas, también lodos provenientes de aguas servidas sanitizados y compostados.

La etapa final de cierre del relleno sanitario debe llevar a contar con un lugar de aspecto visual similar al entorno Surge la necesidad de disponer de un suelo apto para el establecimiento de especies arbustivas y herbáceas y generalmente se dispone de suelos pobres con limitaciones físicas, químicas y biológicas.

Debemos ensayar distintos sustratos aptos para el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales que se utilizaran y en lo posible producir esas mismas especies.

Las plantas crecen y se desarrollan usando nutrientes de la solución del suelo favorecidas por microorganismos que les colaboran en estos procesos, inclusive en la defensa hacia plagas y enfermedades. Por lo tanto también es recomendable inocular en semillas o en el suelo microorganismos tales como rizobios, micorrizas y promotores del crecimiento de las plantas (Vincent, 1976; Somasegaran, 1994; Camus, 2009; Lagos, 2005).

Los suelos que se usan suelen tener limitaciones diversas que en general implican problemáticas físicas, químicas y biológicas que limitan el buen establecimiento vegetal por lo cual debemos conseguir incorporar materia orgánica.

La materia orgánica se consigue de las podas de céspedes y ramas, los biosólidos o los residuos agroindustriales no tóxicos.

Esta materia orgánica debería acondicionarse de manera de que se degrade y se estabilice antes de usarse, utilizando un proceso como el de elaboración de compost o lombricompost, manejando correctamente los factores involucrados y con el uso de aceleradores de compostaje y lombrices californianas. (Brutti et al., 2002; Venneri 2012; Venneri et al., 2013).



**Figura 1.** De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, pila de compost con aireación pasiva. Foto A: Wachholtz. Lombriz californiana, compost elaborado con acelerador de compostaje, armado de una pila. Foto: Claudia Santibañez. Planta de compostaje en proceso cerrado con aireación forzada, Suecia. Chipeado de ramas de las podas municipales. Fotos: Lucrecia Brutti.

## Ensayos realizados para biorremediar el suelo

### Ensayo 1

En el exrelleno sanitario de Lepanto, San Bernardo, región Metropolitana, Chile, se estableció un experimento con especies herbáceas para recuperar el suelo, posterior a su etapa de clausura. El trabajo comenzó con la construcción de una terraza sobre la cobertura final de sellado del relleno sanitario; el suelo contuvo una mezcla con compost elaborado en el lugar basado en podas de ramas, césped y residuos verdes de las ferias libres. La terraza dara protección al sellado de la

basura, contendrá el cerro que concentra los residuos sólidos domiciliarios, aumentará la infiltración del agua en el suelo y entregará una gruesa cubierta de suelo donde se podrán establecer especies arbóreas, arbustivas y herbáceas, evitando que sus raíces entren en contacto con la cobertura final de sellado. Sobre la terraza mencionada se establecieron algunas especies herbáceas de césped conocidas, las que fueron ensayadas experimentalmente con el propósito de seleccionar la especie que mejor se adaptara a las condiciones del lugar. La investigación estuvo orientada a estudiar la respuesta en la germinación, la emergencia, el establecimiento, el cubrimiento, la resistencia al corte y la altura de raíces en las plantas de las especies herbáceas. Además, de un análisis de nodulación en plantas de trébol. Las especies herbáceas que se estudiarán corresponden a tres gramíneas, bermuda grass (*Cynodon dactylon*), festuca alta (*Festuca arundinacea*) y pasto azul (*Poa patrensis*); una leguminosa, trébol frutilla (*Trifolium fragiferum*) y una mezcla de las mismas especies. El estudio se completó realizando una identificación de las malezas más predominantes que crecieron en el ensayo experimental con el propósito de seleccionar el manejo de control más adecuado. Además, se determinó la presencia de malezas en el ensayo y se hizo un análisis posterior para evaluar la competencia entre las malezas presentes y las especies herbáceas establecidas. Se diseñó un sistema de riego por aspersión en el ensayo experimental. Además, este trabajo incluye información correspondiente a los costos involucrados en la construcción e instalación de la terraza, el sistema de riego y el ensayo experimental. De todas las especies herbáceas establecidas en el exrelleno sanitario de Lepanto, la bermuda grass (*Cynodon dactylon*) es la especie que responde bien a todos los aspectos evaluados de emergencia, establecimiento, cubrimiento y resistencia de sus plantas al corte. La mezcla de especies herbáceas responde bien a la emergencia, establecimiento y resistencia de sus plantas al corte, pero no así al cubrimiento. La festuca alta (*Festuca arundinacea*) también tiene una buena respuesta a la emergencia, establecimiento y resistencia de sus plantas al corte, pero hay presencia de algunas plantas muertas, un bajo crecimiento y desarrollo de sus plantas en algunos sectores del ensayo y un leve cubrimiento de sus plantas. El trébol frutilla (*Trifolium fragiferum*) tiene una buena respuesta al cubrimiento de sus plantas y una buena resistencia al corte, pero tiene una mala respuesta a la emergencia, establecimiento, crecimiento y desarrollo de sus plantas en algunos sectores del ensayo. La especie con peor respuesta a la emergencia, establecimiento, cubrimiento y resistencia de plantas al corte corresponde al pasto azul (*Poa patrensis*). Esta especie presenta un mayor número de plantas muertas y un bajo crecimiento y desarrollo de sus plantas en algunos sectores del ensayo. (Brutti y Lladser, 2005).



**Figura 2.** De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. Vista del lugar. Terraza armada. Demarcación y armado de parcelas. Riego de parcelas.

## Ensayo 2

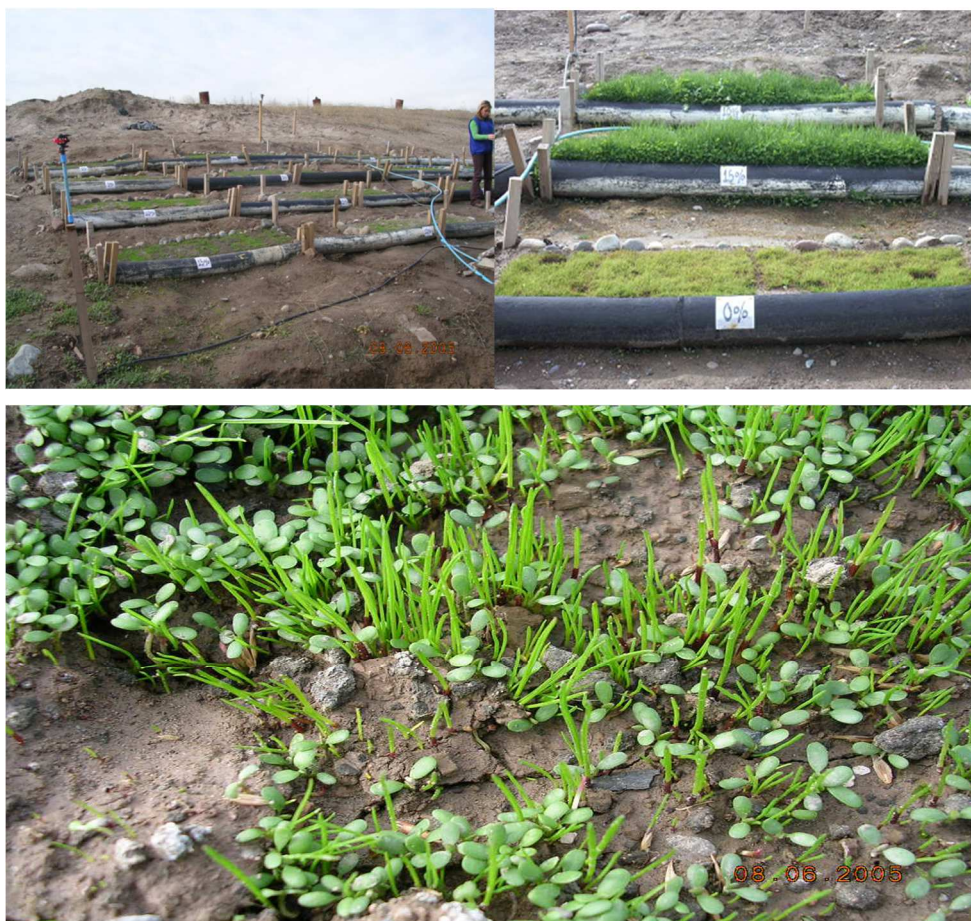
La producción de lodos o biosólidos requiere buscar alternativas de uso benéfico y sustentable. (Castro *et al.*, 2007; Eraso, 2007; Grace *et al.*, 2003; Granato *et al.*, 2005; Kim y Owens, 2010; Olaeta *et al.*, 1997; Quinchea y Carmona, 2004). Una alternativa de uso para los lodos es incorporarlo a suelos pobres con el fin de enriquecerlos para permitir el establecimiento de especies vegetales. En este caso se escogió el exrelleno sanitario de Lepanto. Este se encuentra en su etapa de cierre, la que contempla la recuperación del terreno y la construcción de un área verde. El estudio evaluó el comportamiento de tres especies herbáceas, trébol blanco enano (*Trifolium repens*), festuca (*Festuca arundinacea*) y poa (*Poa pratensis*), que juntas conformaron el césped para establecer en el lugar, sobre un suelo con dosis crecientes de lodo (0, 5, 10 y 15 %). Las variables que se evaluaron fueron: índice de velocidad de emergencia (IVE), producción de materia verde y seca de la parte aérea y raíces, además de una identificación y cuantificación de malezas. La incorporación a un suelo pobre de un 10 % de lodo otorga a este efectos positivos para el establecimiento de un césped. El IVE fue mayor en concentraciones de 10 % de lodo en el sustrato. La producción de biomasa aérea, tanto en peso verde como peso seco, en el suelo con 10 % de lodo es hasta 10 veces mayor que la producción en el suelo sin lodo. El césped establecido en el suelo sin lodo tuvo un gran crecimiento radicular y poca biomasa aérea sin lograr



buen cubrimiento del suelo. El suelo sin lodo es tan pobre que solo permite el establecimiento de algunas especies de malezas, a diferencia del suelo con concentraciones de 10 % y 15 % donde se observó una mayor variedad de especies (Lagos, 2006). Otra parte del estudio evaluó el pH, la conductividad eléctrica, la materia orgánica, la temperatura del suelo y la densidad aparente. (Brutti *et al.*, 2010).

Las mezclas conformadas con biosólidos otorgaron cualidades positivas para el establecimiento del césped, entregando mejores resultados los sustratos con 10 y 15 por ciento de biosólidos. El pH de las microterrazas fue siempre cercano al neutro, mientras que la conductividad eléctrica se encontró dentro de los rangos normales de salinidad. La materia orgánica, en el sustrato del 15 %, fue un 266 % mayor que el testigo, mientras que el sustrato del 10 % fue 177 % mayor que el testigo. Esto se evidenció claramente en las diferencias de crecimiento entre el testigo y los otros tratamientos. (Brutti y Garrido, 2007).

El biosólido no tiene problemas con respecto a su población de coliformes fecales debido a que cumple con la normativa vigente.



**Figura 3.** De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. Vista general de las terrazas. Distintas dosis de biosólido incorporado al suelo con la mezcla de especies creciendo. Germinación de las especies sembradas.

### Ensayo 3

Se evaluaron distintas especies herbáceas como estabilizadoras de taludes sobre una mezcla de suelo con biosólidos en el Relleno Sanitario Santiago Poniente en Santiago, Región Metropolitana, Chile, con el fin de recuperar el suelo. Se evaluó el comportamiento de cuatro tratamientos, tres corresponden a diferentes mezclas herbáceas más uno que actuó como testigo, la mezcla de suelo utilizada contenía un 15 % de biosólido. Las variables evaluadas fueron: temperatura del suelo del ensayo, producción de materia verde y seca de raíces, nodulación de raíces de leguminosas y cuantificación de malezas, índice de velocidad de emergencia (IVE), producción de materia verde y seca de la biomasa aérea e identificación de las malezas.

Los tratamientos correspondieron a: mezcla de suelo más biosólido (sin siembra), mezcla de *Poa pratensis*, *Trifolium repens*, *Festuca sp.*, mezcla de *Lolium perenne*, *Trifolium repens*, *Festuca sp.* y finalmente *Festuca rubra conmutata*, *Festuca rubra rubra*. Las mezclas herbáceas se desarrollaron sin dificultad con el manejo del agua y del suelo en el experimento. El tratamiento que presentó una rápida emergencia, mayor producción de materia verde y seca, además de tener menor variedad de malezas fue la mezcla compuesta de *Lolium perenne*, *Trifolium repens*, *Festuca sp.*, que podrá ser utilizada en el proceso de rehabilitación de área del Relleno Sanitario Santiago Poniente. La incorporación de 15 % de biosólidos a un suelo pobre produce efectos positivos para el establecimiento del prado (Vallejos, 2009; Camus, 2009; Brutti y Vallejos, 2012).



**Figura 4.** De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. Preparación del suelo en mezcla con 15 % de biosólido. Disposición de las parcelas de experimentación, suelo con el 15 % de biosólido. Ensayo antes del primer corte (22 días), muestra los tratamientos en el talud de la plataforma n.º 1. Ensayo antes del segundo corte (51 días), mostrando el desarrollo de los distintos tratamientos. Parcelas de experimentación, donde T1 corresponde a las parcelas sin desarrollo vegetal. Ensayo protegido con material reflectante para evitar el ataque de los depredadores.

#### Ensayo 4

Los residuos orgánicos provenientes de las explotaciones agroalimentarias, forestales, de las podas y cortes de césped, en su mayoría son dispuestos en rellenos sanitarios. Afortunadamente ha comenzado una industria dedicada a transformar la materia orgánica residual mediante procesos de degradación aeróbicos como compostaje y lombricultura. Los productos resultantes, adecuadamente acondicionados, pueden transformarse en un sustrato orgánico apto para producir alfombras de césped. Se demostró una técnica sustentable de cultivo de alfombras de césped que no erosiona el terreno y que compara distintos sustratos producidos a partir de residuos de la industria agroalimentaria. Esta consiste en capas de arcilla y sustratos orgánicos mezclado con suelo apisonados sobre un polietileno con perforaciones con bordes de madera que lo sujeten y sembrado con la mezcla cespitosa que se escoja, Este sistema ofrece la opción de enrollarlo o cortarlo en panes.

Los rellenos sanitarios cerrados serían un lugar óptimo para producción de carpetas de césped con destino a uso *in situ* y posible comercialización.

Los terrenos dedicados a esta tarea quedan erosionados por la constante quita de capas de suelo. Ante este escenario, se evaluaron formas de producción de carpetas de césped con diferentes tipos de sustratos sin provocar erosión. El presente trabajo muestra una técnica sustentable de cultivo de alfombras de césped que no erosiona el terreno y que usa distintos sustratos orgánicos en capas y mezclas.



**Figura 5.** De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, tamizado del material, esparcimiento en las bandejas, apisonado y siembra. Foto: Lucrecia Brutti.



**Figura 6.** Platabandas, 1 metro de ancho y 4 metros de largo. Ensayo con distintas especies. Cosechando carpeta de césped. Foto: Karina Alegría.

Para ello se utilizó un sistema conservador del suelo previamente diseñado y sobre él se mezcló y se dispuso en capas, suelo, arcilla, compost y tierra orgánica para disponer de un sustrato apto para el desarrollo de una mezcla cespitosa.

Se estableció un ensayo con un diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones de los tratamientos, T1 (Capa inferior de arcilla y superior 20 % compost y 80 % suelo) T2 (Mezcla de arcilla con 20 % compost y 80 % suelo) T3 (Capa inferior de arcilla y superior 20 % tierra orgánica Anasac y 80 % suelo) **T4** (Mezcla de arcilla con 20 % de tierra orgánica y 80 % suelo).

Se evaluó el comportamiento de una mezcla cespitosa compuesta por: trébol blanco (*Trifolium repens*), pasto azul (*Poa pratensis*), festuca alta (*Festuca arundinacea*), bermuda grass (*Cynodon dactylon*).

Se calcularon los rendimientos en peso fresco, así como también se realizaron mediciones de materia seca durante dos meses del ensayo.

Posteriormente, mediante sensores especializados se realizaron controles de radiación solar par, humedad y temperatura de los sustratos antes mencionados.

Los tratamientos T1 y T2 ambos con compost son más eficientes en el uso de la humedad (Brutti y Alvarado, 2007).



**Figura 7.** De izquierda a derecha, vivero para plantines de flor y árbolitos creciendo.

## Bibliografía

- BRUTTI, L.; GARRIDO, M. 2007. Evaluación de microterrazas para la formación de suelos en un ex relleno sanitario. Boletín N.º 23 Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. Temuco. Chile.
- BRUTTI, L.; LLADSER, F. 2005. Establecimiento de especies herbáceas en el ex relleno sanitario de Lepanto, ISWA 2005, Buenos Aires, Argentina.
- BRUTTI, L.; SANTIBAÑEZ, C.; VARNERO, M.; ALVARADO, P. 2002. Utilización de aceleradores de compostaje. 3.ª Jornadas Chilenas de Física y Química Ambiental, CENMA, Santiago, Chile.
- BRUTTI, L.; LAGOS, M.; GARRIDO, M. 2010. Resúmenes Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo. Rosario, Argentina, pp 298. Ed. Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo.
- CAMUS, C. 2009. Evaluación de especies herbáceas para rehabilitación del área en relleno sanitario Santiago Poniente. Tesis (Ingeniero Agrónomo). Santiago, Chile, Universidad Mayor. Escuela de Agronomía, p. 57. Disponible: <http://catalogo.sibum.cl> Visitado: noviembre 2016.
- CASTRO, C.; HENRÍQUEZ, O; FRERES, R. 2007. Posibilidades de aplicación de lodos o biosólidos a los suelos de sector norte de la Región Metropolitana de Santiago. Revista de Geografía Norte Grande, 37: 35-45.
- COORDINACIÓN ECOLÓGICA ÁREA METROPOLITANA SOCIEDAD DEL ESTADO (CEAMSE). Disponible: [www.ceamse.gob.ar](http://www.ceamse.gob.ar) visitado 14 de agosto de 2015.
- DANIELS, R.R.; STUCKMEYER, B.E.; PETERSON, L.A. 1972. Copper toxicity in *Phaseolus vulgaris* L. as influenced by iron nutrition. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 9, 249-254.
- EMPRESA METROPOLITANA DE RESIDUOS SÓLIDOS (EMERES). 2000. Plan de cierre relleno sanitario Lepanto. p. 100 p. Santiago, Chile.
- ERAZO, A. 2007. Opciones de uso y disposición en la Región Metropolitana. Tesis (Ingeniero Agrónomo). Escuela de Agronomía de la Universidad de Chile. Santiago, Chile. p. 90 p. Disponible: [www. http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2007/erazo\\_a/sources/erazo\\_a.pdf](http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2007/erazo_a/sources/erazo_a.pdf) visitado: noviembre de 2015.
- GRACE, V.M.; THAYER, M.W.; HOGAN, R.S. 2003. A Biosolids Management Approach that Emphasizes Environmental Sustainability. Proceedings of the Water Environment Federation, WEF/AWWA/CWEA Joint Residuals and Biosolids Management, pp. 961-977..

- GRANATO, T.; COX, A; HUNDAL, L.; SAWYER, B., LANYON, R. 2005. Marketing Biosolids for Beneficial Use in the Chicago Metropolitan Area. Proceedings of the Water Environment Federation, Residuals and Biosolids Management, pp. 87-11.
- INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. 2004. Compost: Clasificación y requisitos. NCH 2880: Of.2004. Santiago, Chile.
- KIM, K.R.; OWENS, G. 2010. Potential for enhanced phytoremediation of landfills using biosolids – a review. *Journal of environmental management*. v. 91, n.º 4, p. 791-797.
- LAGOS, M. 2006. Uso de biosólidos en la formación de suelos del ex Relleno Sanitario de Lepanto. Tesis (Ingeniero Agrónomo). Escuela de Agronomía, Universidad Mayor, Santiago, Chile. p. 57 . Disponible: <http://catalogo.sibum.cl> visitado: noviembre 2015
- MALONE, C.; KOEPPE, D.E.; MILLER, R.J. 1974. Localization of lead accumulated in corn plants. *Plant Physiol.* 53: 388-394.
- MARSCHNER, H. 1978. Nutritional and yield physiological aspects of plant nutrition. *Angew. Botanik* 52: 71-87.
- MATSUMOTO, H.; MORIMURA, S. 1980. Repressed template activity of chromatin of pea roots treated by aluminum. *Plant Cell physiol.* 21: 951-959.
- MENGEL, K.; KIRBY, E.A. 2000. Principios de Nutrición Vegetal, 4.<sup>a</sup> edición. Editorial Instituto Internacional de la Potasa, Basilea, Suiza.
- MISRHA, D.; KAR, M. 1974. Nickel in plant growth and metabolism. *Bot. Rev.* 4: 445-502.
- OLAETA, J.; ESPINACE, R.; SZANTO, M.; PALMA, J. 1997. Experiencia de reinserción de vertederos mediante la implantación de una cubierta vegetal. XII Congreso de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Copiapó, Chile.
- OTTOW, J.C.G.; BENCKISER, G.; WATANABE, I.; SANTIAGO, S.1983. Multiple nutritional soil stress as the prerequisite for iron toxicity of wetland rice. *Trop. Agric.* 60: 102-106.
- PRIMER TALLER INTERNACIONAL DE BIORREMEDIACIÓN. 2013. Libro de resúmenes Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- QUINCHÍA, A.; CARMONA, D. 2004. Factibilidad de disposición de los biosólidos generados en una planta de tratamiento de aguas residuales combinadas. *Revista EIA*, número 2, p. 89–108. Disponible: <http://revista.eia.edu.co/articulos2/8%20factibilidad.pdf> visitado: 27 de setiembre de 2015.
- RAUSER, W.E. 1973. Zinc toxicity in hydroponic culture. *Can. J. Bot.* 51: 301-304.
- REISENAUER, H.M.; WALSH, L.M.; HOEFT, R.G. 1973. Testing soils for sulphur, boron, molybdenum and chlorine. *Soil Testing and Plant Analysis*. Soil Sci. Soc. of America Inc. Wisconsin.
- RUFFY, T.W.; MINER, G.S.; RAPER, C.D. 1979. Temperature effects on growth and manganese tolerance in tobacco. *Agrn. J.* 71: 638-644.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. 1994. Handbook for Rhizobia. *Methods in Legume - Rhizobium Technology*. Springer\_verlag. New York, Inc.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. 1998. *Plant Physiology*, 2.<sup>a</sup> edición. Sinauer Associates Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts..
- UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO, FACULTAD DE INGENIERÍA. 1997. Informe sobre asesoría y monitoreo a la segunda etapa de construcción del parque la Feria. Santiago, Chile.
- UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO, FACULTAD DE INGENIERÍA. 1997. Diseño de un plan de cierre y rehabilitación de áreas utilizadas como vertederos o rellenos sanitarios. Santiago, Chile.

VALLEJOS, V. 2009. Uso de biosólidos en la rehabilitación de área en relleno sanitario Santiago Poniente. Tesis (Ingeniero Agrónomo). Escuela de Agronomía, Universidad Mayor, p. 57. Disponible: <http://catalogo.sibum.cl> visitado: noviembre de 2016.

VENNERI, M. 2012. Aceleración del proceso de compostaje para favorecer el uso sostenible de la tierra. Trabajo de intensificación para obtener el título de Licenciado en Ciencias Ambientales Huerta Orgánica Experimental, Cátedra de Edafología. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Disponible:<http://ri.agro.uba.ar> visitado: 16 de septiembre de 2016.

VENNERI, M.; GIARDINA, E.; BRUTTI, L.; GIUFFRE, L.; CLOZZA, M. 2013. Aceleración del proceso de compostaje para mantener el uso sustentable del suelo. Jornadas Argentinas de Conservación de Suelos 02-04 de junio de 2013. Buenos Aires, Argentina.

VINCENT, J.M. 1976. A Manual for the Practical Study of Root-Nodule. Bacteria. IBP Handbook n.º 15 Blackwell Scientific Publication. Oxford and Edinburgh.



## CAPÍTULO 14

### Suelos contaminados con hidrocarburos: un caso de estudio

Romina Romaniuk<sup>1</sup>, Lidia Giuffré,<sup>2</sup> Alejandro Costantini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Suelos, INTA Castelar.

<sup>2</sup>Cátedra de Edafología, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

\*Email: romaniuk.romina@inta.gob.ar

#### Introducción

Los hidrocarburos derivados del petróleo representan una fuente importante de energía para el hombre y son, a su vez, una importante fuente contaminante del medioambiente (Verma *et al.*, 2006). A lo largo del siglo XX se ha registrado un rápido incremento en la superficie de suelos contaminados con hidrocarburos y sus derivados. La disposición final de inmensas cantidades de lodo aceitoso generadas en refinerías, así como los derrames accidentales de aceite, propone grandes desafíos para la remediación de esas superficies (Vasudevan y Rajaram, 2001).

La estructura de los hidrocarburos consta de una base de enlaces C-C y comprenden desde moléculas simples hasta aquellas de decenas o centenas de átomos de carbonos, enlazados ya sea como cadenas lineales, ramificadas o formando anillos. Un hidrocarburo que consta de una molécula compuesta de anillos de carbono se denomina hidrocarburo cíclico y aquellos que incluyen un ciclo no saturado se llaman hidrocarburos aromáticos (Dickinson, 1992). Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) son compuestos orgánicos complejos que contienen dos o más anillos aromáticos y son originados durante la combustión incompleta o pirólisis de materia orgánica común en diversos procesos, naturales o antropogénicos.

Los compuestos aromáticos son contaminantes ambientales comunes en sitios en los que han ocurrido derrames de petróleo. Desde el descubrimiento de su poder cancerígeno los HPA han sido estudiados con gran interés desde distintos puntos de vista. Se encuentran presentes en el aire, en el suelo y en el agua en diversas cantidades; algunos pueden ser contaminantes persistentes, particularmente en la matriz del suelo y sedimentos. Es por ello, que organismos internacionales tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA) han regulado el control de estas sustancias en el medioambiente (Amador Hernández *et al.*, 1999).

Los suelos contaminados contienen gran cantidad de microorganismos que pueden incluir bacterias y hongos capaces de utilizar hidrocarburos (Sutherland, 1992). Su presencia es claramente una ventaja debido a que la adición de microorganismos degradadores no autóctonos al suelo no siempre es exitosa por no estar adaptados a las condiciones físico-químicas del lugar.

La biodegradación de los hidrocarburos está asociada con el metabolismo y con el crecimiento microbiano, y por lo tanto cualquiera de los factores que afectan al crecimiento microbiano puede influenciar sobre la degradación. La tasa de degradación microbiana de hidrocarburos en suelos es afectada por varios parámetros fisicoquímicos y biológicos que incluyen: el número y tipo de microorganismos presentes, las condiciones de la actividad de degradación microbiana (presencia de nutrientes, oxígeno, pH, salinidad, temperatura), la calidad, cantidad y biodisponibilidad de los contaminantes, y características de la matriz del suelo como distribución de tamaño de partículas (Margesin y Schinner, 1997; Joseph, 1990). Existen estudios que indican la biodegradación de los hidrocarburos aromáticos y n-alcanos bajo condiciones aeróbicas (Ericsson *et al.*, 1998; Gallego *et al.*, 2001; Saliven *et al.*, 2004), mientras que otros trabajos realizados bajo condiciones anaeróbicas con cultivos de enriquecimiento y microcosmos muestran que los consorcios microbianos también pueden degradar hidrocarburos tales como tolueno (Elshahed y Langenhoff, 1997), alquil-benceno (Chen, 1997; Ball, 1996), benceno, naftaleno y fenantreno (Burland, 1999; Kazumi *et al.*, 1997; Meckenstock *et al.*, 2000; Coates *et al.*, 1996), n- alcanos mayores de C6 (So y Young, 2001), alcanos ramificados (Bregnard *et al.*, 1996), y mezclas de hidrocarburos (Grishchenkov *et al.*, 2000).

La mineralización microbiana de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) en suelos ha mostrado una disminución en la medida que aumenta el tiempo de residencia de los HPA (Hatzinger y Alexander, 1995). Algunos compuestos pueden ser adsorbidos por arcillas, limitando así su degradación. Las interacciones entre los HPA y la materia orgánica del suelo se indican como las responsables de la disminución en la degradación a través del tiempo (Alexander, 2000; Ehlers y Luthy, 2003). En ellas participan mecanismos de partición, adsorción, absorción, difusión, disolución, y uniones covalentes, lo cual limita la cantidad de contaminante envejecido disponible para la biodegradación.

Entre los métodos disponibles para estudiar la biodegradabilidad de un compuesto es importante el estudio de la liberación de CO<sub>2</sub>. Este método se basa en el principio de que bajo condiciones aeróbicas y adición de nutrientes, los microorganismos pueden metabolizar una sustancia hidrocarbonada a dos productos finales: CO<sub>2</sub> y agua (Zhang *et al.*, 1998).

La biodegradación por poblaciones nativas de microorganismos representa uno de los principales mecanismos para eliminar el petróleo y otros hidrocarburos contaminantes del ambiente (Tempest *et al.*, 1978). La técnica de biorremediación, basada en el potencial biodegradativo natural de un suelo, es comúnmente llamada atenuación natural o biodegradación intrínseca y está propuesta como una forma costo-efectiva de remediación de bajo riesgo (Margesin y Shinner, 2001). La optimización de estos procesos tiene importancia práctica para disminuir el tiempo de remediación y economizar costos de tratamiento. A continuación se presentan resultados obtenidos por Romaniuk (2006) donde se evaluó la degradación de los hidrocarburos en suelos mediante atenuación natural, y con el agregado de un producto comercial. A los fines del ensayo se utilizó

aceite de cárter como fuente de hidrocarburos. También se evaluó el impacto sobre el pH, conductividad eléctrica y carbono total del suelo.

## **Caso de estudio: remediación y atenuación natural en suelos contaminados con aceite de cárter**

El aceite de cárter está compuesto por hidrocarburos alifáticos de cadena lineal e hidrocarburos policíclicos aromáticos, los cuales se destilan del petróleo crudo, y de varios aditivos para mejorar el rendimiento del aceite en el motor. También contiene metales como aluminio, cromo, cobre, hierro, plomo, manganeso, níquel, sílice y estaño, que provienen de partes del motor que se desgastan. Además, presenta pequeñas cantidades de agua, gasolina, anticongelante y sustancias químicas generadas por la combustión de la gasolina cuando esta se enciende dentro del motor.

La alta periodicidad con que el aceite usado de cárter es removido del motor de los automotores genera grandes cantidades del producto que son volcadas anualmente al medioambiente. Cuando dicho aceite entra en contacto con el suelo, algunos de los hidrocarburos que contiene se adhieren a su superficie quedando inmovilizados, mientras que otros se evaporan rápidamente. Los hidrocarburos que no se evaporan suelen permanecer en el suelo durante mucho tiempo, ya que no se disuelven en agua y generalmente no se degradan. La mayoría de los metales que se encuentran en el aceite usado de cárter permanecen en el ambiente durante mucho tiempo, y por lo tanto, pueden acumularse en plantas, animales, suelo, sedimentos y en agua de superficie que no fluye.

La información acerca de los niveles de sustancias químicas en el ambiente que provienen de liberaciones de aceite usado de cárter es escasa. Existen estudios que indican niveles elevados de varios componentes del aceite usado en el polvo, agua superficial, agua de escorrentía y tierra a lo largo de caminos en áreas industriales, comerciales y residenciales cerca de carreteras.

A los fines de estudiar el impacto de un posible vuelco o derrame de aceite de cárter a los suelos y su degradación en el tiempo se realizó un ensayo en macetas que contenían un suelo franco arcilloso, extraído del horizonte A de un Argiudol típico de una importante región productiva de Argentina. Se probó el efecto de la contaminación con aceite de cárter y el potencial de remediación de un producto comercial de formulación reservada, y que ha sido utilizado para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Cuadro 1). El nivel de contaminación aplicado fue del 25 % en peso. El diseño fue completamente aleatorizado y constó de tres repeticiones para cada uno de los cuatro tratamientos: suelo testigo sin contaminante ni producto comercial (T), suelo + producto comercial (T+X), suelo + aceite de cárter (A), suelo + aceite de cárter + producto comercial (A+X).

**Cuadro 1.** Algunas propiedades físicas y químicas del producto comercial.

	Densidad aparente (gcm <sup>-3</sup> )	Superficie específica (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	Absorción (%)	pH (1:2,5)	CE (ds m <sup>-1</sup> )
Producto comercial	6	10	65	7,5	2

Se tomaron muestras el tiempo 0, y a los 15, 30, 60 y 180 días de comenzado el ensayo. Para cada momento de muestreo se determinaron los HCT (hidrocarburos totales), de acuerdo con EPA 3550/418.1 y la respiración microbiana (R) (Jenkinson y Powlson, 1976) a los fines de evaluar su degradación. También se realizaron las determinaciones de carbono orgánico total (C) (Nelson y Sommers, 1982), pH actual y conductividad eléctrica (CE) del suelo.

Se realizó un análisis de varianza y Test de Tukey para comparación de medias entre tratamientos.

## Resultados y Discusión

### Hidrocarburos totales del petróleo: evaluación de su degradación

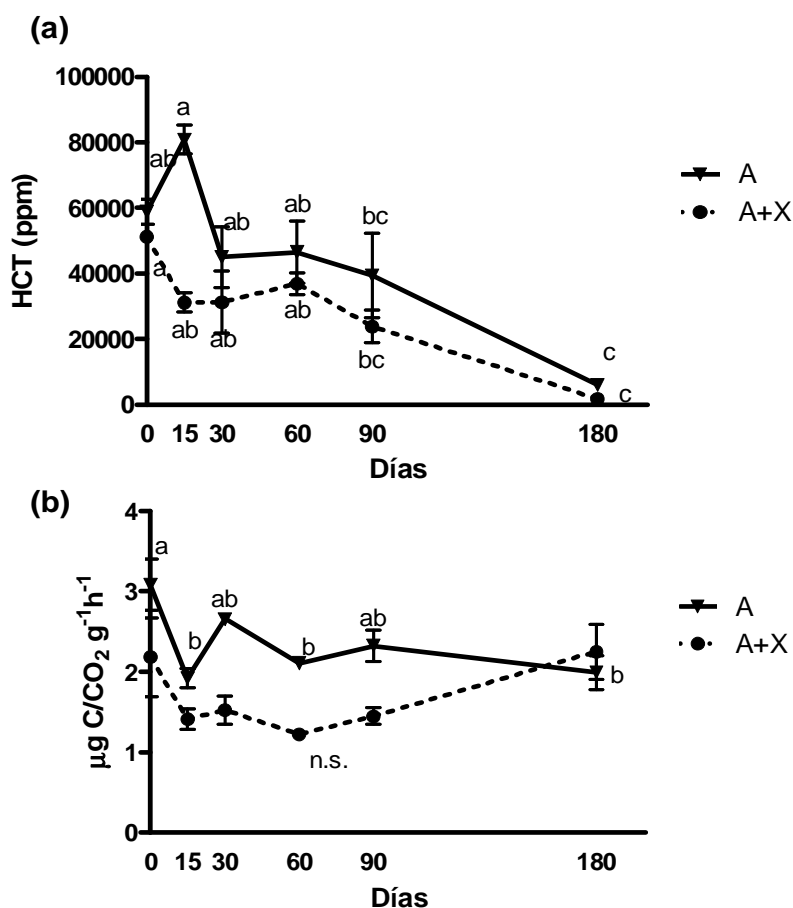
Los valores de HTP para T y T+X fueron significativamente menores que los encontrados para A y A+X en todos los tiempos de muestreo analizados (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Valores medios de hidrocarburos totales del petróleo (ppm) y diferencias encontradas entre tratamientos para los diferentes tiempos de muestreo analizados.

Tratamiento	Tiempo					
	0	15	30	60	90	180
A	58870 <b>b</b>	80892 <b>c</b>	44976 <b>b</b>	46543 <b>b</b>	39366 <b>b</b>	6076 <b>c</b>
A+X	51243 <b>b</b>	31140 <b>b</b>	31213 <b>b</b>	36839 <b>b</b>	23766 <b>ab</b>	1708 <b>b</b>
T	178 <b>a</b>	55 <b>a</b>	154 <b>a</b>	223 <b>a</b>	63 <b>a</b>	23 <b>a</b>
T+X	442 <b>a</b>	623 <b>a</b>	64 <b>a</b>	48 <b>a</b>	90 <b>a</b>	20 <b>a</b>

Letras diferentes indican diferencias significativas. P<0,05.

Los valores de HTP fueron mayores para A que para A+X en todos los tiempos de muestreo, aunque dichas diferencias solo fueron estadísticamente significativas para los tiempos 15 y 180, con menores valores para A+X.



**Figura 1.** Evolución en (a) los valores de hidrocarburos totales del petróleo; y (b) respiración basal a lo largo del tiempo para los tratamientos A y A+X. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tiempos de muestreo para cada tratamientos.  $P < 0,05$ .

Para A, la mayor tasa de disminución de HTP se encontró entre los 15 y 30 días, lo cual coincide con el mayor aumento en la tasa de respiración encontrada para este mismo período (Figura 1). Entre el tiempo 30 y 60, los valores de HTP se mantuvieron estables. A partir de este período comenzaron a disminuir nuevamente, encontrándose disminuciones significativas entre los tiempos 60 y 180. La disminución en la tasa de degradación de hidrocarburos a partir de los 30 días puede explicarse por la transformación o incorporación de los hidrocarburos en la fase estable sólida del suelo, lo que limita su liberación hacia la fase líquida, quedando inaccesibles para los microorganismos, lo que provoca una disminución en la tasa de biodegradación (Ehlers y Luthy, 2003).

En el caso de A+X, la mayor tasa de disminución de HTP se encontró durante los primeros 15 días. Esto estaría principalmente asociado al movimiento químico de los hidrocarburos dentro de los microporos del producto, más que a su biodegradación, ya que para este mismo período se encontró una disminución en los valores de respiración.

El suelo contaminado con aceite de cárter presenta los mayores valores de respiración a lo largo del ensayo. Esto se encuentra asociado a la utilización del C que forma parte de la estructura del

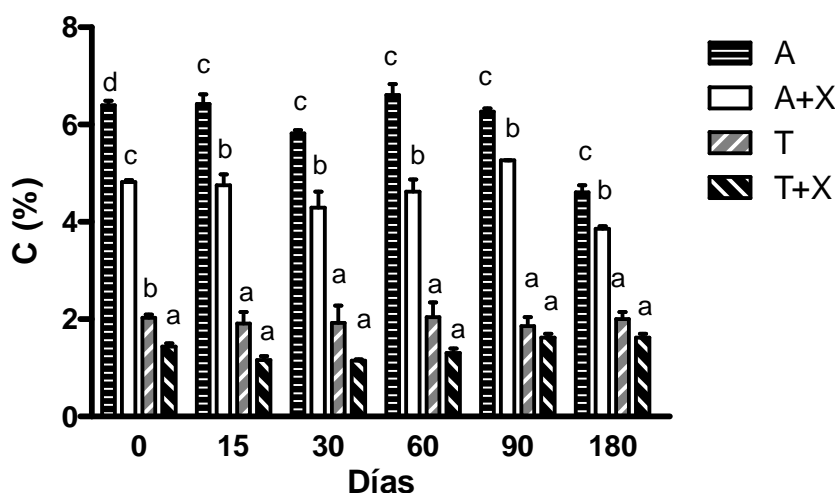
aceite como fuente de energía por los microorganismos del suelo. A su vez, es sabido que los suelos contaminados con hidrocarburos contienen más microorganismos que los suelos no contaminados, pero su diversidad microbiana es más reducida (Messarch y Nies, 1997).

El agregado del producto al suelo contaminado y al testigo trajo aparejada disminuciones en los valores de respiración. Las diferencias encontradas entre tratamientos fueron mayores entre A y A+X, con diferencias significativas para los tiempos 60 y 90. Para T y T+X esta disminución no resultó significativa. Este hecho estaría poniendo en evidencia la existencia de un proceso de oclusión física de HTP por parte del producto, y no de degradación por parte de los microorganismos del suelo.

Durante los primeros 15 días se produjo una disminución en la tasa de respiración de los tratamientos A y A+X, probablemente asociado a la presencia de altos niveles de metales pesados que pueden inhibir el crecimiento microbiano. Pasado este período se produjo un notable incremento en la tasa de respiración para A, no sucedió lo mismo en A+X. El aumento de la respiración en A podría responder a la adaptación a las nuevas condiciones de contaminación y posterior crecimiento de la flora microbiana del suelo. A partir de los 30 días, la tasa se mantiene relativamente constante hasta los 180 días para ambos tratamientos.

En la Argentina no se ha establecido, hasta el momento, un valor límite a partir del cual un suelo se considere remediado. Es por esta falta de normativa que generalmente se utiliza como guía el valor establecido por la legislación Holandesa, la cual estipula un valor límite de HTP de 5000 ppm. En la Tabla 2 puede observarse que el tratamiento A+X presenta valores por debajo del límite establecido por la legislación holandesa, mientras que A está por encima de estos valores, sin haberse logrado en este caso la remediación del suelo contaminado en el tiempo considerado para el ensayo. Es decir, que el agregado del producto al suelo contaminado con aceite de cárter fue exitoso en su remediación luego de 180 días de comenzado el ensayo.

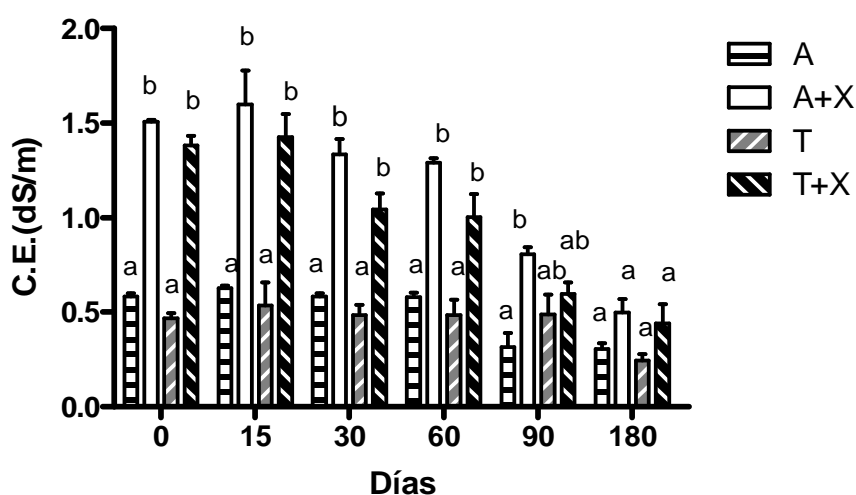
### Efecto del agregado de hidrocarburos sobre diferentes propiedades del suelo



**Figura 2.** Carbono orgánico total (%) del suelo para los tratamientos y tiempos de muestreo analizados. Letras diferentes indican diferencias significativas.  $P < 0,05$ .

Para el tiempo 0 el suelo contaminado con aceite de cárter presentó valores significativamente mayores de C que el suelo testigo (Figura 2). La adición del producto al suelo contaminado provocó una disminución significativa en los valores de carbono. En los demás momentos de muestreo (30, 60, 90 y 180) se mantuvo la misma tendencia. A los 180 días el valor de C en el suelo con agregado de hidrocarburos fue casi el triple al valor del suelo testigo, y más del doble cuando se adicionó el producto comercial, lo que podría estar asociado a que los HTP en estos tratamientos, aún no han alcanzado a degradarse en su totalidad (Tabla 2), fueron mayores a los del suelo testigo.

No se encontraron diferencias significativas en los valores de pH entre tratamientos para los tiempos de muestreo analizados, ni entre tiempos de muestreo para los diferentes tratamientos. Sin embargo el agregado del producto a los tratamientos trajo aparejado un aumento significativo en los valores de C.E (Figura 3), debido a sus mayores valores de CE respecto de los suelos.



**Figura 3.** Valores de conductividad eléctrica en el suelo para los tratamientos y tiempos de muestreo analizados. Letras diferentes indican diferencias significativas.  $P < 0,05$ .

Para los tiempos 0, 15, 30 y 60, los valores de conductividad eléctrica para los tratamientos con agregado de producto (A+X y T+X) fueron significativamente mayores que los respectivos tratamientos sin agregado de producto (A y T). Los suelos contaminados con aceite de cárter presentaron mayores valores que los suelos testigo, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Para el tiempo 180 no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

Para A+X y T+X puede observarse que los valores de CE fueron disminuyendo progresivamente a través del tiempo, alcanzando para el final del ensayo valores cercanos a los de los tratamientos

sin agregado de producto, lo cual podría deberse a la disgregación del producto o a la solubilización y lavado de este como consecuencia de las precipitaciones.

## Conclusiones

La degradación del aceite de cárter por atenuación natural fue más lenta y menos efectiva comparada con aquella obtenida al agregar el producto comercial, lográndose de esta manera valores finales de HCT más bajos y cercanos a los del suelo testigo para el período considerado para este ensayo.

El uso del producto comercial trajo aparejado aumentos estadísticamente significativos en los valores de conductividad eléctrica en todos los tratamientos, pero que no resultaron perjudiciales, ya que no afectan al normal funcionamiento del sistema edáfico.

## Bibliografía

- ALEXANDER, M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants, *Environ. Sci. Technol.* 34, 4259–4265.
- AMADOR HERNANDEZ, J.; LOPEZ MARTINEZ, L.; LOPEZ DE ALBA, P.L.; CALDERA, A.; ESTELA, J.M.; CERDA, V. 1999. Determinación simultánea de seis hidrocarburos policíclicos aromáticos en medio micelar por regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-1) utilizando espectros de fluorescencia de ángulo variable lineal. *Bol. Soc. Chil. Quím.*, vol.44, n.º 3, pp. 299-313.
- BALL, H.A.; JOHNSON, H.A.; REINHARD, M.; SPORMANN, A.M. 1996. Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *J. Bacteriol.* 178: 5755-5761.
- BREGNARD, T.P.A.; HÖHENER, P.; HÄNER, A.; ZEYER, J. 1996. Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 299-307.
- BURLAND, S.; EDWARDS, E. 1999. Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 529-533.
- CHEN, C.I.; TAYLOR, R.T. 1997. Thermophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 121-128.
- COATES, J.D.; ANDERSON, R.T.; LOVELY, D.R. 1996. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1099-1101.
- DICKINSON, T. 1992. *Enfoque Ecológico*, pp. 113-118.
- EHLERS, L.J.; LUTHY, R.G. 2003. Contaminant bioavailability in soil and sediment: improving risk assessment and remediation rests on better understanding bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* 37: 295A-302A.
- ELSHAHEED, M.S.; MCINERNEY, M.J. 2001. Is interspecies hydrogen transfer needed for toluene degradation under sulfate-reducing conditions? *FEMS. Microbiol. Ecol.* 35: 163-169.



- ERICKSON, M.; SWARTLING, A.; DALHAMMAR, G. 1998. Biological degradation of diesel fuel in water and soil monitored with solid-phase micro-extraction and GC-MS. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 129-134.
- GALLEGO, L.R.; LAREDO, J.; LLAMAS, J.F.; VÁZQUEZ, F.; SÁNCHEZ, J. 2002. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation.* 12: 325 - 335.
- GRISHCHENKOV, V.G.; TOWNSEND, R.T.; McDONALD, T.J.; AUTENRIETH, R.L.; BONNER, J.S.; YBORONIN, A.M. 2000. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process. Biochem.* 35: 889-896.
- HATZINGER, P.B.; ALEXANDER, M. 1995. Effect of aging on chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.* 29: 537-545.
- JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.*, 8: 209-213.
- LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. 1990. Microbial Degradation of hydrocarbon in the environment. *Environ. Microbiol. Rev.* Sept: 305-315.
- KAZUMI, J.; CALDWELL, M.E.; SUFLIT, J.M.; LOVELY D.R.; YOUNG, L.Y. 1997. Anaerobic degradation of benzene in diverse anoxic environments. *Environ. Sci. Technol.* 31:813-818.
- Margesin, R.; Shinner, F. 1997. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2660-2664.
- Margesin, R.; Shinner, F. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3127-3133.
- Meckenstock, R.U.; Annweiler, E.; Michaelis, W.; Richnow, H.H.; Schink, B. 2000. Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2743-2747.
- Messarch, M.B.; Nies, L. 1997. Modification of heterotrophic plate counts for assessing the bioremediation potential of petroleum-contaminated soils. *Environ. Technol.*, 18, 639-646.
- Nelson, D.W.; Sommers, L.E. 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. Page A L (Ed). *Methods of soil analysis. Part 2.* American Society of Agronomy, USA, Agronomy 9, pp. 539-579.
- Romaniuk, R. 2006. Remediación y atenuación natural en suelos contaminados con aceite de carter. Trabajo final para optar por el título de Especialista en gestión Ambiental en sistemas agroalimentarios. EPG-FAUBA.
- Salimen, J.M.; Tuomi, P.M.; Suortti, A.M.; Jørgensen, K.S. 2004. Potential for aerobic and anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in boreal subsurface. *Biodegradation* 15: 29-39.
- So, C.M.; Young, L.Y. 2001. Anaerobic biodegradation of alkanes by enriched consortia under four different reducing conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 473-478.
- Sutherland, J.B. 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *J. Ind. Microbiol.* 9: 53-62.
- Tempest, D.W. 1978. The biochemical significance of microbial growth yields: assessment. *Trends. Biochem. Sci.* 3: 180-184.
- Vasudevan, N.; Rajaram, P. 2001. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. *Environment International.* 26: 409-411.
- Verma, S.; Bhargava, R.; Pruthi, V. 2006. Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar, India. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 57, 207-213.
- Zhang, X.; Peterson, C.; Rece, D.; Haws, R.; Moller, G. 1998. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. *Trans. ASAE.* 41: 1423-1430.

## CAPÍTULO 15

### Residuos de cosecha con fines bioenergéticos: el rastrojo de maíz

Alberto Acevedo<sup>1</sup>, Gustavo Cruzate<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Suelos, Centro de Investigación de Recursos Naturales, Los Reseros y Las Cabañas s/n, 1712 Castelar, Buenos Aires, Argentina.

E-mail: [acevedo.alberto@inta.gob.ar](mailto:acevedo.alberto@inta.gob.ar)

#### Introducción

El progresivo agotamiento de los combustibles fósiles convencionales sumado al aumento del consumo de energía y de las emisiones de gases de efecto invernadero ha demandado la búsqueda de fuentes de energía alternativas, renovables, sustentables, eficientes, rentables y con menores emisiones. (Nigam y Singh, 2011).

Durante la transición dos términos han adquirido significativa notoriedad: biomasa y biocombustibles. Se entiende por biomasa la fracción biodegradable de productos de desecho y residuos procedentes de la agricultura, silvicultura y de las industrias relacionadas, así como de la fracción biodegradable de residuos industriales y municipales (Directiva 2003/30/CE). Desde un punto de vista de aprovechamiento energético, la biomasa se caracteriza por poseer bajo contenido en carbono y elevado contenido en oxígeno y en compuestos volátiles, estos últimos son los que concentran una gran parte del poder calorífico de la biomasa. Si bien el poder calorífico depende mucho del tipo de biomasa considerada y de su humedad, esta característica y el bajo contenido en azufre la convierten en un producto singularmente atractivo para ser aprovechado energéticamente.

En tanto, se designan biocombustibles a los combustibles renovables que se producen a partir de materias primas de origen agropecuario, agro-forestal-industrial o desechos orgánicos, motivo por el cual constituyen una de las tantas formas de energías renovables. Su nivel de contaminación es menor que otros combustibles tradicionales, dado que su combustión no produce compuestos de azufre y sus emisiones de dióxido de carbono netas son prácticamente nulas. Por su estado, los biocombustibles se pueden clasificar en líquidos (bioetanol y biodiésel), gaseosos (biogás) y sólidos (pellets de madera, leña, briquetas de caña, etc.); en tanto que de acuerdo a la materia prima empleada para su elaboración los biocombustibles pueden ser de primera, segunda o tercera generación (Acevedo, 2013).

Los combustibles de primera generación, basados en el empleo de los cultivos tradicionales, se han producido comercialmente en varios países, representando una alternativa para hacer frente a la demanda mencionada al inicio (Nigam y Singh 2011). El etanol es el combustible de primera generación más conocido y se puede obtener a partir de la fermentación de biomasa ricas en

azúcares (tallos de caña de azúcar y sorgo alcoholero azucarero y tubérculos de remolacha azucarera) y en almidones (granos de maíz, trigo y cebada y tubérculos de yuca, entre otros). Para la elaboración del biodiésel, basada en la transesterificación de los glicéridos, se usa aceite de especies oleaginosas, como soja, colza, palma de aceite, girasol y cártamo. Como los procesos de transesterificación se pueden adaptar para usar aceites de variadas fuentes, es factible elaborar biodiésel a partir de algunas especies vegetales terrestres (*Jatropha curcas*, *Ricinus communis*) y acuáticas (*Euglena gracilis*, *Chlorella sp.*), residuos pecuario-industriales (grasa animal) y residuos industriales (aceites usados) (Acevedo, 2013).

Sin embargo, la viabilidad de la producción de biocombustibles de primera generación sería cuestionable pues la utilización de solo una pequeña fracción de la biomasa total de la planta reduce la eficiencia de uso del suelo. Sumado a esto, la expansión de la frontera agrícola para fines bioenergéticos ha despertado controversias en distintos países. Por un lado, la superficie total de la caña de azúcar plantada en Brasil aumentó un 53 % entre 2004 y 2009 debido a la mayor demanda del combustible etanol (FAOSTAT, 2011). La expansión de las áreas de producción de caña de azúcar se adujo a la conversión de tierras abandonadas o degradadas que previamente habían sido taladas para el pastoreo de ganado en los estados del sur, ocasionando deforestación indirecta y desplazando el ganado de cría a las regiones más fronterizas (Goldemberg, *et al.*, 2008; Loarie *et al.*, 2011). Del mismo modo, la demanda de tierra para cultivar maíz para producir etanol aumentó 4,9 millones de hectáreas en los Estados Unidos entre 2005 y 2008, con efectos colaterales de gran alcance sobre la vida silvestre (Fargione *et al.*, 2009) y sobre la sustitución del cultivo de soja existente (Schilling *et al.*, 2008).

Por otro lado, el área cosechada de aceite de palma para la producción de biodiésel aumentó de 5.1 a 8.3 millones de hectáreas en Malasia e Indonesia entre 2000 y 2007, lo que representó un aumento del 63 % que se correlacionó con una duplicación de las importaciones europeas de aceite de palma (FAOSTAT, 2011). Más de la mitad de la reciente expansión de las plantaciones de palma de aceite en la región se produjo a expensas de los bosques, y el resto desplazando las tierras agrícolas existentes (Miyake *et al.*, 2012). En Argentina, la soja es la principal materia prima para producir biodiésel. Desde 1996, año en el que ingresó al país la semilla de soja transgénica, hasta 2009, año en que se intentó poner un límite al fenomenal avance de la expansión del cultivo de soja, la superficie sembrada ya había crecido algo más de un 143 % (CEPA, 2014). Estos ejemplos no hacen más que poner de manifiesto que una manera de satisfacer la creciente demanda mundial de biocombustibles pareciera restringirse principalmente a los países donde la expansión agrícola es todavía posible, y por lo tanto, la disponibilidad de la biomasa podría ampliarse a expensas del cambio de uso del suelo. En consecuencia, si para satisfacer la mayor demanda de biocombustibles se aumenta el área de siembra de aquellos cultivos de los que solo una parte se emplea como materia prima para generar biocombustibles, la producción de combustibles de primera generación enfrentaría un cuello de botella inminente ya que muy pocos países pueden expandir sus fronteras agrícolas.

Los biocombustibles de segunda generación se diferencian de los biocombustibles de primera generación en dos aspectos claves: 1. las materias primas utilizadas y 2. las tecnologías que se aplican para su fabricación. Es posible obtener bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica no comestible por el hombre, como ser: madera, especies vegetales (*Miscanthus giganteus*, *Panicum virgatum*, *Arundo donax*, *Pennisetum purpureum*, *Cynodon dactylon*, etc.), residuos forestales (aserrín, leña, arbustos, etc.), residuos agrícolas (tallos, hojas, chalas, marlos, etc.), residuos agroindustriales (cáscaras de arroz y de maní, pulpa y papel, etc.). Para su bioconversión en combustible se debe deconstruir la matriz lignocelulosa de la pared celular vegetal mediante una serie de pasos físico-químicos y eventualmente enzimáticos hasta conseguir glucosas y pentosas, las que se fermentan por acción de levaduras para obtener bioetanol.

Pero también es factible obtener biodiésel sintético a partir de procesos termo-químicos que utilizan la gasificación de la biomasa y el proceso Fischer-Tropsch. Estos procesos se conocen como "biomasa a líquido" (*biomass-to-liquid* - BTL).

Vale aclarar que la expresión biocombustibles de segunda generación tiene una amplia significación que incluye una gran variedad de combustibles y de tecnologías con un considerable número de variantes. Por lo tanto, si se toma como criterio clave el aprovechamiento de la planta completa para la producción del biocombustible líquido, el espectro de los tipos de biocombustibles va desde el bioetanol elaborado a partir de lignocelulosa hasta los combustibles sintéticos, como el biodiésel sintético producido mediante tecnologías de BTL.

La producción de biocombustibles líquidos de primera generación forma parte de una industria establecida en muchos países del mundo y en Argentina, específicamente, se vale de procesos tecnológicos maduros. En el país, la producción de biodiésel a partir del aceite de soja constituye uno de los mayores polos de producción, con tecnología de avanzada y escala que la posicionan entre las más eficientes del mundo. Hay 35 plantas comerciales de biodiésel que representan una inversión que supera los 1.500 millones de dólares y cuentan con una capacidad instalada de hasta 4.600.000 m<sup>3</sup> de biodiesel/año. La producción de bioetanol se sumó como un eslabón más de agregado de valor al complejo agroindustrial argentino. En el país hay 9 plantas comerciales que producen bioetanol de primera generación a partir del jugo del tallo de la caña de azúcar. Tienen en conjunto una capacidad de producción de 334.300 m<sup>3</sup> de bioetanol/año, lo que representa una puesta en valor y desarrollo de los ingenios localizados en Tucumán, Salta y Jujuy. Hay otras 5 plantas comerciales (3 en Córdoba, 1 en San Luis y 1 en Santa Fe) que producen bioetanol de primera generación a partir del almidón ubicado en el cariopse de maíz. En Córdoba se produce casi el 70 % del bioetanol a base de maíz y el 40 % de todo el etanol argentino. Las 5 plantas totalizan una capacidad de producción de 484.500 m<sup>3</sup> de bioetanol/año, lo que confiere un valor en origen a 1.000.000 toneladas del cereal, aproximadamente. Si se suman las capacidades de producción de las 14 plantas se dispone de 818.300 m<sup>3</sup> de bioetanol/año, cantidad suficiente para cortar el mercado argentino de naftas con el 10 % de bioetanol.

La tecnología para la producción de bioetanol de segunda generación se utiliza en numerosos países del mundo. Si bien en Argentina no se produce bioetanol lignocelulósico, la actividad se asoma como una instancia promisorio que podría complementar la fabricación de bioetanol en aquellas plantas que ya producen el biocombustible de primera generación, particularmente en aquellas que tienen capacidad de destilación ociosa.

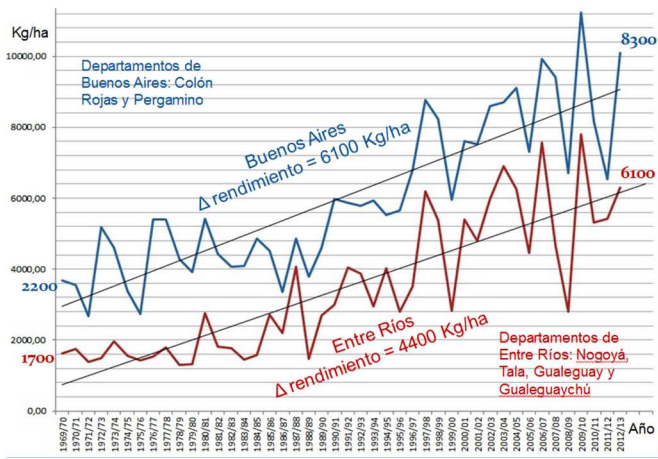
Dado este escenario, el objetivo de este trabajo consiste en dar a conocer, desde el punto de vista bioenergético, el estado actual del conocimiento sobre los residuos de cosecha de los cultivos usados como materia prima para producir bioetanol de primera generación en el país. Para elaborar bioetanol a partir de un residuo de cosecha este debe ser producido, debe estar disponible y tener buena distribución, debe ser recolectado del campo y transportado a la planta de producción y todo el proceso debe ser económico, social y ambientalmente sustentable. Habida cuenta del progresivo aumento de la capacidad de producción de etanol a partir de maíz y de que su industria posee un techo productivo más alto que el de etanol a partir de caña de azúcar, este trabajo describirá el potencial del residuo de cosecha de maíz para producir bioetanol lignocelulósico en el país.

## **Producción y distribución**

Se entiende por rastrojo de maíz al residuo agrícola de cosecha compuesto de hojas, tallos, marlos, chalas y panojas. Si bien en Argentina su principal uso productivo es como recurso forrajero, un uso alternativo consiste en emplear los rastrojos como materia prima para producir bioetanol lignocelulósico. Este proceso, a nivel nacional, exhibe oportunidades y desafíos que se abordarán a lo largo de este trabajo.

Para producir bioetanol a partir del residuo agrícola de maíz hace falta que el cultivo lo produzca. La producción del cultivo de maíz depende de los procesos de intensificación y extensificación de este. Se entiende por intensificación agrícola a la inversión suplementaria de medios de producción y de trabajo para obtener en la misma superficie cultivada una cantidad adicional de productos agrícolas. El resultado es un mayor rendimiento por unidad de superficie y tiempo.

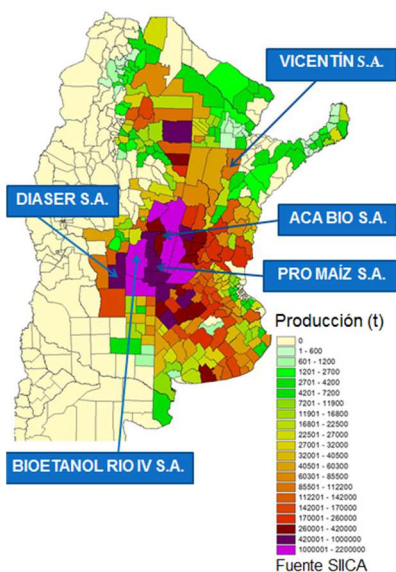
Los rendimientos de maíz determinados a lo largo de 43 años en tres departamentos (Colón, Rojas y Pergamino) de la provincia de Buenos Aires demuestran que durante ese período el incremento del rendimiento por unidad de superficie alcanzó los 6.100 kilogramos/hectárea; ocurrió lo propio en cuatro departamentos (Gualedguaychú, Nogoyá, Tala y Gualedguay) de la provincia de Entre Ríos en donde el incremento del rendimiento por unidad de superficie fue de 4.400 kilogramos/hectárea. Estos resultados demuestran la mayor disponibilidad de materia prima por unidad de superficie para producir bioetanol de primera generación desalentando la necesidad de expandir la frontera agrícola y evitando los riesgos propios de la expansión hacia ambientes más frágiles (Fig. 1).



**Figura 1.** Proceso de intensificación en maíz en tres departamentos de la provincia de Buenos Aires y cuatro de la provincia de Entre Ríos. Nótese que en ambas provincias hubo un significativo aumento de rendimiento por unidad de superficie entre las campañas 1969/70 y 2012/13.

La extensificación es otro sendero para incrementar la producción y consiste en expandir la frontera del cultivo hacia otros ambientes en donde no se cultivaba. En el país, la superficie implantada con maíz se incrementó en 3.508.079 hectáreas en los últimos 29 años; alcanzó las 5.880.330 hectáreas en la campaña 2015/16 (MINAGRI, 2016).

Si bien la distribución de la producción varía conforme las distintas regiones del país, en las áreas altamente productivas es precisamente donde están instaladas las plantas de producción de bioetanol de primera generación. Esto último se debe, entre otras cosas, a la mayor disponibilidad de materia prima/unidad de superficie y al menor costo de acarreo por estar más próximos los campos muy productivos del centro de procesado (Fig. 2).



**Figura 2.** Producción de maíz (campaña 2014/15) por departamento y localización de las plantas que producen bioetanol a partir de maíz. Nótese que las plantas están ubicadas en los departamentos de mayor producción.

## Composición química y potencial para uso como biocarburante

Cualquier material vegetal consta de tres componentes poliméricos principales: celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa es un polisacárido lineal, semicristalino, estéreo-regular que está constituido por unidades de D-glucopiranosilo repetidas, unidas por enlaces 1,4-β-glicosídicos. Las hemicelulosas son heteropolímeros amorfos hidrófilos. La lignina es un polímero aromático rígido, amorfo e hidrófobo, estable para algunos reactivos químicos y enzimas celulolíticas (Ioelovich, 2013). La celulosa y la hemicelulosa se pueden convertir en etanol y la lignina puede ser quemada en calderas para la generación de vapor y electricidad. En la naturaleza, la biomasa lignocelulósica puede contener 25–50 % de celulosa, 20–40 % hemicelulosas y 10–35 % de lignina (Ioelovich, 2013). La composición química del rastrojo de maíz y la de sus componentes demuestra que en conjunto o por separado exhiben contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina admisibles para permitir la deconstrucción de la matriz lignocelulósica, evitar el excesivo desgaste de los equipos y obtener suficiente rendimiento para la conversión a etanol. Por su parte, valores de proteína inferior a 10 % son importantes para la estabilidad del material y la prevención de la inhibición de los compuestos para los procesos de bioconversión. Finalmente, mantener el contenido mineral (cenizas) por debajo de 10 % evita el desgaste excesivo de los equipos (Babethanol, 2014) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Composición química del rastrojo de maíz y de sus componentes.

Tipo de residuo	Proteína (% MS)	Lignina (% MS)	Celulosa (% MS)	Hemicelulosa (% MS)	Minerales (% MS)
Rastrojo de maíz	4,3	5,3	33,4	34,5	5,8 <sup>(1)</sup>
Tallos y hojas	3,1-7,7	6,0-18,0	35,8-48,0	29,0	5,2 <sup>(1)</sup>
Marlos		12,0	35,0	38,0	<sup>(2)</sup>
Valores aceptables para producir etanol	<10,0	<22,0	>34,0	<30,0	<10,0 <sup>(1)</sup>

MS: Materia seca. Fuente: <sup>(1)</sup> Babethanol, 2014; <sup>(2)</sup> Ioelovich, 2013.

## Rendimientos potenciales

Una serie útil y práctica de reglas generales indica que:

1. El maíz produce, en términos de materia seca, tanto grano como rastrojo (Davidson, 2008; Petrolia, 2009). En consecuencia, si la producción de maíz en la campaña agrícola 2014/15 se estimó en 33,8 millones de toneladas de granos (MINAGRI, 2016), una cifra similar correspondió al rastrojo que quedó en el campo finalizada la cosecha.
2. Los marlos representan alrededor de un tercio del volumen de grano de maíz cosechado (Roth y Gustafson, 2014).

3. Sobre una base de materia seca, el marlo rinde en promedio alrededor del 14 % del rendimiento de granos y representa alrededor del 16 % de la biomasa total de rastrojo en el campo (Roth y Gustafson, 2014). En consecuencia, si se toma como referencia la estimación de la producción de maíz en la campaña agrícola 2014/15, la disponibilidad teórica de marlo a nivel nacional rondaría los 4,7-5,4 millones de toneladas, lo que representaría 846-972 millones de litros de etanol lignocelulósico obtenidos a escala piloto, con fermentación de azúcares C6 solamente y con una conversión de 180 litros/tonelada de marlo (principalmente) y hojas (Valles, comunicación personal).
4. Los marlos de maíz tienen rendimientos de materia seca de alrededor de 1,24 toneladas/hectárea (0,5 toneladas/acre) (Davidson, 2008).

## **Sostenibilidad**

La sostenibilidad constituye un tema central en la agenda de discusión internacional sobre los biocombustibles. Al respecto, la Directiva Europea de Energías Renovables fijó estándares para garantizar la sostenibilidad de los biocombustibles por lo que los que cumplen con tales estándares y son certificados por terceras partes disfrutan de beneficios impositivos y son contabilizados para las metas nacionales de reducción de emisiones de la Unión Europea (el 10 % de energía renovable en el sector transporte y el 20 % en todas las economías nacionales para el 2020). Para que el consumo de biocarburantes sea tenido en cuenta en el cumplimiento de los estándares tiene que proporcionar al menos una reducción del 35 % de los gases de efecto invernadero (GEI) con respecto a los carburantes de origen fósil, que es de 83.8 g CO<sub>2</sub>eq./MJ tanto para gasolina como para diésel oil. El umbral mínimo de ahorro de emisiones se eleva al 50 % a partir del 1/1/2017 y al 60 % a partir del 1/1/2018 (Directiva Europea de Energías Renovables, 2009).

Por lo tanto, verificar que los biocombustibles reducen emisiones por encima de los límites fijados será uno de los desafíos más trascendentes para la exportación de biocombustibles a la Unión Europea y Estados Unidos de América. Esto dependerá, para el caso del bioetanol a partir (del rastrojo) de maíz, de:

- 1) La tecnología empleada para producirlo. Una de las ventajas del rastrojo como fuente de materia prima para elaborar bioetanol es que es un subproducto de la producción de granos de maíz y no requiere de energía adicional para producirlo.
- 2) Los efectos del sistema de cultivo sobre el contenido de carbono del suelo. La pérdida de material húmico de los suelos cultivados es superior a la tasa de formación de humus de suelos no perturbados por lo que el suelo, bajo condiciones de cultivo convencionales, es una fuente de CO<sub>2</sub> para la atmósfera (Gifford, 1994). En el país, el empleo de la tecnología de siembra directa no



solo mantiene el carbono del suelo, sino también reduce el impacto de la erosión y reduce el uso de energía fósil en el cultivo.

3) La eficiencia de uso y grado de modificación de la energía utilizada en el proceso industrial. Las emisiones asociadas a toda la cadena de producción de bioetanol de primera generación de maíz y coproductos de ACABIO durante el período julio 2014-junio 2015 fueron 120.842 t CO<sub>2</sub>eq., con un valor por tonelada de maíz producida de 143 kg CO<sub>2</sub>eq/t, mientras que las emisiones por hectárea sembrada alcanzaron un valor de 1.312 kg CO<sub>2</sub>eq/ha. Durante dicho período se procesaron 297.829 toneladas de granos de maíz secos, obteniéndose 93.730 toneladas de alcohol 99 %, 182.665 toneladas de burlanda (WDGS), 24.334 toneladas de DDGS y 973 toneladas de aceite. Las emisiones estimadas de GEIs alcanzaron en planta las 64.676 t CO<sub>2</sub>eq. Del total de las emisiones, el 54 % aproximadamente corresponde a emisiones de la etapa industrial, 35 % a la producción de maíz en campos, 2 % a los fletes de materias primas y 9 % al transporte y distribución de productos elaborados (Hilbert *et al.*, 2016).

Pero más allá de la reducción de emisiones GEI hay otros indicadores que también hacen a la sostenibilidad ambiental, como el carbono orgánico del suelo, la erosión, el balance de nutrientes y la cantidad de rastrojo recolectado, que han sido investigados y muestran resultados controvertidos.

El carbono orgánico del suelo, COS, afecta la mayoría de las propiedades químicas, físicas y biológicas del suelo vinculadas con su: 1) calidad (Carter, 2002), 2) sostenibilidad (Carter, 2002; Acevedo y Martínez, 2003) y 3) capacidad productiva (Sánchez *et al.*, 2004) por lo que en un manejo sustentable, el COS debe mantenerse o aumentarse (Martinez *et al.*, 2008). Como la adición de rastrojo representa una entrada de carbono en el balance de carbono del suelo, el manejo de los rastrojos afecta el contenido del COS (Liska *et al.*, 2014), lo que lo convierte en un indicador informativo del manejo sostenible del suelo (Raffa *et al.*, 2015). En consecuencia, el mantenimiento del contenido óptimo del COS ha sido identificado como un criterio para definir una tasa de remoción de rastrojos sostenible para fines energéticos (Kludze *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2014).

La recolección del rastrojo de maíz para la producción de biocombustibles puede disminuir el COS (Wilhelm *et al.*, 2007; Anderson-Teixeira *et al.*, 2009) y aumentar las emisiones de CO<sub>2</sub> (Kochsiek y Knops, 2012), ya que el residuo C en biocombustibles se oxida a CO<sub>2</sub> a un ritmo más rápido que cuando se incorpora al suelo (Kutsch *et al.*, 2009).

Raffa *et al.* (2015) analizaron mediante estadística descriptiva, análisis multivariado y técnicas de minería de datos una base de datos (n = 660) compilada a partir de la evidencia científica de estudios experimentales publicados en la década 2003-2013 acerca de los efectos del manejo de los rastrojos sobre el COS y el rendimiento de los cultivos. Si bien el conjunto de datos mostró una amplia variabilidad como consecuencia de la amplia gama de factores biofísicos y de manejo que afectan la variación neta en el COS, los autores concluyen que: 1) los efectos de la extracción de rastrojos para fines bioenergéticos sobre el COS y el rendimiento del cultivo son sitio-específicos;

2) en las zonas áridas tropicales no se recomienda extracción de rastrojos en suelos gruesos, ya que esto reduciría el COS y los rendimientos; 3) la extracción parcial de rastrojos puede ser considerada en los climas templados cuando los suelos están bien dotados de COS, pero debe evitarse en suelos agotados con bajos niveles de COS y 4) el uso de los rastrojos no debe ser considerado como una gran avenida hacia la producción sostenible de la bioenergía.

La erosión del suelo es otra preocupación ambiental inmediata vinculada con la extracción de rastrojos para la producción de energía. Históricamente, el rastrojo de maíz se ha dejado en el campo como cobertura para reducir la erosión y para contribuir al contenido de nutrientes. El uso de rastrojo para la producción de energía, en caso de recolectarse por arriba de los niveles recomendados por tipo de suelo y clima, podría producir problemas de erosión en algunas zonas de producción de pendiente muy pronunciada (Petrolia, 2009).

Un tercer indicador relacionado con la sostenibilidad ambiental es el balance de nutrientes y la cantidad de rastrojo recolectado. La extracción del rastrojo de maíz para la generación de biocombustible afectará el reciclaje de nutrientes y posibles necesidades de fertilizantes para la próxima cosecha. En promedio, cada tonelada de rastrojo de maíz (concentración de nutrientes en planta adulta) contiene aproximadamente 25 libras N, 5,9 libras de  $P_2O_5$  y alrededor de 25 libras de  $K_2O$  (Sawyer y Mallarino, 2007); por lo tanto, en un cultivo de maíz que rinde 9.42 toneladas/hectárea (150 bu/acre) la recolección de 9,88 toneladas de rastrojo/ha (4 toneladas de rastrojo/acre) extraería 247 libras N, 58,3 libras de  $P_2O_5$  y 247 libras de  $K_2O$ /ha. Por un lado, aunque la remoción de nutrientes por hectárea se verá incrementada con el rendimiento y disminuida por la eficiencia de cosecha y el tiempo de permanencia en el campo, la remoción del rastrojo impactará significativamente en las necesidades de fertilidad. Por otro lado, mientras los rendimientos de biomasa de marlo son considerablemente menores que los del rastrojo, comparativamente los marlos tienen muy poco contenido de nutrientes y pueden ser una mejor materia prima para la producción de etanol que el rastrojo de maíz (Sheaffer *et al.*, 2010).

La recolección de las partes componentes de la planta de maíz, además de la cosecha del grano, resulta en una mayor extracción de los nutrientes de las plantas. Los efectos del incremento en la extracción de P y K en las necesidades nutricionales del maíz son inmediatos y deben tenerse en cuenta en los planes de fertilización. Los efectos sobre las necesidades de otros nutrientes como el N y S, requerimientos de encalado para mantener los niveles deseados de pH del suelo, COS, y varias propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo son menos evidentes en el corto plazo, pero tienen consecuencias en el largo plazo. Por lo tanto, la consideración del impacto en el ciclo de nutrientes (C incluido), la extracción de nutrientes y los recursos del suelo deben ser una parte del proceso de decisión cuando se piensa cosechar el rastrojo de maíz (Sawyer y Mallarino, 2007).

## Maquinaria para recolección del rastrojo

Una de las motivaciones para el desarrollo de los biocombustibles lignocelulósicos es reducir las emisiones de carbono. En consecuencia las actividades de recolección del rastrojo y posterior transporte deberían insumir la menor cantidad de combustible fósil posible.

El método tradicional de recolección de rastrojo de maíz se realiza mediante el corte-hilerado y la confección de un megafardo o rollo del rastrojo con posterioridad a la cosecha. La ventaja de este sistema es que corta y hace un hilerado simultáneo del rastrojo con bajo contacto con el suelo, evitando altos contenidos de tierra o cenizas, un factor nada deseable tanto para los procesos de bioenergía cuanto para la transformación en alimento para animales. La megaenfardadora es actualmente la maquinaria más empleada, ya que por capacidad de prensado y formato del megafardo posee ventajas en la logística del transporte (más kilogramos/camión) hacia la planta de procesado (Fig. 3) (Bragachini *et al.*, 2014).



**Figura 3.** Megaenfardadora para biomasa lignocelulósica.

Pero también es factible recolectar los rastrojos antes de que la biomasa alcance el suelo a través del sistema de enrollado de residuos en una sola pasada (Single Pass Round Bale System - SPRB) que consiste de una formación en tándem encabezada por la cosechadora, seguida de un sistema de acumulación de rastrojos, seguida de una enrolladora (Fig. 4). La cosechadora requiere un cabezal maicero que posea los rolos espigadores encontrados en el final de su recorrido, cortando la planta de maíz pocos centímetros por debajo del nudo donde se encuentra la espiga y permitiendo que el rastrojo ingrese a la cosechadora y se dirija al acumulador de biomasa ubicado entre la cosechadora y la rotoenfardadora. Luego del proceso normal de trilla, el rastrojo es triturado y direccionado hacia un sistema de acumulación de residuos que al llenarse activa automáticamente la enrolladora y confecciona el rollo y lo expulsa, sin detener el avance en ningún momento. Al expulsar el rollo, el acumulador de biomasa recibe nuevo material para enrollar.



**Figura 4.** Sistema de enrollado de residuos en una sola pasada.

Estimando la obtención de 4 rollos/ha (720 kilogramos/rollo) a partir de un híbrido de maíz con buen rendimiento y considerando 4,5 kilogramos de rastrojo/litro de etanol la conversión de biomasa (18 % humedad) a etanol, se producirían aproximadamente 640 litros de etanol lignocelulósico/hectárea (Bragachini *et al.*, 2014).

Las principales ventajas de este sistema son: 1) la mayor limpieza del rastrojo al evitar el contacto con el suelo, 2) la posibilidad de realizar la recolección del rastrojo al momento de la cosecha y 3) el ahorro de combustible y consecuente reducción de GEI al poder recolectar el rastrojo en una sola pasada.

## **Consideraciones finales**

Sin duda alguna la remoción del rastrojo de maíz, bien sea para fines bioenergéticos o para alimentación del ganado, lleva consigo la extracción de nutrientes. La cuantificación de la remoción del rastrojo para la producción de etanol lignocelulósico ha puesto sobre el tapete sus implicancias en materia de sostenibilidad ambiental, algo que antes pasaba desapercibido cuando el rastrojo era consumido por el animal ya que se hacía foco en la ganancia en peso del animal en lugar del impacto ambiental provocado por la cantidad de rastrojo removido con la ingesta del animal.

La fracción de rastrojo cosechable es sitio dependiente y varía ampliamente con la práctica de manejo del cultivo, el rendimiento del híbrido de maíz, el tipo de suelo y las condiciones climáticas que inciden sobre la velocidad de descomposición del rastrojo (Austin *et al.*, 2016), entre otros factores. Las 5 plantas comerciales que producen etanol a partir de maíz están localizadas en regiones en donde la disponibilidad del rastrojo es amplia y hay tecnología para recolectarlo y trasladarlo a la planta de procesamiento, por lo que la toma de decisiones para usar el rastrojo para generar etanol dependerá en gran medida de los indicadores descriptos en el trabajo y de la legislación vigente. Así como se legisló en materia de biocombustibles de primera generación (Solomon *et al.*, 2015), las futuras políticas energéticas nacionales deberían considerar el uso de los rastrojos con fines bioenergéticos en un marco de sostenibilidad de los diferentes ecosistemas agrícolas.

## Bibliografía

- ACEVEDO, A. 2013. Biocombustibles: tipos, generaciones y biomásas empleadas para su elaboración. *Agropost* 127: 4-5.
- ACEVEDO, E.; MARTÍNEZ, E. 2003. Sistema de labranza y productividad de los suelos. En: Acevedo, E. (ed.). *Sustentabilidad en Cultivos Anuales*. Santiago, Universidad de Chile, Serie Ciencias Agronómicas 8: 13-25.
- ANDERSON-TEIXEIRA, K.J.; DAVIS, S.C.; MASTERS, M.D.; DELUCIA, E.H. (2009) Changes in soil organic carbon under biofuel crops. *GCB Bioenergy* 1: 75-96.
- AUSTIN, A.T.; MÉNDEZ, M.S.; BALLARÉ, C.L. 2016. Photodegradation alleviates the lignin bottleneck for carbon turnover in terrestrial ecosystems. *PNAS* 113(16): 4392-4397.
- BABETHANOL 2014. New feedstock and innovative transformation process for a more sustainable development and production of lignocellulosic ethanol. Project reference: 227498 (FP7 2009-2014).
- BRAGACHINI, M.A.; BRAGACHINI, M.A.; SÁNCHEZ, F.R.; MATHIER, D.F. 2014 Novedades en maquinaria para cosecha de biomasa para bioenergía en el Farm Progress Show 2014. Disponible: [http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta\\_d7-novedades\\_en\\_maquinaria\\_para\\_cosecha\\_de\\_bioma.pdf](http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_d7-novedades_en_maquinaria_para_cosecha_de_bioma.pdf) visitado: 16 de septiembre de 2016
- CARTER, M.R. 2002. Soil quality for sustainable land management: organic matter and aggregation interactions that maintain soil functions. *Agron. J.* 94: 38-47.
- CENTRO DE ECONOMÍA POLÍTICA ARGENTINA (CEPA). 2014. La producción de soja en la Argentina. Septiembre 3, 2014. Disponible: <http://centrocepa.com.ar/la-produccion-de-soja-en-la-argentina/> visitado 16 de septiembre de 2016
- DAVIDSON, D. 2008. A look at some biomass harvest options in corn. *Top Farmer Crop Workshop Newsletter*, enero 2008.
- DIRECTIVA 2003/30/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO. 2003. Relativa al fomento del uso de biocarburantes u otros combustibles renovables en el transporte. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 123/42, 17.5.2003. Disponible: <http://www.ebb-eu.org/legis/OJ%20promotion%20ES.pdf> visitado: 16 de septiembre de 2016
- DIRECTIVA EUROPEA DE ENERGÍAS RENOVABLES. 2009. Disponible: <http://www.idae.es/index.php/relcategoria.1037/id.681/re/menu.322/mod.pags/mem.detalle> visitado: 25 de abril de 2016.
- FAOSTAT. 2011. FAOSTAT Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Disponible: <http://faostat.fao.org/> visitado: 16-de septiembre de 2016
- FARGIONE, J.; COOPER, T.R.; FLASPOHLER, D.J.; HILL, J.; LEHMAN, C.; MCCOY, T.; MCLEOD, S.; NELSON, E.J.; OBERHAUSER, K.S.; TILMAN, D. 2009. Bioenergy and Wildlife: Threats and Opportunities for Grassland Conservation. *BioScience* 59(9): 767-777.
- GIFFORD, R.M. 1994. The global carbon cycle: A viewpoint on the missing sink. *Aust. J. Plant Physiol.* 21: 1-15.
- GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; GUARDABASSI, P. 2008. The sustainability of ethanol production from sugarcane. *Energy Policy* 36: 2086-2097.

- HILBERT, J.A.; GALBUSERA, S.; CARBALLO, S.; DANTUR, M.A.; GALVAN, M.J.; VITALE, J.P.; MICHARD, N.; ACQUAROLI, S. 2016. Análisis de la industrialización integral de maíz mediante el análisis de ciclo de vida. I Conferencia Chilena de ACV, 8 de junio. V Seminario Internacional de RICV de la Red Ibero-Americana, 9 y 10 de junio.
- IOELOVICH, M. 2013. Effect of Chemical Pretreatments on Composition and Enzymatic Digestibility of Plant Biomass. *RRJC 3* (1): 23-31.
- JOHNSON, J.M.F.; NOVAK, J.M.; VARVEL, G.E.; STOTT, D.E.; OSBORNE, S.L.; KARLEN, D.L.; LAMB, J.A.; ADLER, P.R. 2014. Crop residue mass needed to maintain soil organic carbon levels: Can It Be Determined? *BioEnergy Res.* 7(2): 481-490.
- KLUDZE, H.; DEEN, B.; WEERSINK, A.; VAN ACKER, R.; JANOVICEK, K.; DE LAPORTE, A.; McDONALD, I. 2013. Estimating sustainable crop residue removal rates and costs based on soil organic matter dynamics and rotational complexity. *Biomass Bioenergy* 56: 607-618.
- KOCHSIEK, A.E.; KNOPS, M.H. 2012. Maize cellulosic biofuels: Soil carbon loss can be a hidden cost of residue removal. *GCB Bioenergy* 4: 299-233.
- KUTSCH, W.L.; BAHN, M.; HEINEMEYER, A. 2009. *Soil Carbon Dynamics: An Integrated Methodology*. Cambridge Univ. Press.
- LISKA, A.J.; YANG, H.; MILNER, M.; GODDARD, S.; BLANCO-CANQUI, H.; PELTON, M.P.; FANG, X.X.; ZHU, H.; SUYKER, A.E. 2014. Biofuels from crop residue can reduce soil carbon and increase CO<sub>2</sub> emissions. *Nat. Clim. Change* 4: 398-401.
- LOARIE, S.R.; LOBELL, D.B.; ASNER, G.P.; MU, Q.; FIELD, C.B. 2011 *Direct Impacts on Local Climate of Sugar-cane Expansion in Brazil*, Nature Climate Change. Macmillan Publishers Limited.
- MARTÍNEZ, H.E.; FUENTES, E.J.P.; ACEVEDO, H.E. 2008. Carbono orgánico y propiedades del suelo. *R.C. Suelo Nutr. Veg.* 8(1): 68-96.
- MINISTERIO DE AGROINDUSTRIA. 2016. Estimaciones Agrícolas. Disponible: [http://www.minagri.gob.ar/DIMEAGRO/indicadores/ofere-dem-int/2016/160225\\_Informe%20Mensual%20Estimaciones%20-%20Feb-2016.pdf](http://www.minagri.gob.ar/DIMEAGRO/indicadores/ofere-dem-int/2016/160225_Informe%20Mensual%20Estimaciones%20-%20Feb-2016.pdf) visitado: 18 de septiembre de 2016
- MIYAKE, S.; RENOUF, M.; PETERSON, A.; MCALPINE, C.; SMITH, C. 2012. Land-use and environmental pressures resulting from current and future bioenergy crop expansion: A review. *Journal of Rural Studies* 28: 650-658.
- NIGAM, P.S.; SINGH, A. 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science* 37: 52-68.
- PETROLIA, D.R. 2009. *Economics of Crop Residues: Corn Stover*. Conference, Little Rock, Arkansas. Transition to a Bioeconomy. The Role of Extension in Energy. Disponible: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.576.1043&rep=rep1&type=pdf> visitado: 18 de septiembre de 2016
- RAFFA, D.W.; BOGDANSKI, A.; TITTONELL, P. 2015. How does crop residue removal affect soil organic carbon and yield? A hierarchical analysis of management and environmental factors. *Biomass and Bioenergy* 81: 345-355.
- ROTH, G.; GUSTAFSON, C. 2014. *Corn Cobs for Biofuel Production*. Disponible: [http://articles.extension.org/pages/26619/corn-cobs-for-biofuel-production#cite\\_note-0](http://articles.extension.org/pages/26619/corn-cobs-for-biofuel-production#cite_note-0) visitado el 18 de septiembre de 2016.

- SÁNCHEZ, J.E.; HARWOOD, R.R.; WILLSON, T.C.; KIZILKAYA, K.; SMEEK, J.; PARKER, E.; PAUL, E.A.; KNEZEK, B.D.; ROBERTSON, G.P. 2004. Managing soil carbon and nitrogen for productivity and environmental quality. *Agron. J.* 96: 769-775.
- SAWYER, J.; MALLARINO, A. 2007. Nutrient removal when harvesting corn stover. [Integrated Crop Management 498\(22\)](http://www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/2007/8-6/nutrients.html). Disponible: <http://www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/2007/8-6/nutrients.html>. Visitado el 19 de septiembre de 2016.
- SCHILLING, K.E.; JHA, M.K.; ZHANG, Y.K.; GASSMAN, P.W.; WOLTER, C.F. 2008. Impact of land use and land cover change on the water balance of a large agricultural watershed: historical effects and future directions. *Water Resources Research* 44.
- SHEAFFER, C.; LAMB, J.; ROSENET, C. 2010. Corn stover: Ethanol production and nutrient uptake. University of Minnesota. Final Report: Diciembre 2010. Disponible: [http://www.mncorn.org/sites/mncorn.org/files/research/final-reports/201211/B6-CornStoverEthanolProduction\\_2.pdf](http://www.mncorn.org/sites/mncorn.org/files/research/final-reports/201211/B6-CornStoverEthanolProduction_2.pdf) Visitado el 19 de septiembre de 2016.
- SOLOMON, B.D.; BANERJEE, A.; ACEVEDO, A.; HALVORSEN, K.; EASTMOND, A. 2015. Policies for the Sustainable Development of Biofuels in Pan America: A Review and Synthesis of Five Countries. *Environ. Manage.* 56(6): 1276-94.
- WILHELM, W.W.; JOHNSON, J.M.F.; KARLEN, D.L.; LIGHTLE, D.T. 2007. Corn stover to sustain soil organic carbon further constrains biomass supply. *Agronomy J.* 99: 1665-1667.

## CAPÍTULO 16

### Biodegradación de residuos contaminantes provenientes de la actividad agropecuaria para la producción de biogás

María Emilia Rinland<sup>1</sup>, Gastón Iocoli<sup>1</sup>, Marisa Anahi Gómez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur – CERZOS CONICET.

E-mail: manahigomez@gmail.com

#### Introducción

Los residuos generados en los sistemas agropecuarios pueden provocar impactos ambientales negativos si no existe un control en el almacenamiento, en el transporte o en la aplicación, debido a la emisión de gases contaminantes hacia la atmósfera, y la acumulación de micro y macronutrientes tanto en el suelo como en los cuerpos hídricos superficiales.

La actividad agropecuaria y el manejo adecuado de residuos rurales pueden contribuir significativamente a la producción y conversión de residuos animales y vegetales (biomasa) en energía renovable y productos con valor agregado. La digestión anaeróbica de la biomasa es un proceso biológico complejo y degradativo en el cual parte de los materiales orgánicos de un substrato (residuos animales y vegetales) son convertidos en biogás por un consorcio de bacterias que son sensibles o completamente inhibidas por el oxígeno (Vanero Manero, 2011).

El biogás está constituido principalmente por metano (CH<sub>4</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y durante la digestión se produce el enriquecimiento de las fracciones minerales de N y P, lo que resulta en un efluente de los biodigestores (denominado digerido) que tiene una mezcla más equilibrada de nutrientes (Insam y Wet, 2008) que aumenta la biodisponibilidad para las plantas de dichos nutrientes, en comparación con el estiércol no digerido (Liedl *et al.*, 2006).

Así, la introducción de tecnologías de gestión adecuadas podría mitigar los riesgos ambientales asociados a la producción excesiva de residuos orgánicos derivados de la actividad agropecuaria mediante la estabilización antes de su utilización o eliminación. La estabilización implica la descomposición de un material orgánico en la medida en que se eliminan los riesgos y normalmente se refleja en la disminución de la biomasa y de la actividad microbiana y de las concentraciones de compuestos lábiles (Bernal *et al.*, 2009).

Sin embargo existen hasta el momento muchos problemas ambientales relevantes que deben ser analizados cuando los productos o subproductos de la transformación de residuos agropecuarios se aplican en los suelos agrícolas.

La rápida mineralización del C orgánico de los digeridos pone de manifiesto su alta biodegradabilidad. Esta característica junto con el elevado contenido de N total constituye un



parámetro que define su potencial fertilizante. Sin embargo los digeridos con materiales altamente biodegradables no son muy beneficiosos para la agricultura porque causan una elevada producción de C-CO<sub>2</sub> y producen la inmovilización del N y posiblemente, desnitrificación después de su aplicación a los suelos. No obstante, materiales de menor biodegradabilidad produjeron una menor cantidad de C-CO<sub>2</sub> y el amonio fue rápidamente nitrificado (Alburquerque *et al.*, 2012). La incorporación al suelo de materia orgánica fácilmente degradable podría llevar a un aumento excesivo de la actividad de los microorganismos del suelo induciendo la descomposición de la materia orgánica nativa del suelo, proceso denominado efecto de cebado (*priming effect*) (Fangueiro *et al.*, 2007).

La región del sudoeste bonaerense se diferencia del resto de la provincia por las características edafoclimáticas con pertenencia a las zonas áridas y semiáridas del país. En este espacio geográfico se advierte la fragilidad del ambiente y el requerimiento de dar sustentabilidad a las propuestas de desarrollo productivo y ambiental (Mazziotti, 2014). Un sistema de producción que pretenda ser sostenible debe contemplar acciones necesarias para que el suelo pueda mantener o mejorar su condición. Combinaciones de prácticas tendientes al mantenimiento o incremento del nivel de materia orgánica en el suelo a través del manejo de los aportes de carbono y de sus pérdidas contribuyen a la sostenibilidad del sistema (Studdert, 2014).

Debido al aumento de residuos como consecuencia de la producción intensiva y en el interés de que las producciones se desarrollen de manera sustentable en un ambiente frágil se han realizado varios estudios para analizar los posibles riesgos y las alternativas de transformación de los residuos de la región Valle Bonaerense del Río Colorado.

## **Biotransformación del residuo de la producción de cebolla en biogás**

En el sur de la provincia de Buenos Aires se encuentra el Valle Bonaerense del Río Colorado (VBRC) conformado por las localidades de Mayor Buratovich, Hilario Ascasubi, Pedro Luro (partido de Villarino), Juan A. Pradere y Villalonga (partido de Patagones). El VBRC es el principal productor de cebolla en el país, donde se cultivan anualmente entre 7.000 y 15.000 ha de cebolla. En esta región se produce más del 50 % de la cebolla que se consume en Argentina y más del 80 % de la destinada a exportación. En esta región, la producción de cebolla genera residuos constituidos por restos de hojas, tallos, raíces, catáfilas y bulbos descartados por su forma, tamaño o estado sanitario. Se estima que se descartan entre 12.000 a 20.000 t de desechos anualmente.

Además y en particular en la zona de Villarino Sur se han instalado 11 tambos, debido a que la zona ofrece las ventajas del riego para la producción de pasturas y su condición de región semiárida disminuye el riesgo de enfermedades del ganado, lo que ha generado una importante cantidad de efluentes de tambo.

## Características de la cebolla

La composición nutricional de la cebolla varía de acuerdo al cultivar, a la sección del bulbo, a las condiciones de crecimiento, a la duración y al tipo de almacenamiento. En general, la cebolla presenta entre 80-95 % de agua y tiene un contenido moderadamente alto de azúcares y fibra. Los carbohidratos no estructurales (glucosa, sacarosa y fructosa) componen el 65-80 % del peso seco. La cebolla tiene también una importante cantidad de fibra dietaria total y una alta proporción de fibra insoluble. La fibra dietaria insoluble de la catáfila constituye en promedio 44 % de la fibra dietaria total del bulbo de cebolla. Las hojas protectoras de la cebolla están compuestas principalmente por celulosa y polisacáridos pécticos. La fibra dietaria total decrece desde la parte exterior del bulbo a la interior (Benítez *et al.*, 2011; Jaime *et al.*, 2001; Jaime *et al.*, 2002). Además de las mencionadas características, la cebolla posee pH ácido, el cual varía entre 4 y 5 de acuerdo a las condiciones del bulbo.

La cebolla, al igual que todos los cultivos del género *Allium*, contiene gran cantidad de compuestos azufrados, responsables de sus aromas fuertes y penetrantes. Este tipo de aromas solo se ponen de manifiesto cuando se destruyen los tejidos y la enzima alliinasa entra en contacto con los precursores del sabor S-alquenil-cisteín-sulfóxidos (ACSOs) convirtiéndolos en compuestos olorosos (Griffiths *et al.*, 2002; Rose *et al.*, 2005). El mayor contenido de azufre se encuentra en las hojas internas y el menor, en las catáfilas externas (Benítez *et al.*, 2011). Se ha comprobado que extractos de cebolla tienen actividad antifúngica, antibacteriana, antiparasitaria y antiviral, ya que los compuestos azufrados son los principales agentes antimicrobianos (Corzo-Martínez *et al.*, 2007; Rose *et al.*, 2005; Zohri *et al.*, 1995).

## Factibilidad de la degradación anaeróbica del residuo de cebolla y variables de optimización

Entre los compuestos que causan frecuentemente inhibición de la digestión anaeróbica (DA) se encuentran los aceptores de electrones alternativos, el amoníaco y el sulfuro. Los aceptores de electrones alternativos, como el sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) son compuestos que causan que el flujo de electrones de la biometanización se aleje de la producción de metano ( $\text{CH}_4$ ) y aumente la actividad de microorganismos competidores, como las bacterias sulfato reductoras (BSR) y nitrato reductoras (BNR). Como consecuencia, disminuye la cantidad de  $\text{CH}_4$  y aumenta la formación de sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) y compuestos nitrogenados. Los distintos

microorganismos involucrados en la biometanización pueden ser inhibidos por el H<sub>2</sub>S producido por la actividad de las BSR.

Idealmente, en el reactor anaeróbico los productos de la acetogénesis constituyen los sustratos para la metanogénesis. En ambientes anaeróbicos con un exceso de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> las BSR compiten con las bacterias fermentativas, las bacterias acetogénicas y las arqueas metanogénicas (AM) por los sustratos (H<sub>2</sub> y acetato) más importantes para la producción de CH<sub>4</sub>. Las BNR también compiten por el sustrato con las AM acetotróficas en presencia de sus aceptores de electrones. Sin embargo, gran parte de la disminución en la producción de CH<sub>4</sub> es causada por la toxicidad de los productos intermedios de la desnitrificación (nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso) y no por la competencia. Rodríguez-Martínez *et al.* (2005) encontraron que el proceso de desnitrificación inhibe la reducción de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en reactores con concentraciones altas de nitrato. Además se demostró que el nitrito inhibe parcialmente la actividad de las BSR. Sin embargo, las AM y BSR reanudan su actividad luego de que el nitrito es consumido.

La composición del sustrato de origen determina la proporción de los gases que conforman el biogás. Por lo tanto, el principal problema de la presencia de compuestos de azufre en la biomasa está relacionado con la producción de H<sub>2</sub>S por las BSR. Cuando se desea emplear sustratos no tradicionales en la DA y con características desventajosas como la del residuo de cebolla (con pH 4, compuestos azufrados y actividad antibacteriana) es importante realizar experimentos a escala de laboratorio con el fin de predecir el potencial y las limitaciones que tendrán para ser degradados anaeróbicamente. En trabajos previos se detectó que el residuo de cebolla contiene microorganismos nativos con la capacidad de degradarlo en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Rinland y Gómez, 2015; Rinland, 2015). Ante la falta de conocimiento sobre la utilización del residuo de cebolla como sustrato para la biometanización, se realizaron una serie de estudios para evaluar su aptitud para la DA que consistieron básicamente en dos partes. En primer lugar, se estudió la aptitud del residuo de cebolla para la DA y el comportamiento de las BSR y BNR durante la degradación. En segundo lugar, se realizaron experimentos para evaluar variables (inóculo y temperatura) con la finalidad de detectar las condiciones más adecuadas para la biodegradación anaeróbica del residuo de cebolla.

## **Dinámica de las BSR y BNR en la biodegradación anaeróbica del residuo de cebolla**

En biorreactores de 6 l se prepararon cuatro tratamientos por duplicado: 1) BC 50 % cebolla, 2) BCC 25 % cebolla y 25 % catáfilas externas, 3) BU 50 % cebolla y urea (10 % peso de cebolla) y 4) BCV 50 % cama de vaca. El 50 % restante del volumen de los reactores se completó con agua. Se utilizó cebolla de descarte, la cual se cortó en cuartos antes ser incorporada. Se usó cama de vaca (mezcla de estiércol vacuno y paja) como tratamiento control. Los reactores se mantuvieron

a 20 °C durante todo el ensayo. Se hicieron muestreos mensuales durante seis meses, en los cuales se midió el pH y se cuantificaron las BSR y BNR.

Los tratamientos BC y BCC mantuvieron un valor de pH 4 durante todo el ensayo, mientras que BU y BCV presentaron pH 7 a lo largo de la experiencia. Luego de seis meses de ensayo, se observó total licuefacción del residuo solo en BU. En los tratamientos restantes se produjo una degradación parcial de la cebolla.

En todos los tratamientos el número de BNR fue siempre superior al de las BSR (Tabla 1). En BCV se observó la mayor diferencia entre estos grupos funcionales, el número de BNR superó en al menos 3 órdenes de magnitud a las BSR en todos los muestreos. Inicialmente, el número de BNR fue alto y luego los recuentos disminuyeron hasta valores encontrados en otros reactores anaeróbicos (Akunna *et al.*, 1992). En el tratamiento BU, el desarrollo de las BSR fue estadísticamente diferente ( $p < 0,001$ ) al de los otros tratamientos ya que su número fue siempre superior (3 a 5 unidades  $\text{Log}_{10}$  NMP) al registrado en el resto de las mezclas. Además, estas bacterias estuvieron presentes en todos los muestreos en BU, mientras que en los restantes tratamientos no se las detectó a partir del tercer muestreo. Esto estaría indicando que el residuo de cebolla es más propicio para el desarrollo de las BSR que el estiércol. A pesar de esto, el número de BSR no fue mayor al encontrado en otros digestores anaeróbicos que funcionaban de manera estable (Chartrain y Zeikus, 1986; Li *et al.*, 1996; Mizuno *et al.*, 1998). Por lo tanto, a pesar del contenido de compuestos azufrados del residuo de cebolla, se podría asumir que la población de BSR en los digestores anaeróbicos no interferirá negativamente en la biometanización.

**Tabla 1.** Recuento de BSR y BNR en los distintos tratamientos, expresado en  $\text{Log}_{10}$  NMP. Los valores corresponden a la media de las repeticiones.

N.º	BC		BCC		BU		BCV	
	BSR	BNR	BSR	BNR	BSR	BNR	BSR	BNR
1	4,2	9,6	4	7	7,7	12,2	2,7	9,6
2	2,5	3,9	1,9	7	5,3	8,4	3,1	9,3
3	0	3,4	0	2,4	4,8	8,1	2,9	6,7
4	0	3,1	0	2	5,7	9	0	6,2
5	0	5,8	0	3,9	4,6	6,2	0	6,5
6	0	4,5	0	3,1	3,7	6,4	0	6,6

El tratamiento BU presentó características que lo diferenciaron de los otros dos tratamientos que contenían residuo de cebolla. En primer lugar, las BSR se detectaron durante todo el ensayo

mientras que en los otros tratamientos no se detectaron a partir de los tres meses. En segundo lugar, el residuo se degradó totalmente (licuefacción en seis meses) y finalmente, el pH se mantuvo en 7 a lo largo del ensayo. En función de la composición de los tratamientos se puede asumir que la adición de urea produjo efectos positivos sobre la biodegradación anaeróbica de cebolla.

## **Estudio de variables para la optimización de la biodegradación anaeróbica de cebolla**

Con el fin de lograr optimizar la biodegradación anaeróbica de la cebolla se analizó la influencia de la temperatura y del aporte de inóculo, proveniente de los biorreactores del ensayo anterior, para incorporar comunidades microbianas degradadoras activas.

En el siguiente ensayo se utilizaron minirreactores que consistían en un pote plástico de 1 kg con tapa a rosca. La cebolla fue cortada con chipeadora en trozos de aproximadamente 1 x 3 cm. Se seleccionaron como inóculo los efluentes de los tratamientos BC y BU del ensayo anterior. Se realizaron tres tratamientos: 1) MR-C 50 % cebolla y 50 % agua, 2) MR-I 50 % cebolla y 45 % agua 5 % inóculo BC y 3) MR-IU 50 % cebolla, urea (10 % peso de cebolla), 45 % agua y 5 % inóculo BU. Los potes se sellaron con papel film y se incubaron en estufa a 35 °C.

A los 60 días del inicio del estudio, solo en el tratamiento MR-IU se observó la casi completa licuefacción de los residuos. Esto indicaría que las modificaciones realizadas en este ensayo, es decir, el aumento de la temperatura de incubación, el menor tamaño del sustrato y la incorporación de inóculo lograron que la degradación anaeróbica de la cebolla se acelere en aproximadamente 120 días con respecto al ensayo anterior.

En el último ensayo, se prepararon dos tratamientos por sextuplicado en los minirreactores descritos anteriormente: A 50 % cebolla, urea (10 % peso de cebolla), 45 % agua y 5 % inóculo MR-IU y B 50 % cebolla, urea (10 % peso de cebolla) y 50 % agua. Tres réplicas de cada tratamiento fueron incubadas a 18 °C y tres a 35 °C durante 60 días. De cada minirreactor se tomó una muestra inicial y final en las que se cuantificaron los sólidos totales (ST) y volátiles (SV) de acuerdo al método estándar (APHA 1992). El interés de evaluar la biodegradación en condiciones de bajas temperaturas se debe a la posibilidad de instalar biorreactores a campo, sometidos a las condiciones ambientales de la región.

En la incubación a 35 °C, el tratamiento A fue el que presentó la mayor reducción de ST y SV (50 y 22 % respectivamente), en contraposición con el tratamiento B que solo tuvo una reducción del 10 % de ST y 3,5 % de SV. Esta degradación se produjo en un período de 60 días. En la incubación a 18 °C no hubo gran diferencia en la reducción de ST y SV entre los tratamientos, estos valores fueron 9,8 y 4,5 % respectivamente. Sobre lo observado en nuestros ensayos se

puede inferir que en condiciones mesofílicas, la incorporación de urea y el enriquecimiento del reactor con un inóculo aclimatizado al sustrato favorecen la degradación del residuo de cebolla.

Finalizados todos los ensayos, se utilizaron cebadores específicos para la amplificación selectiva de los genes *dsrAB* que codifica para la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  de la sulfito reductasa desasimilatoria (reducción de sulfato); *narG* que codifica para la enzima nitrato reductasa (reducción de nitrato); FTHFS que codifica para la enzima 10-formiltetrahidrofolato sintetasa (acetogénesis) y *mcrA* que codifica para la subunidad  $\alpha$  de la metil-coenzima M reductasa (metanogénesis), para analizar las muestras tomadas de los tratamientos que fueron utilizados como inóculo y en el que se logró mayor degradación de la cebolla al final del tercer ensayo (tratamientos BC, BU, MR-IU y A 35 °C).

El fragmento del tamaño esperado para el gen *dsrAB* amplificó en todas las muestras excepto en BC. La amplificación del gen *narG* en los tratamientos con incorporación de urea, en contraposición a la no detección de este en el tratamiento sin urea (BC), estaría indicando que el agregado de una fuente nitrogenada estimula la actividad de las BNR y BSR. Se detectó la presencia del gen FTHFS en todos los tratamientos, por lo que se asume que la producción de acetato para la metanogénesis es factible en todos ellos. Por el contrario, no se detectó mediante PCR el fragmento del gen *mcrA* en ninguna de las muestras. Esto era previsible dado que no se incorporó en los reactores una fuente de AM. Por lo tanto, utilizando únicamente residuo de cebolla no sería factible la producción de biogás.

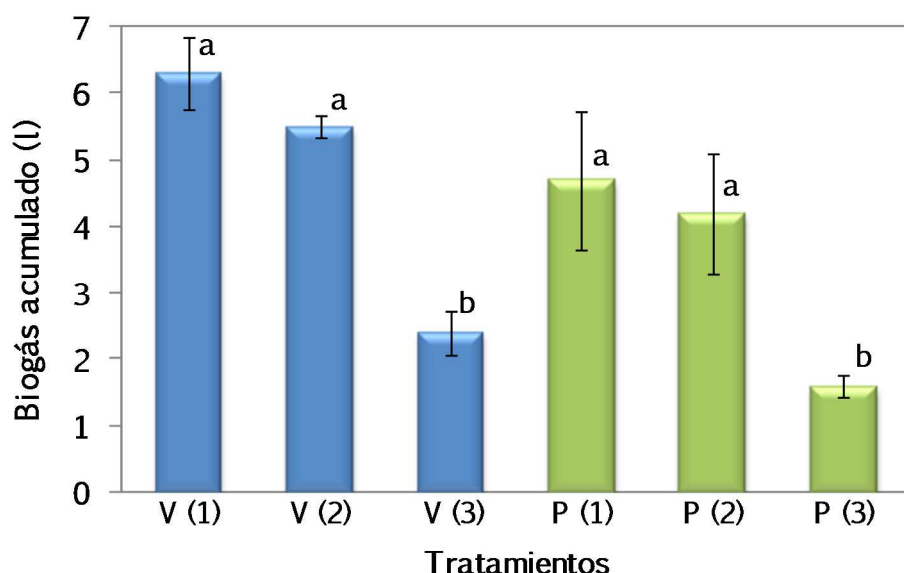
## **Producción de biogás a partir del residuo de cebolla**

Se evaluó el efecto de la DA del residuo de cebolla con barros activados en tres cargas sucesivas en biorreactores operados en *batch*, con un volumen de trabajo de 1,8 l. Se armaron dos tratamientos con ocho repeticiones: 1) V 35 % cebolla, urea (10 % peso de cebolla), 37 % agua, 28 % barro activado vacuno y 2) P 35 % cebolla, urea (10 % peso de cebolla), 37 % agua, 28 % barro activado porcino. En la carga inicial se adicionaron barros activados como inóculo de AM, que fueron tomados de dos biorreactores rurales, el reactor BV estaba preparado a partir de estiércol vacuno y el reactor BP a partir de estiércol porcino. Cuatro repeticiones de cada tratamiento fueron incubadas al azar a 18 °C y las restantes a 35 °C. Los reactores se agitaron diariamente para mezclar su contenido y favorecer la liberación del gas. Una vez finalizado el proceso de digestión de la carga inicial, se realizó la segunda carga de los biorreactores. En primer lugar, se procedió a realizar el vaciado del volumen superior del reactor, dejándose un 28 % como barro activado. Seguidamente se agregó cebolla, urea y agua en las mismas proporciones que en la carga inicial. Este mismo procedimiento se repitió para realizar la tercera carga. De cada biorreactor se tomó una muestra inicial y final en las que se midió el pH y se determinaron los ST y SV de acuerdo al método estándar (APHA 1992) y posteriormente se

estimó el grado de digestión en cada biorreactor (Wan *et al.*, 2013). Se midió el volumen de biogás producido mediante desplazamiento de una columna de agua y se comprobó si el gas era inflamable. Se contabilizó la descarga del reactor como inflamable si se producía una llama azul en el mechero de Bunsen. Para detectar la presencia de las AM se utilizó el par de cebadores MLf–MLr que amplifican el gen *mcrA* que codifica para la subunidad  $\alpha$  de la metil-coenzima M reductasa, responsable del paso final de la síntesis de CH<sub>4</sub> (Juottonen *et al.*, 2006). Para el análisis de la comunidad de *Eubacteria* se realizó PCR-DGGE con los cebadores 984F-GC/1378R que amplifican un fragmento de la región V6-V8 del 16S ARNr (Heuer *et al.*, 1997).

## Digestión anaeróbica a 35 °C

En todas las cargas, el tratamiento V produjo mayor cantidad de biogás que P. Particularmente en la última carga, se observó una disminución significativa en el volumen producido en ambos tratamientos (Fig. 1). Todas las muestras amplificaron el fragmento del tamaño esperado (~470 pb) para el gen *mcrA*, indicando la presencia de las AM en todos los reactores. Mediante el agregado de barro activado, generado tanto con estiércol de vaca como de cerdo, se logró la producción de gas inflamable en todas las cargas. Por lo tanto, la incorporación de este tipo de barro en el biorreactor aporta AM y hace factible la producción de biogás a partir del residuo de cebolla.



**Figura 1.** Volumen total de biogás producido en cada carga de los biorreactores a 35 °C. Los valores corresponden a la media de las repeticiones. En azul se representan las digestiones con barro activado

vacuno (V) y en verde con barro activado porcino (P). Los números entre paréntesis corresponden a los distintos ensayos: (1) carga inicial, (2) segunda carga, (3) tercera carga.

En las tres cargas, el pH se mantuvo en el rango adecuado para la producción de CH<sub>4</sub> (Tabla 2). Indicando que, a 35 °C, ambos barros activados tuvieron capacidad tampón frente al residuo de cebolla, el cual posee pH ácido. De este modo, el agregado de barro estaría logrando dos objetivos: incorporar AM y contrarrestar el pH ácido del residuo de cebolla. En la tercera carga, el tiempo de retención (HRT, determinado en función del cese de producción de biogás y del estado de degradación del residuo) disminuyó en 47 días con respecto a la duración de la carga inicial. En el caso del tratamiento V, el grado de digestión del residuo se mantuvo constante en todas las cargas a pesar de que la eficiencia en el volumen de biogás disminuyó.

**Tabla 2.** Resultados de la digestión anaeróbica de cebolla con barro activado vacuno (V) y con barro activado porcino (P) a 35 °C. Se muestran los valores medios de cuatro repeticiones.

Tratamientos	Carga	HRT (días)	pH		Grado de digestión (%)
			inicial	final	
V	1	77	7,8	8	48,1
	2	56	8	8	46,7
	3	30	7,5	7,1	49,1
P	1	77	7,5	8	50,4
	2	56	8	8	50,5
	3	30	8	6,8	38,6

Esto estaría indicando que la degradación del residuo se acelera con las sucesivas cargas sugiriendo una adaptación y selección de los microorganismos responsables de la degradación de la cebolla. Por el contrario, se puede suponer que hay algún efecto negativo sobre la actividad de las AM o que su número no es lo suficientemente alto para consumir los ácidos que se estarían formando a una tasa más elevada, lo que en cualquiera de los casos disminuye la producción de biogás. En el tratamiento P, el efecto negativo estaría afectando, además de las AM, a la comunidad hidrolítica, ya que el porcentaje de degradación del residuo es menor que en las cargas precedentes. Las variaciones en la estructura de la comunidad microbiana de los digestores se determinó mediante DGGE de los fragmentos amplificados por PCR del gen 16S ADNr. En los perfiles de todos los muestreos de ambos tratamientos se observan dos poblaciones claramente polarizadas. Las poblaciones detectadas en el inóculo BV no permanecen en los biorreactores V, ya que solo se observan las bandas presentes en BV en el perfil de la muestra



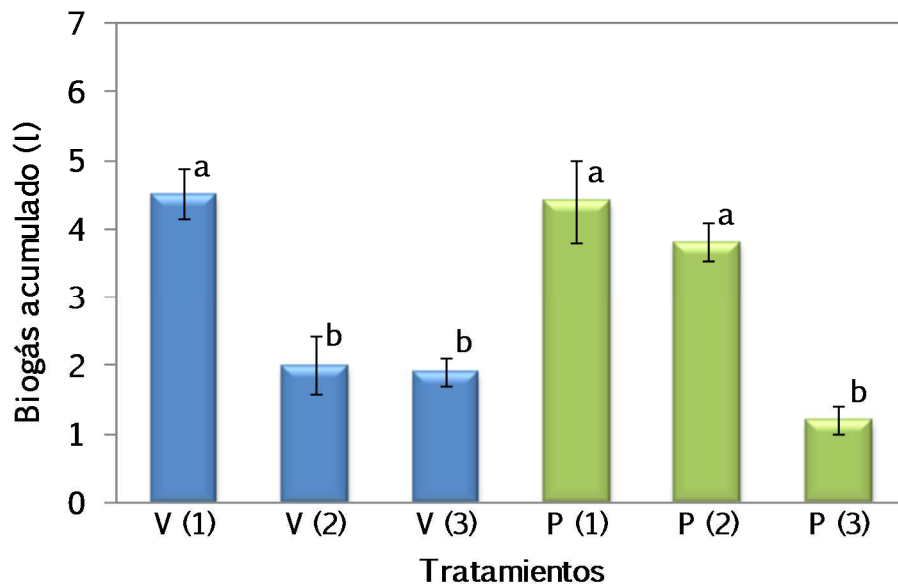
inicial de la primera carga. Como consecuencia de la diferencia en el perfil, BV formó un grupo independiente, asemejándose al resto de las muestras solo en 52,5 %. Por el contrario, algunas de las bandas presentes en BP prevalecen en los reactores inoculados con este barro. Por lo tanto, la comunidad de *Eubacteria* que se establece en los biorreactores provendría del residuo de cebolla. Esto es concordante con lo observado en trabajos previos en los que se detectó que el residuo de cebolla posee bacterias nativas con la capacidad de degradar tanto sus catáfilas internas como externas (Rinland y Gómez 2015; Rinland, 2015).

## Digestión anaeróbica a 18 °C

En todos los parámetros medidos, se observó mayor variabilidad entre las cargas de la digestión a 18 °C que a 35 °C. Inicialmente, el volumen de biogás generado en el tratamiento V fue inferior a la producción a 35 °C, mientras que el volumen alcanzado en P no presentó diferencias entre las dos temperaturas (Fig. 2). No obstante, se detectó gas inflamable en los dos tratamientos. Por lo tanto, se verifica nuevamente que los barros aportan AM y, además, que estas son activas a 18 °C. En ambos tratamientos, no solo disminuyó la producción de biogás a lo largo de las cargas, sino que no se detectó gas inflamable a partir de la segunda carga en V y de la tercera en P. Sin embargo, en todos los reactores se detectó el fragmento del gen *mcrA*, demostrando la presencia de las AM. Cabe recordar que debido al método de detección empleado, la ausencia de gas inflamable no implica necesariamente que no se produjera CH<sub>4</sub>, sino que probablemente la concentración de este compuesto en la mezcla de biogás no fue suficiente (< 45 %) para encender la llama. En ambos tratamientos, los valores de pH de las dos primeras cargas estuvieron dentro de los valores apropiados para la biometanización (Tabla 3). En la última carga, los biorreactores finalizaron con pH ácido, lo que indicaría que el proceso estaba en fase acidogénica. Al igual que lo observado a 35 °C, los efectos beneficiosos de los barros (capacidad tampón y producción de CH<sub>4</sub>) se diluyen con las cargas. Más aún, en la digestión a 18 °C estos efectos son menos perdurables en el tiempo. A pesar de que los dos tratamientos presentaron degradación del residuo, estos valores son inferiores a los logrados en la degradación mesofílica. No obstante, coinciden con los informados por Alvarez y Lidén (2009) para la DA de estiércol vacuno a 18°C.

Los cambios en la estructura de la comunidad microbiana durante la digestión de cebolla con BV y BP fueron monitoreados utilizando la técnica de DGGE. Los perfiles de las comunidades de los reactores a 18 °C son más parecidos entre sí (80,2 %) que los de la digestión mesofílica. Al igual que lo que sucede a 35 °C, las bandas presentes en BV no se observan en los perfiles de los reactores. Así mismo, los perfiles de las comunidades de los reactores a 18 °C son diferentes a los de 35 °C, es decir, que a partir de las mismas mezclas de sustratos se establecieron distintas poblaciones de acuerdo a la temperatura de digestión. Esto concuerda con otros autores que

sugieren que la temperatura tiene un efecto más importante sobre la riqueza y diversidad de las poblaciones microbianas que el sustrato (Ziganshin *et al.*, 2013). Los cambios en los patrones de las comunidades microbianas reflejan la inestabilidad del sistema dentro del biorreactor. Como era previsible, el comportamiento de los biorreactores es diferente a 18 que 35 °C. La DA es menos eficiente a bajas temperaturas, especialmente con BV como inóculo.



**Figura 2.** Volumen total de biogás producido en cada carga de los biorreactores a 18 °C. Los valores corresponden a la media de las repeticiones. En azul se representan las digestiones con barro activado vacuno (V) y en verde con barro activado porcino (P). Los números entre paréntesis corresponden a los distintos ensayos: (1) carga inicial, (2) segunda carga, (3) tercera carga.

**Tabla 3.** Resultados de la digestión anaeróbica de cebolla con barro activado vacuno (V) y con barro activado porcino (P) a 18 °C. Se muestran los valores medios de cuatro repeticiones.

Tratamientos	Carga	HRT (días)	pH inicial	pH final	Grado de digestión (%)
<b>V</b>	1	77	7,8	8	34,7
	2	56	7,3	8	41
	3	30	6,5	5	5,8
<b>P</b>	1	77	7,3	8	36,5
	2	56	7,5	8	49,6
	3	30	7	6	32,2

En conclusión, existe una disminución en la eficiencia de la biometanización con las sucesivas cargas en ambas temperaturas. A partir del residuo de cebolla no se forma un barro estabilizado que posea capacidad tampón y que permita el establecimiento de una comunidad metanogénica activa. Por lo tanto, es necesario incorporar en cada carga barro estabilizado junto con el residuo para degradar. Dada la dinámica de la generación del residuo de cebolla es necesario que la degradación se logre en un período no mayor a 30-60 días. Por lo tanto, instalar un biorreactor en la zona productora de cebolla del sur de la provincia de Buenos Aires demandaría un diseño de digestor en el que se prevea un sistema de calefacción para lograr una temperatura constante de 35 °C.

## **Uso del digerido de la producción de biogás como biofertilizante**

El uso de digeridos como fertilizantes orgánicos permite reaprovechar el agua, nutrientes y la materia orgánica que los conforman y presenta ventajas en comparación con la aplicación de efluentes sin tratar, mejoran la estabilidad microbiana y la higiene, y reducen la emisión de gases de efecto invernadero. Al Seadi (2002) sostiene que la utilización como fertilizante es el único uso sustentable para los digeridos. Su aplicación genera numerosos efectos positivos, siendo una fuente de nutrientes para las plantas y contribuyendo al pool de C del suelo (Odlare *et al.*, 2008 y Svensson *et al.*, 2007) pudiendo reemplazar a los fertilizantes químicos (Odlare *et al.*, 2011). Sin embargo, sus características, su biodegradabilidad y el efecto sobre el sistema suelo-planta no han sido profundamente estudiados.

## **Caracterización del digerido**

La degradación anaeróbica de la materia orgánica para producción de biogás genera un volumen de efluentes aproximadamente igual al que ingresó en el proceso, pero con cambios marcados en sus características.

Durante la degradación anaeróbica los microorganismos degradan la materia orgánica mayormente a CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. En consecuencia, el digerido está compuesto principalmente por un remanente de compuestos orgánicos lábiles no degradados durante la fermentación anaeróbica (Bernal Calderon *et al.*, 2011), la fracción lignocelulósica de los restos orgánicos y la biomasa microbiana (Frioni, 2011). A su vez, durante la degradación anaeróbica el contenido de N, P, K, Mg y otros elementos esenciales no varía (Odlare *et al.*, 2008), sino que son transformados de formas orgánicas a inorgánicas, quedando disponibles para las plantas. Destacándose

principalmente el nitrógeno que presenta entre el 50 y el 80 % como  $\text{NH}_4^+$  (Iocoli *et al.*, 2015c, Makádi *et al.*, 2012 y Kirchman *et al.*, 1992).

Al evaluar su uso como biofertilizante es muy importante comprender que la complejidad de la matriz orgánica de los efluentes hace que la caracterización química no sea suficiente para predecir el efecto que generan sobre el suelo y los cultivos (Iocoli *et al.*, 2015a). La combinación con técnicas espectrométricas como UV-Visible y FTIR permiten caracterizar fácil y rápidamente desde un punto de vista funcional este tipo de efluentes (Iocoli *et al.*, 2015b).

Los digeridos pueden diferir en función del material original, del sistema de tratamiento anaeróbico y formas de proceso. Las diferencias pueden ser diversas; es fundamental el contenido de sólidos, macro y micronutrientes y posibles contaminantes. En nuestro grupo de trabajo se ha evaluado digeridos obtenidos a partir del tratamiento de purín de cerdo (estiércol, orina, restos de alimentos y agua de lavado), cama de pollo (aserrín, restos de alimentos, orina y estiércol), piso de feed lot (resto de alimentos, principalmente paja de cereal, y estiércol), efluente de tambo (estiércol, restos de alimentos, restos de leche y agua de lavado) y estos en codigestión con residuos de cebolla (catáfilas y bulbos fuera de estándar descartados en los galpones de empaque).

El digerido de cama de pollo y de piso de feed lot presenta una fracción lignocelulósica de lenta degradación constituida por aserrín en el primer caso y paja de cereal en el segundo, mientras que en digerido de tambo y de purín de cerdo esta fracción es muy reducida. La codigestión con cebolla generó una disminución de la relación C/N (compuestos orgánicos más lábiles) y el incremento de la relación  $\text{NH}_4^+/\text{N}$  como consecuencia de un mayor grado de degradación. Estas diferencias se marcaron más en el primer grupo debido al gran aporte de carbohidratos solubles a través de la cebolla. En todos los casos evaluados la digestión anaeróbica generó una disminución de la relación C/N y un incremento de la relación  $\text{NH}_4^+/\text{N}$ .

## **Efectos de corto plazo sobre la actividad biológica del suelo**

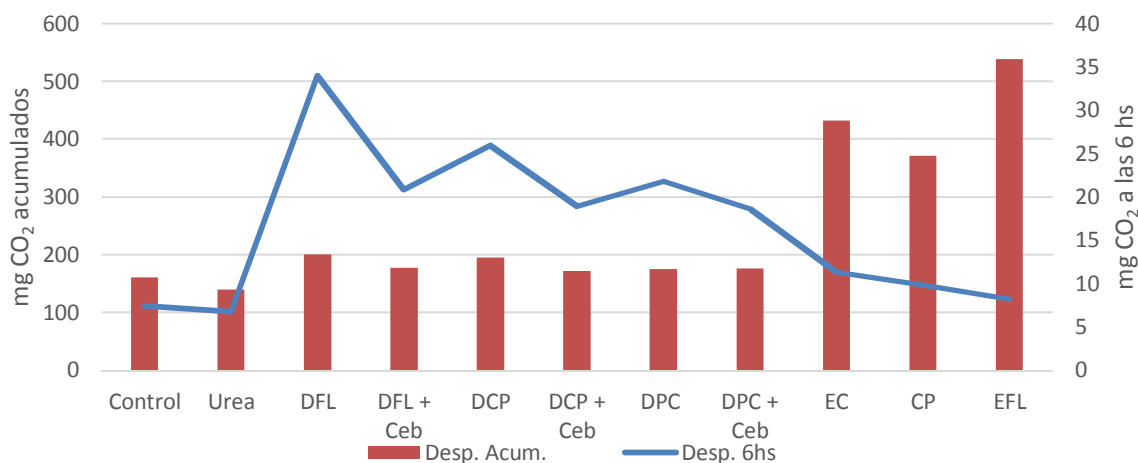
En diferentes ensayos se evaluó la actividad biológica luego de aplicar digerido de cerdo y feed lot en dosis creciente, comparar este con el estiércol sin digerir y un control químico y finalmente comparar tres estiércoles distintos (purín de cerdo, piso de feed lot y cama de pollo) sin tratar, digeridos anaeróbicamente y en codigestión con cebolla. La actividad biológica se evaluó por el desprendimiento de  $\text{CO}_2$  capturado en una solución de hidróxido de sodio y titulación por retorno con HCl (Zibilske, 1994).

En todos los casos, la aplicación de digeridos generó una rápida activación de la microbiota del suelo (desprendimiento de  $\text{CO}_2$  a las 6 h) como consecuencia de la degradación de compuestos orgánicos lábiles (Fig. 3). La aplicación de dosis crecientes produjo una respuesta lineal positiva. Luego de las 48 h la respiración de los digeridos disminuyó acercándose a la respiración basal sugiriendo que la fracción fácilmente degradable fue completamente mineralizada.

Superada la actividad inicial, la dinámica de desprendimiento de CO<sub>2</sub> en el suelo tratado con digeridos fue similar a los suelos tratados con fertilizantes químicos.

Los efluentes crudos presentaron mayor actividad acumulada que el resto de los tratamientos, pudiendo indicar la presencia de períodos de inmovilización de nutrientes, principalmente nitrógeno, mientras que los digeridos presentaron valores cercanos al control (Fig. 3).

Los digeridos generan una marcada activación de la microbiota presente sin modificar la emisión acumulada de CO<sub>2</sub> respecto al control.



**Figura 3.** Desprendimiento de CO<sub>2</sub> de los suelos tratados a las 6 h y el acumulado a las 644 h.

### Mineralización del C y N posaplicación al suelo

Para evaluar la calidad del suelo debe incluirse, como mínimo, la respiración y la capacidad de mineralización de N, ya que representan dos funciones básicas del suelo (Gil Stores *et al.*, 2005). La mineralización del N y la nitrificación reflejan la capacidad de los microorganismos del suelo para transformar el N orgánico a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y este a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Van Beelen *et al.*, 1997).

Para evaluar la mineralización de los digeridos y la dinámica del C y del N durante este proceso se realizó un ensayo bajo condiciones de laboratorio. El mismo consto de dos partes, una en la que se evaluó la dinámica de C a través del desprendimiento de CO<sub>2</sub> con el procedimiento descrito anteriormente y otra donde se evaluó la dinámica del N a través del contenido de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> posaplicación. Los muestreos se realizaron a los 3, 7, 21, 35, 49, 70, 91 y 119 días posaplicación. En el primer caso el muestreo se realizó intercambiando los viales de NaOH y en el segundo fue destructivo tomando tres replicas por tratamiento para cada fecha de muestreo.

Los tratamientos aplicados fueron: efluente de tambo, digerido de efluente de tambo, digerido de cerdo y digerido de la codigestión de cebolla.

## Dinámica del C

Entre las enmiendas utilizadas, los suelos tratados con digeridos anaeróbicos presentaron una dinámica similar entre sí mostrando la mayor tasa de desprendimiento de CO<sub>2</sub> durante los primeros 3 días estabilizándose por debajo del control a partir de los 21 días. El barro de tambo, con un elevado contenido de carbono y la mayor parte del nitrógeno en forma orgánica, presentó la mayor emisión de CO<sub>2</sub>. El efluente de tambo presentó la mayor parte del nitrógeno en forma orgánica y una mayor relación C/N que los digeridos. Alcanzó la máxima actividad a los 3 días y manteniendo valores superiores a los digeridos hasta el día 49. En contraposición, los compost presentaron una dinámica similar al control alcanzando mayores diferencias durante los primeros 7 días. Al evaluar el desprendimiento acumulado, los efluentes presentaron la mayor emisión diferenciándose del control y del resto de los tratamientos; los compost no se diferenciaron del control y los digeridos presentaron valores levemente menores.

## Dinámica del N

Los digeridos presentaron una dinámica similar durante los primeros 70 días, donde comenzaron a diferenciarse. Estas diferencias probablemente se deban a las variaciones en el tipo de compuestos presentes en la fracción más estable de la materia orgánica. Los digeridos aportan gran cantidad de nitrógeno inorgánico al suelo, coincidiendo con lo observado por Albuquerque *et al.* (2012). Se observó un incremento inicial del contenido de nitrato en los suelos tratados con digeridos, y como estos presentan la mayor parte del nitrógeno como amonio y una cantidad muy reducida de nitrato, permitiría sugerir que la incorporación de los digeridos produce el inicio de un rápido proceso de nitrificación. Posteriormente se observan ciclos típicos de inmovilización y mineralización, pero siempre presentando valores superiores al control.

El compost tuvo un comportamiento similar al control hasta el día 70, luego el control permaneció prácticamente constante, mientras que el compost continuó incrementando el contenido de N inorgánico hasta finalizar el ensayo mostrando claras diferencias con el control en los días 91 y 119.

El efluente y el barro de tambo presentaron dinámicas diferentes a los demás tratamientos. El efluente se ubica entre los digeridos y los compost, presentando siempre valores superiores al control. Mientras que el barro permanece por debajo del control durante todo el ensayo, lo cual indicaría que los microorganismos utilizaron nitrógeno del suelo para poder degradarlo.

El mayor aporte de los digeridos corresponde al nitrógeno inorgánico aportado en el material y no a la posterior mineralización de la materia orgánica presente, mientras que en los compost se observa el efecto contrario, donde el mayor aporte es debido a la mineralización de la materia

orgánica. Esta característica justificaría lo observado en otros estudios (Locoli *et al.*, 2015; Grigatti *et al.*, 2011), donde la aplicación de digeridos genera una respuesta en los cultivos similar a la observada con fertilizantes químicos.

## Respuesta vegetal a la aplicación de digeridos

La forma más natural de evaluar el efecto del uso de los digeridos como fertilizantes es evaluando su performance sobre el sistema suelo-planta, ya que la planta es el último integrante del proceso y permite determinar su desarrollo y rendimiento (Odlare *et al.*, 2008).

Para la evaluación del desarrollo vegetal se seleccionó el cultivo de lechuga dado que es un buen cultivo indicador por su rápido desarrollo y sensibilidad a sustancias tóxicas (Montemurro *et al.*, 2010; Rotondo *et al.*, 2009; Aruani *et al.*, 2008; Lopez Mosquera *et al.*, 2003).

Se realizaron varios ensayos con los materiales mencionados en el apartado “Efectos de corto plazo sobre la actividad biológica del suelo” evaluando la respuesta posaplicación al suelo sobre el desarrollo del cultivo de lechuga en invernáculo.

Ningún tratamiento mostró síntomas de fitotoxicidad. La variable más sensible fue el peso fresco de la parte aérea y esta presentó una respuesta lineal al incremento de la dosis de digerido ( $R^2=0,72$ ). El digerido de cerdo no presentó diferencias con la fertilización química. El mayor rendimiento lo alcanzó el purín de cerdo sin tratar, coincidiendo con lo propuesto por Abubaker *et al.* (2012), quienes sostienen que la aplicación de purín de cerdo resulta en un marcado aumento de la capacidad de mineralización del N del suelo, que genera un mayor contenido de N disponible para las plantas durante el ciclo del cultivo y probablemente un aumento del pool de N para el cultivo siguiente.

El área de cobertura foliar es un excelente indicador del peso fresco, por lo que es una importante herramienta para monitorear la dinámica de desarrollo del cultivo en forma no destructiva. Este permite inferir momentos de déficit de nutrientes que podrían estar asociados tanto a una mineralización retardada del residuo como a una inmovilización de nutrientes, principalmente nitrógeno, para su degradación.

En todos los casos la aplicación de los efluentes de la codigestión con cebolla generó mayores rindes que los digeridos de estiércol y a excepción del purín de cerdo, estos presentaron mayores rindes que los estiércoles crudos. Los incrementos de rendimiento posiblemente se deban a la mayor proporción de nitrógeno inorgánico ( $\text{NH}_4/\text{N}$ ) y a la menor relación C/N que podría favorecer la mineralización.

No se observaron diferencias significativas en el contenido de humedad, y en el número de hojas todos los tratamientos se diferenciaron del control, pero no entre sí. Las diferencias entre los tratamientos para el peso seco de raíces fueron de menor magnitud que para la parte aérea

permitiendo suponer que los tratamientos tienen un menor efecto sobre el desarrollo radicular y promocionan principalmente el desarrollo foliar.

Los digeridos anaeróbicos presentan gran variabilidad en su composición y en consecuencia en su efecto sobre los cultivos. En todos los casos los efluentes de la codigestión con cebolla generó un incremento en el rendimiento respecto al resto de los digeridos. Además, y con excepción del purín de cerdo, los digeridos presentaron iguales o mayores rindes de lechuga que los estiércoles crudos. En todos los casos los tratamientos produjeron un mayor rendimiento en relación con el control y el único tratamiento que igualó a la fertilización química fue el purín de cerdo.

## Bibliografía

ABUBAKER, J.; RISBERG, K.; PELL, M. 2012. Effects on wheat growth and soil microbial activities. *Applied Energy* 99: 126-134.

AKUNNA, J.C.; BIZEAU, C.; MOLETTA, R. 1992. Denitrification in anaerobic digesters: Possibilities and influence of wastewater COD/N-NOX ratio. *Environmental Technology* 13 (9):825-836.

AL SEADI, T. 2002. Good practice in quality management of AD residues from biogas production. IEA Bioenergy, Task 24-Energy from Biological Conversion of Organic Waste, enero 2002. Disponible: [http://agrienvarchive.ca/bioenergy/download/manage\\_AD\\_residues\\_denmark.pdf](http://agrienvarchive.ca/bioenergy/download/manage_AD_residues_denmark.pdf) . Visitado 15 de agosto de 2016.

ALBURQUERQUE, J.A.; DE LA FUENTE, C.; BERNAL, M.P. 2012. Chemical properties of anaerobic digestates affecting C and N dynamics in amended soils. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 160: 15-22.

ALVAREZ, R.; LIDÉN, G. 2009. Low temperature anaerobic digestion of mixtures of llama, cow and sheep manure for improved methane production. *Biomass and Bioenergy* 33 (3):527-533.

APHA. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18 ed. American Public Health Association, Washington, DC.

ARUANI, M.C.; GILI, P.; FERNÁNDEZ, L.; GONZÁLEZ JUNYENT, R.; REEB, P.; SÁNCHEZ, E. 2008. Utilización del Nitrógeno en diferentes manejos de fertilización en lechuga (*Lactuca sativa* L.) y su efecto sobre algunas variables biológicas del suelo, Neuquén. Argentina. *AGRO SUR* 36(3): 147-157.

BENÍTEZ, V.; MOLLÁ, E.; MARTÍN-CABREJAS, M.; AGUILERA, Y.; LÓPEZ-ANDRÉU, F.; COOLS, K.; TERRY, L.; ESTEBAN, R. 2011. Characterization of industrial onion wastes (*Allium cepa* L.): Dietary fibre and bioactive compounds. *Plant Foods for Human Nutrition* 66 (1):48-57.

BERNAL CALDERON, M.P.; ALBURQUERQUE MÉNDEZ, J.A.; BUSTAMANTE MUÑOZ, M.A.; CARRILLO, R.C. 2011. Guía de utilización agrícola de los materiales digeridos por biometanización. Probiogas. Fondo Europeo de Desarrollo Regional. España. p. 106.

BERNAL, M.P.; ALBURQUERQUE, J.A.; MORAL, R. 2009. Composting of Animal Manures and Chemical Criteria for Compost Maturity Assessment. A Review. *Bioresource Technology*. 100: 5444-5453.

CHARTRAIN, M.; ZEIKUS, J.G. 1986. Microbial ecophysiology of whey biomethanation: Characterization of bacterial trophic populations and prevalent species in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* 51 (1):188-196.



- CORZO-MARTÍNEZ, M.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M. 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology* 18 (12):609-625.
- FANGUEIRO, D.; CHADWICK, D.; DIXON, L.; BOLB, R. 2007. Quantification of priming and CO<sub>2</sub> emission sources following the application of different slurry particle size fractions to a grassland soil. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 2608-2620.
- FRIONI, L. 2011. *Microbiología: básica, ambiental y agrícola*. 1.<sup>a</sup> ed. Orientación Gráfica Editora. Bs. As. Argentina. p. 778.
- GIL STORES, F.; TRASAR CEPEDA, C.; LEIRÓS, M.C.; SEOANA, S. 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 877-87.
- GRIFFITHS, G.; TRUEMAN, L.; CROWTHER, T.; THOMAS, B.; SMITH, B. 2002. Onions-A global benefit to health. *Phytotherapy Research* 16 (7):603-615.
- GRIGATTI, M.; DI GIROLAMO, G.; CHINCARINI, R.; CIAVATTA, C.; BARBANTI, L. 2011. Potential nitrogen mineralization, plant utilization efficiency and soil CO<sub>2</sub> emissions following the addition of anaerobic digested slurries. *Biomass Bioenergy* 35: 4619-29.
- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, EM. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (8):3233-3241.
- INSAM, H.; WETT, B. 2008. Control of GHG Emission at the Microbial Community Level. *Waste Management*. 28:699-706.
- LOCOLI, G.A.; GÓMEZ, M.A. 2015c. Utilización de digerido anaeróbico de purín de cerdo: actividad biológica del suelo y desarrollo vegetal. *Ciencia del Suelo*. 33(1): 1-9.
- LOCOLI, G.A.; GÓMEZ, M.A.; GALANTINI, J.A.; PIERONI, O.I. 2015a. Análisis de la correlación entre la composición orgánica de efluentes agropecuarios y la actividad biológica del suelo. Libro de resúmenes del II Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental, II Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental, 01 al 04 de diciembre, pág. 304. Producción y Ambiente-Efluentes Líquidos, CABA, Argentina.
- LOCOLI, G.A.; GÓMEZ, M.A.; GALANTINI, J.A.; PIERONI, O.I. 2015b. Caracterización rápida de efluentes orgánicos por espectrometría. Libro de resúmenes del II Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental, II Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental, 04 de diciembre. Pág. 40. Procesos de conservación y degradación de recursos-Cuencas Hídricas, CABA, Argentina.
- JAIME, L.; MARTÍN-CABREJAS, M.A.; MOLLÁ, E.; LÓPEZ-ANDRÉU, F.J.; ESTEBAN, R.M. 2001. Effect of storage on fructan and fructooligosaccharide of onion (*Allium cepa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2):982-988.
- JAIME, L.; MOLLÁ, E.; FERNÁNDEZ, A.; MARTÍN-CABREJAS, M.A.; LÓPEZ-ANDRÉU, F.J.; ESTEBAN, R.M. 2002. Structural carbohydrate differences and potential source of dietary fiber of onion (*Allium cepa* L.) tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (1):122-128.
- JUOTTONEN, H.; GALAND, P.E.; YRJÄLÄ, K. 2006. Detection of methanogenic Archaea in peat: comparison of PCR primers targeting the mcrA gene. *Research in Microbiology* 157 (10):914-921.
- KIRCHMANN, H.; WITTER, E. 1992. Composition of fresh, aerobic and anaerobic farm animal dung. *Bioresource Technology* 40(2):137-142.

- LI, Y.-Y.; LAM, S.; FANG, H.H.P. 1996. Interactions between methanogenic, sulfate-reducing and syntrophic acetogenic bacteria in the anaerobic degradation of benzoate. *Water Research* 30 (7):1555-1562.
- LIEDL, B.E.; BOMBARDIERE, J.; CHATFIELD, J.M. 2006. Fertilizer potential of liquid and solid effluent from thermophilic anaerobic digestion of poultry wastes. *Water Science Technology*. 53:69-79.
- LÓPEZ-MOSQUERA, M.E.; CARBALLO, M.E.; CABALEIRO, F.; CARRAL, E.; LEMA, M.J.; LÓPEZ-FABAL, A.; SAINZ, M.J. 2003. Valorización agronómica de estiércol de pollo deshidratado y granulado en el cultivo de lechuga (tipo trocadero) bajo invernadero. *Actas de Horticultura N.º 39. X Congreso Nacional de Ciencias Hortícolas Pontevedra*.
- MAKÁDI, M.; TOMÓCSIK, A.; OROSZ, V. 2012. Digestate: A New Nutrient Source – Review. En: Kumar, S. InTech (ed.). *Biogas*. pp. 295-310.
- MAZZIOTTI, H.J.M. 2014. Plan de desarrollo del sudoeste bonaerense: política pública en ambientes frágiles. XXIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, II Reunión Nacional “Materia Orgánica y Sustancias Húmicas”, Bahía Blanca.
- MIZUNO, O.; LI, Y.Y.; NOIKE, T. 1998. The behavior of sulfate-reducing bacteria in acidogenic phase of anaerobic digestion. *Water Research* 32 (5):1626-1634.
- MONTEMURRO, F.; FERRI, D.; TITTARELLI, F.; CANALI, S.; VITTI, C. 2010. Anaerobic Digestate and On-Farm Compost Application: Effects on Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Crop Production and Soil Properties. *Compost Science and Utilization*. 18(3): 184-193.
- ODLARE, M.; PELL, M.; STEVENSSON, K. 2008. Changes in soil chemical and microbiological properties during 4 years of application of various organic residues. *Waste Management* 28: 1246-53.
- ODLARE, M.; ARTHURSON, V.; PELL, M.; SVENSSON, K.; NEHRENHEIM, E.; ABUBAKER, J. 2011. Land application of organic waste – Effect on the soil ecosystem. *Applied Energy* 88: 2210-18.
- RINLAND, M.E. 2015. Biodegradación anaeróbica del residuo de la producción de cebolla del Valle Bonaerense del Río Colorado. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
- RINLAND, M.E.; GÓMEZ, M.A. 2015. Isolation and characterization of onion degrading bacteria from onion waste produced in South Buenos Aires province, Argentina. *World Journal of Biotechnology and Microbiology* 31 (3): 487-497.
- RODRÍGUEZ-MJ.; GARZA, G.Y.; AGUILERA, C.A.; MARTÍNEZ, A.S.Y.; SOSA, S.G.J. 2005. Influence of nitrate and sulfate on the anaerobic treatment of pharmaceutical wastewater. *Engineering in Life Sciences* 5 (6):568-573.
- ROSE, P.; WHITEMAN, M.; MOORE, P.K.; ZHU, Y.Z. 2005. Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Natural Product Reports* 22 (3):351-368.
- ROTONDO, R.; FIRPO, I.T.; FERRERAS, L.; TORESANI, S.; FERNÁNDEZ, S.; GÓMEZ, E. 2009. Efecto de la aplicación de enmiendas orgánicas y fertilizante nitrogenado sobre propiedades edáficas y productividad en cultivos hortícolas. *Horticultura Argentina* 28(66): 18-25.
- STUDDERT, G.A. 2014. Materia orgánica y sus fracciones como indicadores de uso sustentable de suelos del sudoeste bonaerense. XXIV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, II Reunión Nacional “Materia Orgánica y Sustancias Húmicas”. Bahía Blanca.
- VAN BEELEN, P.; DOELMAN, P. 1997. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere* 34:455-99.
- VANERO MANERO, M.T. 2011. Manual de Biogás. Minenergía/PNUD/FAO/GEF. Editado por: “Chile: Remoción de Barreras para la Electrificación Rural con Energías Renovables. p. 115.

- WAN, S.; SUN, L.; DOUIEB, Y.; SUN, J.; LUO, W. 2013. Anaerobic digestion of municipal solid waste composed of food waste, wastepaper, and plastic in a single-stage system: Performance and microbial community structure characterization. *Bioresource Technology* 146 (0):619-627.
- ZIBILSKE, L.M. 1994. Carbon Mineralization. En: Weaver, R.W.; Angle, S.; Bottomley, P. (ed.). *Methods of soil analysis, Part 2, Microbiological and Biochemical Properties*. pp. 835-863. Soil Sci Soc of America Inc, Wisconsin, EUA.
- ZIGANSHIN, A.; LIEBETRAU, J.; PRÖTER, J.; KLEINSTEUBER, S. 2013. Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (11):5161-5174.
- ZOHRI, A-N.; ABDEL-GAWAD, K.; SABER, S. 1995. Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion (*Allium cepa* L.) oil. *Microbiological Research* 150 (2):167-172.

## CAPÍTULO 17

### Inmovilización *in situ* de metales en suelos contaminados mediante fitoestabilización

Claudia Santibáñez Varnero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Agronomía, Universidad Mayor. Santiago, Chile.

E-mail: claudia.santibanez@uma.cl

#### Introducción

Por una parte, la contaminación de suelos es un problema que se ha incrementado con el paso del tiempo. Por otra parte, la diversidad de sustancias que se presentan en ellos, aunado a la complejidad de la matriz del suelo, genera que los tratamientos convencionales de remediación resulten muy costosos y poco convenientes para aplicarse en terrenos muy extensos. Por ello, el uso de plantas y de microorganismos asociados a la rizosfera para remediar suelos contaminados ha surgido como una alternativa que atrae alto interés y es bastante más económica. Esta alternativa se conoce como fitorremediación, la cual comprende tecnologías que utilizan diversas especies vegetales para depurar y revegetar sitios contaminados (Robinson *et al.*, 2009). Dentro del término fitorremediación se encuentran incluidas diversas técnicas y aplicaciones. Estas difieren en el proceso mediante el cual las plantas pueden remover o inmovilizar los metales. Por ejemplo, el proceso en el cual las plantas se utilizan para remover metales del suelo y almacenarlos en los tejidos aéreos se denomina fitoextracción. Similarmente, la técnica en la cual se utilizan plantas para remover contaminantes mediante la volatilización se denomina fitovolatilización (Moreno *et al.*, 2005). En la fitoestabilización, los metales pesados y metaloides del suelo son inmovilizados, manteniéndose retenidos dentro de la zona no saturada mediante su acumulación en las raíces o precipitación dentro de la rizosfera, lo cual reduce su riesgo de dispersión hacia el entorno. La relación costo-beneficio de la fitoestabilización es favorable, pero requiere del uso simultáneo de especies vegetales y de acondicionadores de suelos adecuados al sitio y al objetivo general de rehabilitación del área, de forma que la estabilización sea autosustentable en el largo plazo y no genere impactos ambientales secundarios.

#### Fitorremediación de suelos contaminados

En la actualidad existen diferentes procesos biotecnológicos para depurar los suelos contaminados. El principio básico consiste en destruir o modificar los contaminantes con el fin de

disminuir su toxicidad. La fitorremediación podría ser definida como el conjunto de métodos para degradar, asimilar, metabolizar o detoxificar contaminantes por medio de la utilización de plantas que tengan la capacidad fisiológica y bioquímica para absorber, retener, degradar y transformar los contaminantes a formas inocuas o menos tóxicas. Para ello, suelen emplearse diferentes especies, con probada capacidad para depurar suelos contaminados. Hasta ahora, se han identificado diversas especies vegetales con distintos grados de eficiencia en la acumulación o inmovilización de sustancias tóxicas, las cuales han tenido bastante éxito en la remoción de metales pesados y metaloides provenientes de las actividades mineras e industriales. La fitorremediación, además de reducir la toxicidad de los contaminantes del suelo, ofrece ventajas adicionales tales como incrementar la actividad microbiana, lo que aumenta la cantidad de carbono orgánico almacenado en el suelo.

Las plantas presentan diversas estrategias para depurar o reducir la toxicidad de un suelo contaminado; de este modo se identifican cuatro procesos principales: fitoextracción, fitoestabilización, fitovolatilización y fitodegradación. Los principales mecanismos involucrados en cada uno de estos procesos y su aplicabilidad se resumen en el Cuadro 1 y se esquematizan en la Figura 1.

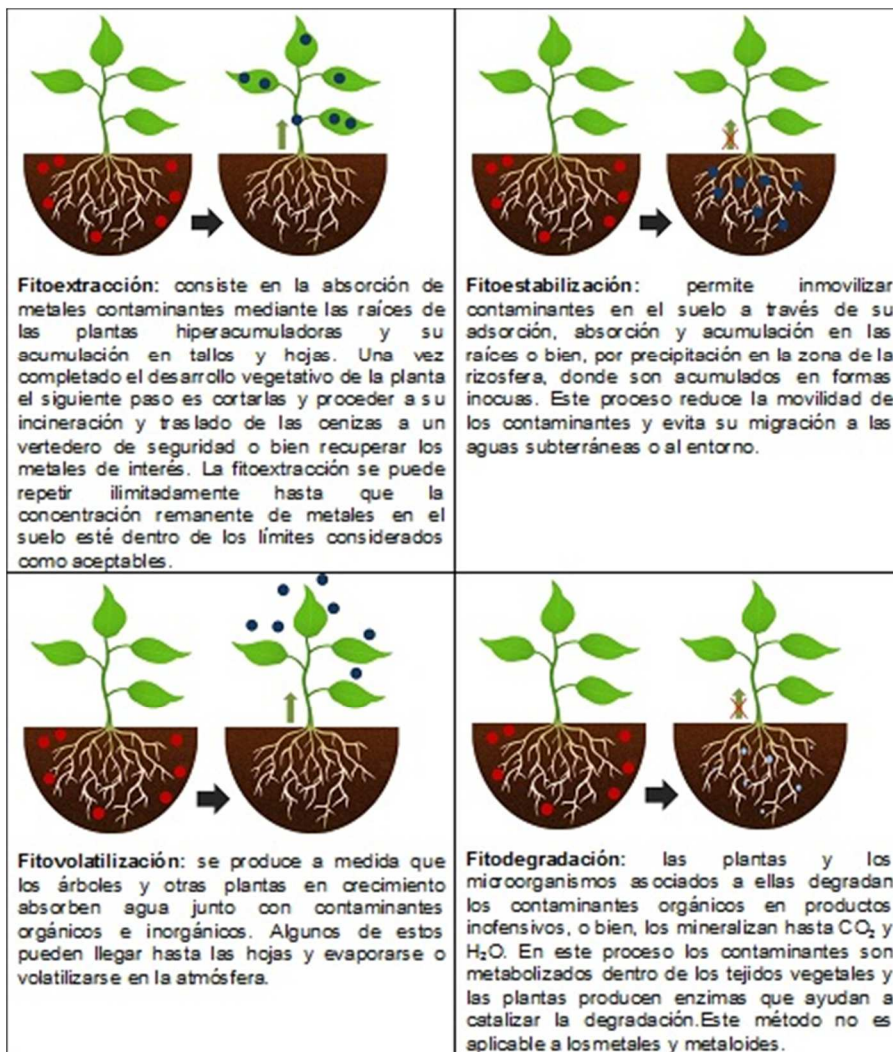


Figura 1. Principales mecanismos de fitorremediación de suelos.

## Principales limitaciones que presenta la fitorremediación

La fitorremediación constituye el método menos destructivo de remediación de suelos contaminados ya que utiliza los organismos naturales y preserva el estado natural del medioambiente (en comparación con el uso de procesos químicos y físico-químicos); sin embargo, presenta ciertas limitaciones en su aplicación, dadas por el sistema radicular y la tasa de crecimiento de las especies vegetales, la concentración del contaminante y los posibles impactos de la vegetación contaminada.

**Sistema radicular:** una de las limitaciones en la aplicabilidad de la fitorremediación es el contacto efectivo de los contaminantes con las raíces. Por ello, esta tecnología se limita a la profundidad alcanzada por las raíces de las especies seleccionadas. El contacto entre las raíces y el suelo contaminado se puede favorecer o mejorar mediante el uso de maquinaria agrícola convencional y prácticas tales como el arado y subsolado.

Tasa de crecimiento: la fitorremediación también se encuentra limitada por la tasa de crecimiento de las plantas. Normalmente para fitorremediar un sitio se requiere un período considerablemente mayor (meses o años) en comparación con lo requerido con las tecnologías convencionales. Por lo tanto, para aquellos sitios que presentan riesgos importantes de toxicidad sobre la salud humana y los ecosistemas, la fitorremediación podría no ser la técnica de remediación más adecuada.

Concentración del contaminante: los sitios que presentan un nivel de contaminación bajo a moderado comprendido dentro de la zona radicular son los mejores candidatos para aplicar un proceso de fitorremediación. Las concentraciones muy altas de contaminantes pueden inhibir el crecimiento de las plantas y por lo tanto, pueden limitar la aplicación de esta tecnología en ciertos sitios. En estos casos se puede aplicar un enfoque escalonado de remediación, en el cual, los sitios con alta concentración de contaminantes se pueden manejar con técnicas *ex situ*, que son más costosas, pero reducen rápidamente el riesgo agudo; mientras que en las zonas más extensas que presentan menores concentraciones de contaminantes, se puede utilizar la fitorremediación *in situ*, durante un período más largo.

Impactos de la vegetación contaminada: cuando la vegetación interactúa con los contaminantes del suelo, puede ocurrir una exposición ecológica de estos, por lo cual el destino de los metales acumulados en la biomasa es de gran importancia. Pese a que algunas formas de fitorremediación implican la acumulación de metales y requieren el posterior manejo y disposición del material vegetal enriquecido con metales, la mayoría de las plantas no acumulan cantidades significativas de contaminantes en las estructuras aéreas, por lo cual no requieren de un tratamiento posterior. En contraste, existen las plantas hiperacumuladoras que son capaces de crecer en suelos con altas concentraciones de metales, las cuales resultan tóxicas incluso para especies cercanamente emparentadas a dichas plantas. Estas plantas extraen el metal del suelo a través de sus raíces y lo concentran hasta niveles extremadamente altos en sus tejidos, por lo cual son investigadas como agentes para la fitoextracción. Estas especies requieren ser cosechadas y posteriormente recicladas o dispuestas en un lugar seguro para evitar el traspaso de los contaminantes a través de la cadena trófica.

**Cuadro 1.** Resumen de los mecanismos de fitorremediación.

Procesos	Mecanismo	Contaminantes
Fitoextracción	Hiperacumulación en la parte aérea de la planta.	Orgánicos e inorgánicos
Fitoestabilización	Complejación, absorción, adsorción y precipitación en la zona radicular.	Orgánicos e inorgánicos
Fitovolatilización	Volatilización a través de las hojas.	Orgánicos e inorgánicos, de bajo peso molecular
Fitodegradación	Uso de plantas y microorganismos asociados para degradar contaminantes	Orgánicos

## Características generales de la fitoestabilización

La fitoestabilización es una de las tecnologías agrupadas bajo el concepto de fitorremediación. En términos generales, se define como el uso simultáneo de plantas y de acondicionadores de suelos para estabilizar *in situ* los contaminantes inorgánicos (metales y metaloides) presentes en el suelo contaminado al dejarlos en formas inocuas para los seres vivos (no biodisponibles). En la fitoestabilización se utilizan plantas tolerantes a los metales (metalófitas) para reducir la movilidad de estos, disminuyendo así el riesgo de dispersión de partículas contaminadas con metales y metaloides mediante erosión eólica, escorrentía o lixiviación hacia las napas subterráneas. Durante la fitoestabilización los metales son precipitados químicamente o son secuestrados mediante mecanismos de complejación y adsorción. La disponibilidad de metales en el suelo se minimiza y la lixiviación de metales en las aguas subterráneas se reduce. Los metales que permanecen en la solución del suelo son inmovilizados mediante reacciones químicas en la superficie de las raíces de las plantas.

De esta forma, los principales objetivos de un programa de fitoestabilización son:

- Inmovilizar o reducir la biodisponibilidad de los metales presentes (estabilización química). Los metales son complejados, precipitados, absorbidos y adsorbidos por las raíces de las plantas, los microorganismos asociados a las raíces de las plantas (rizosfera) y por las sustancias presentes en los acondicionadores de suelo, donde son acumulados o retenidos en formas inocuas, evitando así la toxicidad sobre otros seres vivos.



- Prevenir la dispersión eólica e hídrica del material contaminado hacia las zonas aledañas al disminuir eficientemente el potencial de erosión de las partículas de suelo contaminado (estabilización física).
- Asegurar la autosustentabilidad del sistema vegetal, al restituir la actividad microbiana encargada del ciclado de los nutrientes (estabilización biológica) y al mitigar los factores físicos (ej., compactación y mal drenaje) y nutricionales (ej., ausencia de nutrientes esenciales) limitantes de los suelos contaminados. Esto permite asegurar el adecuado establecimiento y crecimiento de las plantas introducidas, tanto en el corto como en el largo plazo.

## **Importancia de la biodisponibilidad en la fitoestabilización**

La biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo se define como la fracción total de metales que se encuentran en el espacio intersticial de los poros de agua (solución del suelo) y las partículas del suelo que se encuentran disponibles para el organismo receptor. Una definición genérica de biodisponibilidad es el potencial de los organismos vivos para absorber metales mediante ingestión o a partir del medio abiótico, pudiendo llegar a formar parte del metabolismo del organismo (NRC, 2003). De forma más específica, se refiere a la fracción disponible biológicamente que puede ser absorbido por un organismo y que puede reaccionar con su sistema metabólico. La biodisponibilidad requiere que los metales entren en contacto con el organismo (accesibilidad física) y que se encuentren en una forma particular (accesibilidad química) para que puedan entrar al organismo (Miller y Miller, 2007).

Las tecnologías de inmovilización, tales como la fitoestabilización, reducen la biodisponibilidad de los metales mediante la incorporación de acondicionadores de suelos adecuados. Diversos estudios han reportado la efectividad de diferentes acondicionadores orgánicos e inorgánicos de suelos para reducir la biodisponibilidad de metales en suelos (Sun *et al.*, 2016; Beesley *et al.*, 2014; Santibáñez *et al.*, 2008).

Los procesos más importantes involucrados para reducir la movilidad y la biodisponibilidad de los metales son:

- Absorción y secuestro de contaminantes en el sistema radicular.
- Modificación de los factores del suelo que influyen en la especiación e inmovilización de los metales, tales como pH, materia orgánica y potencial redox.
- Exudados radiculares que regulan la precipitación e inmovilización de los metales.
- Establecimiento de una cobertura vegetal que reduzca el contacto físico del suelo contaminado con animales y seres humanos.
- Estabilización mecánica del sitio para reducir la erosión eólica e hídrica.
- Favorecer la evapotranspiración, de forma de minimizar la lixiviación de contaminantes.

## Conceptos involucrados en la fitoestabilización

Para llevar a cabo un proyecto de fitoestabilización es fundamental conocer el funcionamiento del ecosistema, sus componentes e interacción entre ellos, las respuestas a las tensiones generadas por los diferentes factores de estrés y las limitaciones generadas por los diferentes factores limitantes. Otros aspectos claves que deben ser considerados para ejecutar este tipo de proyectos son: el funcionamiento de las especies nativas, su forma de propagación, su tasa de crecimiento, mecanismos que regulan sus tamaños poblacionales, tipos de asociaciones entre especies, así como los requerimientos de nutrientes y de agua. En general, las especies vegetales nativas son escasamente propagadas en los viveros comerciales, por lo que se debe considerar la implementación de viveros para suplir las necesidades específicas de los proyectos.

Los ecosistemas, funcionalmente, están compuestos de organismos productores (plantas), consumidores (fauna) y descomponedores (fauna, hongos, bacterias). A través de dichos organismos fluye y se almacena la energía, y también, circula, se transforma y se almacena la materia. Estos componentes clave del ecosistema almacenan la energía y la materia y sus principales funciones se describen en el Cuadro 2.

Diversos esquemas legislativos establecen que un suelo debe ser remediado cuando la concentración total de uno o más contaminantes excede un valor crítico (ej., metales pesados y metaloides). Tal esquema regulatorio no es aplicable a la fitoestabilización, debido a que en un programa ideal de fitoestabilización, la concentración total de metales pesados y metaloides permanece sin cambiar.

En la actualidad, diversas regulaciones internacionales están empezando a reconocer la influencia de la solubilidad y movilidad de los metales sobre el riesgo ambiental. En consecuencia, al evaluar la calidad del suelo existe una creciente adopción de un enfoque basado en el riesgo. Tales sistemas de evaluación del riesgo se basan en el efecto del contaminante más que en su concentración total en el suelo (Naidu *et al.*, 2008).

Las plantas superiores inmovilizan los metales pesados y metaloides en suelos contaminados para lo cual generan cambios en la rizosfera. La rizosfera corresponde a aquella zona del suelo que es influenciada por las raíces, en la cual los exudados radicales afectan a procesos del suelo y a microorganismos que se encuentran en él.

Funcionalmente, la rizosfera es un microambiente altamente dinámico que se caracteriza por ciclos de retroalimentación de interacciones entre los procesos de las raíces, las características del suelo y la dinámica de las poblaciones microbianas asociadas (Adriano *et al.*, 2004). Las reacciones químicas y biológicas que ocurren en la rizosfera juegan un rol importante en la biodisponibilidad de los metales pesados y metaloides en el suelo. Las características del suelo tales como el pH y potencial redox, estado nutricional, presencia de contaminantes y las propiedades físicas influyen sobre el crecimiento de la vegetación y la dinámica de la población microbiana del suelo. La mayoría de los exudados radiculares son los responsables de muchas de

las características propias de la rizosfera. Las raíces de las plantas modifican las condiciones físicas, químicas y biológicas del suelo en la rizosfera, la cual, en comparación con el resto del suelo, se encuentra enriquecida de sustancias orgánicas de origen vegetal y microbiano, incluyendo ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, lípidos, cumarinas, flavonoides, proteínas, enzimas, carbohidratos e hidrocarburos aromáticos y alifáticos (Hinsinger *et al.*, 2005).

Los ácidos orgánicos en la rizosfera afectan la dinámica de los metales y metaloides en el suelo mediante su efecto de acidificación, quelación, complejación, precipitación, reacciones redox, actividad microbiana, propiedades físicas de la rizosfera y morfología de las raíces.

**Cuadro 2.** Funciones de los componentes clave del ecosistema.

<b>Vegetación</b>	<b>Fauna</b>	<b>Suelo</b>	<b>Microorganismos edáficos</b>
Fotosíntesis (producción de carbohidratos por fijación de CO <sub>2</sub> , producción de O <sub>2</sub> ) y Respiración (producción de CO <sub>2</sub> ).	Respiración, producción de CO <sub>2</sub> , consumo de oxígeno.	Soporte estructural para la vegetación, fauna y microorganismos edáficos.	Mantenimiento de la estructura.
Estabiliza los suelos, reduce las amenazas de la erosión y los deslizamientos que podrían resultar en a la contaminación y en la sedimentación de los cuerpos de agua.	Regulación del ciclo de elementos, tales como C, N <sub>2</sub> , P, K, O <sub>2</sub> , Na, Fe, entre otros.	Almacenamiento de macro y micronutrientes.	Regulación de la hidrología del suelo.
Regulación climática, disminuye la fuerza del viento, regula la temperatura, la entrada de luz al suelo y la humedad.	Transformación de la materia orgánica e inorgánica.	Medio para descomposición de la materia orgánica.	Intercambio de gases con la atmósfera y secuestro de carbono.
Regulación hídrica, regula la velocidad de caída del agua al suelo, regula el proceso de infiltración, entre otras.	Dispersión de semillas y polinización.	Contribuye en la regulación del ciclo hidrológico.	Eliminación o atenuación de compuestos tóxicos.
Hábitat de las especies de fauna: invertebrados, anfibios, réptiles, aves, mamíferos.	Depredación.	Sirve como sitio de almacenamiento de la materia orgánica y secuestro de carbono.	Descomposición de la materia orgánica y ciclaje de nutrientes.
Regulación del ciclo de diferentes elementos: C, P, K, N <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> , entre otros.	Facilitan la descomposición de la materia orgánica.	Degradación, transformación e inmovilización de diversos contaminantes.	Relaciones simbióticas y asimbióticas con las raíces de las plantas.

Se han encontrado diversas plantas que exudan compuestos capaces de inmovilizar los metales utilizando procesos redox o de precipitación de compuestos insolubles en la rizosfera. Por

ejemplo, el Pb se precipita como fosfato, quedando en una forma insoluble y por lo tanto no biodisponible en el suelo (Hafsteinsdóttir *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2015) y el Cd forma complejos con sulfuros (Gong *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2016).

Por su parte, las plantas reducen la movilidad y el transporte de los contaminantes en el suelo mediante absorción o inmovilización en las raíces.

Adicionalmente, el proceso de fitoestabilización se puede mejorar mediante el uso complementario de acondicionadores de suelos que son eficaces para inmovilizar los metales y metaloides. El Cuadro 3 muestra un resumen de diversas referencias seleccionadas sobre diversos procesos de fitoestabilización asistidos.

**Cuadro 3.** Referencias seleccionadas de procesos de fitoestabilización asistidos.

Contaminante	Sustrato	Especie vegetal	Proceso de fitoestabilización asistido	Referencia
Cu	Suelo de mina	<i>Sorghum sudanense</i>	Inoculación con bacterias endófitas	Li <i>et al.</i> , 2016
Cu, Al, Fe, Zn, Cd, Pb	Relave minero	<i>Acacia pycnantha</i> , <i>Eucalyptus camaldurensis</i>	Fitoestabilización natural	Nirola <i>et al.</i> , 2015
As, Cd, Pb	Relave minero ácido (pirítico)	<i>Neriu moleander</i> , <i>Cistus albidus</i> , <i>Pistacia lentiscus</i>	Uso de acondicionadores (purines de cerdo y carbonato de calcio)	Parra <i>et al.</i> , 2016
Cd, Cu, Pb, Zn	Relave minero	<i>Miscanthus sinensis</i> , <i>Pteridium aquilinum</i>	Uso de acondicionadores inorgánicos como agentes inmovilizantes	Lee <i>et al.</i> , 2014
Co, Ca	Relave minero ácido	<i>Buchloe dactyloides</i> , <i>Atriplex lentiformis</i>	Uso de compost	Valentin-Vargas <i>et al.</i> , 2014
Cu, Zn, Mo, Cd	Relaveminero	<i>Lolium perenne</i>	Incorporación de biosólidos	Santibáñez <i>et al.</i> , 2008
Ni	Suelo	<i>Brassica juncea</i> , <i>Luffa cylindrical</i> , <i>Sorghum halepense</i>	Inoculación con bacterias resistentes a Ni ( <i>Bacillus megaterium</i> )	Rajkumar <i>et al.</i> , 2013
Zn, Cd, Pb	Suelo cercano a una fundición de Pb-Zn	<i>Miscanthus sinensis x giganteus</i>	Incorporación de lodo rojo (residuo de bauxita)	Pavel <i>et al.</i> , 2014

## Factores que afectan a la fitoestabilización

### Suelo

Debido a que el establecimiento de la vegetación es fundamental para la fitoestabilización, las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos, que controlan el crecimiento de plantas y la dinámica de los metales son las que van a determinar el éxito de esta tecnología.

A menudo, los sitios contaminados no presentan condiciones adecuadas para el crecimiento de las plantas debido a la toxicidad por metales, escasez de nutrientes y actividad microbiana y propiedades físicas no adecuadas. Por esta razón, la fitoestabilización utiliza diversos acondicionadores de suelos para estimular el crecimiento de las plantas. Algunos de los acondicionadores comunes que se utilizan para mejorar las condiciones del suelo son los residuos agroindustriales y silvoagropecuarios. Algunos de estos acondicionadores se utilizan para mejorar las propiedades del suelo y a la vez mejorar la eficiencia de la fitoestabilización modificando la solubilidad y biodisponibilidad de los contaminantes. Los principales factores del suelo que influyen en la inmovilización y biodisponibilidad de los contaminantes incluyen el pH del suelo, la materia orgánica del suelo, la capacidad de intercambio catiónico y aniónico, la textura (contenido de arcilla) y el tipo de suelo.

El pH del suelo es uno de los parámetros clave que influyen en la adsorción de contaminantes inorgánicos y orgánicos ionizables, debido a que controla prácticamente todos los procesos biogeoquímicos en los suelos. Estos procesos incluyen solubilidad, precipitación, especiación y adsorción, así como la actividad microbiana. La mayoría de los metales y metaloides del suelo se enlazan fuertemente a la materia orgánica en los suelos, lo que reduce su biodisponibilidad. Los grupos funcionales de ácidos orgánicos típicamente presentes en la materia orgánica tienen una alta afinidad para atraer cationes metálicos (Zaccone *et al.*, 2009). La materia orgánica también juega un papel fundamental en la reducción de los metales tales como  $\text{Cr}_6^+$ , disminuyendo así su toxicidad y biodisponibilidad.

Los suelos con alto contenido de arcillas presentan una alta afinidad para adsorber cationes de metales y metaloides debido a la alta capacidad de intercambio catiónico, haciendo que los contaminantes estén menos biodisponibles en relación con los suelos arenosos. Los metales y metaloides también pueden formar complejos y precipitados con los constituyentes inorgánicos del suelo, tales como carbonatos y fosfatos minerales bajo ciertas condiciones del suelo (Bolan *et al.*, 2003a).

### **Especies vegetales**

Las plantas son fundamentales para la fitoestabilización debido a que las características de las plantas regulan tanto la transformación de los metales y metaloides y el enlace a las partículas del suelo. La vegetación actúa como un sumidero de contaminantes mediante absorción o asimilación de estos, reduciendo la cantidad de contaminantes disponibles para transporte hacia las aguas subterráneas. La cobertura vegetal también juega un rol fundamental en la estabilización reduciendo el flujo de agua a través del perfil del suelo y la estabilización mecánica del suelo mediante el crecimiento de las raíces. Esto reduce significativamente la dispersión de contaminantes del suelo.

El potencial de erosión del suelo se incrementa significativamente cuando este se encuentra desprovisto o presenta una escasa cobertura vegetal. La cobertura vegetal protege al suelo de la erosión eólica e hídrica, reduce la escorrentía y por lo tanto favorece la infiltración.

Los principales efectos de la vegetación sobre la erosión hídrica y eólica incluyen la intercepción del impacto directo de las gotas de lluvia y del viento; la disminución de la velocidad de escorrentía del agua sobre el suelo; la mejora de la estructura, agregación y porosidad del suelo inducida por las raíces; y la mejora de la actividad biológica del suelo y su influencia benéfica sobre las propiedades físicas de este.

Las especies vegetales adecuadas para ser usadas en la tecnología de fitoestabilización deben ser seleccionadas de acuerdo a los siguientes criterios básicos:

- Las restricciones químicas sitio-específicas de los suelos contaminados. Es particularmente importante la capacidad de tolerancia de las plantas seleccionadas a los altos contenidos de metales presentes en el suelo.
- Las restricciones climáticas del lugar de emplazamiento del suelo contaminado. La elección inadecuada de las especies vegetales a las restricciones climáticas del lugar podría determinar costos mucho mayores debido a los altos requerimientos de mantención tanto en el corto como en el largo plazo (ej. riego). Por ello, se favorecen las especies nativas y endémicas disponibles localmente por sobre las exóticas.
- El uso posterior o alternativa de rehabilitación elegida entre las posibles para el sitio. Por ejemplo, la recuperación de una formación vegetal similar a la natural presente en el área (rehabilitación ecológica), la creación de un parque de esparcimiento o la plantación de un bosque de explotación, entre otras.

Las especies vegetales se deben seleccionar en función de sus características fenotípicas y genotípicas, que deben cumplir con los requisitos de la fitoestabilización. La densidad, morfología y profundidad de penetración en el suelo de las raíces son críticas para la aplicación potencial de esta tecnología. Por ello, la mejora de la biomasa y morfología radicular es deseable en cualquier programa de fitoestabilización. Las plantas con raíces densas y profundas que pueden explorar mayores volúmenes de suelos contaminados tienen un área superficial mucho mayor, facilitando así la estabilización de los contaminantes en el suelo. Las estrategias para aumentar la biomasa radicular y para mejorar las asociaciones raíz/rizosfera, incluyendo el uso de micorrizas, ha sido evaluado por diversos autores (Cunningham *et al.*, 1997; Entry *et al.*, 1996; Morgan *et al.*, 2005). En este sentido, la ingeniería genética puede proporcionar herramientas útiles para modificar la morfología de las raíces y para identificar y clonar enzimas relevantes que controlan los genes para obtener plantas con raíces más profundas. Las plantas adecuadas para la fitoestabilización, además de desarrollar un sistema radicular extenso, deben mantener una restringida translocación de metales y metaloides desde las raíces a la parte aérea (Rizzi *et al.*, 2004).



Además, tienen que adaptarse a las diversas condiciones locales, establecerse fácilmente y requerir poco dinero y esfuerzo para su mantención. Por una parte, deben ser capaces de sobrevivir y reproducirse en el suelo contaminado (metalófitas). Por otra parte, es importante identificar plantas que sean capaces de excluir selectivamente los metales y metaloides (excluyentes). Las plantas metalófitas excluyentes no solo son capaces de sobrevivir en suelos altamente contaminados, sino también absorben bajos niveles de metales y metaloides, incluso en presencia de altas concentraciones de estos en los suelos.

En particular, las especies de malezas a menudo poseen propiedades resistentes al estrés en comparación con los cultivos tradicionales y pueden desarrollarse bajo condiciones hídricas y nutricionales adversas.

La tolerancia a metales y metaloides en las plantas puede definirse como el resultado de un proceso evolutivo que confiere a distintas especies de plantas la capacidad de crecer y desarrollarse en ambientes con concentraciones elevadas de elementos potencialmente tóxicos. Los cambios evolutivos que han dado origen a la tolerancia se deben al desarrollo de una serie de mecanismos eficientes y específicos (procesos adaptativos) que permiten mantener la absorción de elementos esenciales dentro de intervalos fisiológicos permisibles, además de proporcionar la capacidad de inactivar metabólicamente los elementos potencialmente tóxicos cuando representan un riesgo para la integridad celular (González–Mendoza y Zapata–Pérez, 2008).

La presencia de tolerancia ha permitido que las plantas desarrollen tres estrategias básicas para establecerse en suelos con niveles tóxicos de metales: (1) exclusión: esta estrategia consiste en una limitada acumulación de metales en las partes aéreas de las plantas e involucra una acumulación preferente en el sistema radical; (2) indicadoras: esta estrategia se caracteriza porque las plantas acumulan metales en sus tejidos que generalmente reflejan los niveles de metales presentes en el suelo; y (3) hiperacumulación: esta estrategia se caracteriza por la capacidad de la planta de bioacumular altas concentraciones de metales en sus tejidos, principalmente en las partes aéreas (Baker y Walker, 1990; Vogel–Mikus *et al.*, 2006).

Los posibles mecanismos de tolerancia a metales se dividen principalmente en: (1) mecanismos externos de tolerancia dados por funciones de hongos micorrizógenos; y (2) mecanismos internos de tolerancia: (a) enlace a la pared celular y exudados radicales, (b) quelación de los metales por diversos ligandos en el citosol (fitoquelatinas, metalotioneinas y aminoácidos), (c) presencia de proteínas de estrés térmico, y (d) acumulación en la vacuola.

### **Mecanismos externos de tolerancia a metales**

En las plantas el proceso de adsorción de metales puede estar influido por la presencia de microorganismos que están íntimamente asociados con la raíz. Dentro de estos microorganismos, los hongos micorrícicos constituyen uno de los componentes más importantes de la rizosfera, ya que forman asociaciones mutualistas con diversas especies de plantas. De estos tipos, solo dos

se encuentran ampliamente distribuidos: las micorrizas arbusculares y las ectomicorrizas. Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) colonizan alrededor del 80 % de las plantas terrestres y se relacionan principalmente con la provisión de fósforo (Smith y Read, 1997). Si bien tienen una distribución muy amplia, las micorrizas arbusculares son características de suelos donde el fósforo es el principal nutriente limitante del crecimiento de las plantas. Las ectomicorrizas, en cambio, se relacionan principalmente con la adquisición de nitrógeno a partir de residuos orgánicos y colonizan solo alrededor del 3 % de las especies de plantas. En el caso de HMA los mecanismos que se pueden presentar son: (1) inmovilización extracelular de los metales y metaloides por los ácidos orgánicos; (2) precipitación intracelular del metal, lo cual reduce la transferencia de iones desde las raíces a la parte aérea; y (3) adsorción de los cationes metálicos en la pared celular de diferentes estructuras del hongo (Tullio *et al.*, 2003; González-Chávez *et al.*, 2004). En el caso de los HEM, los principales mecanismos son: (1) retención del metal en el apoplasto, evitando su entrada a la raíz; (2) reducción de la movilidad de los metales y metaloides en el apoplasto como resultado de la hidrofobicidad del hongo; (3) secreción de sustancias quelantes producidas por el HEM (ej. ácidos orgánicos); y (4) retención de los metales y metaloides en el micelio externo del hongo (Jentschke y Godbold, 2000; Adriaensen *et al.*, 2004).

### **Mecanismos internos de tolerancia a metales**

Por una parte, los exudados radicales están formados principalmente por ácidos orgánicos de bajo peso molecular, cuya importancia en la tolerancia a metales en el sistema radical se debe a que estos pueden influir en la solubilidad de metales de manera directa mediante acidificación, quelación, precipitación y procesos de óxido-reducción en la rizosfera. Por otra parte, de forma indirecta pueden influir en la solubilidad de metales a través de efectos en la actividad microbiana, en las propiedades físicas de la rizosfera y en la dinámica de crecimiento de la raíz.

La producción de ácidos orgánicos en las plantas posiblemente se genera cuando el metal entra en contacto con el ápice de la raíz, activando el flujo de ácidos orgánicos, lo cual permite su ingreso a la célula por diferentes rutas (Ryan y Dehlaize, 2001). Independientemente de los pasos que siga el metal, se produce una inducción del metabolismo de ácidos orgánicos y se lleva a cabo la protonización de los compuestos orgánicos, los cuales son enviados al citosol en donde forman complejos con los cationes metálicos. Además, el pH citosólico se mantiene estable mediante la función coordinada de los transportadores de ácidos orgánicos y los canales de potasio (Ryan y Dehlaize, 2001). Otro mecanismo interno de tolerancia a metales viene dado por los componentes de la pared celular. El arreglo estructural de la celulosa y la lignina, que son los principales componentes de la pared celular de las plantas, les permite formar enlaces covalentes a través de sus átomos de oxígeno con los metales, secuestrándolos en el apoplasto (Carrier *et al.*, 2003).

## Modificación de la rizosfera

Los cambios en las propiedades bioquímicas del suelo inducidos en la rizosfera regulan la transformación, movilidad y biodisponibilidad de los metales y metaloides, por lo tanto afectan la fitoestabilización de los sitios contaminados. Las principales propiedades bioquímicas inducidas por la actividad de la rizosfera que influyen sobre la dinámica de los metales y metaloides en el suelo son la acidificación, liberación de ácidos orgánicos e incremento de la actividad microbiana (Santibáñez y Ginocchio, 2010).

Por una parte, uno de los principales factores que influyen sobre los flujos de  $\text{OH}^-/\text{H}^+$  que afectan el pH en la rizosfera se encuentran relacionados con la absorción diferenciada de cationes y aniones por parte de las raíces (Tang y Rengel, 2003). Por ejemplo, las plantas que absorben  $\text{NH}_4^+$  compensarán el exceso de cargas positivas mediante la liberación de cantidades equivalentes de  $\text{H}^+$ , consecuentemente disminuyendo el pH en la rizosfera. Adicionalmente, las transformaciones de nitrógeno en el suelo se han sugerido como las principales causas de la acidificación del suelo (Bolan y Hedley, 2003).

Por otra parte, en la rizosfera la acidificación afectará a la solubilidad y a la especiación de los metales y metaloides de diversas maneras, incluyendo: (a) la modificación de la carga superficial en suelos con carga variable; (b) la alteración de la especiación de los metales y metaloides; y (c) influencia sobre las reacciones redox de los metales y metaloides.

La adsorción de metales disminuye casi invariablemente con el aumento de la acidez del suelo (Yang *et al.*, 2006). Se han propuesto 3 posibles razones para explicar este fenómeno: (1) en los suelos de carga variable, una disminución en el pH provoca una disminución en la carga negativa superficial, resultando en una menor adsorción de cationes; (2) una disminución en el pH del suelo es probable que disminuya la cantidad de especies de hidróxidos metálicos ( $\text{MOHn}^+$ ) que se adsorben preferentemente sobre el catión del metal; y (3) la acidificación provoca la disolución de los compuestos asociados a los metales y metaloides, lo que resulta en un aumento de su concentración en la solución del suelo.

Además, en la rizosfera, las raíces de las plantas liberan compuestos de carbono y nutrientes. Estos compuestos, que en su mayoría consisten en carbohidratos, ácidos carboxílicos y aminoácidos, son los responsables de favorecer el crecimiento microbiano (Aira *et al.*, 2010). El papel de los distintos compuestos de los exudados radiculares ha sido estudiado por su potencial impacto en la biogeoquímica de los metales y metaloides mediante reacciones de complejación y redox.

En la rizosfera, algunos microorganismos procariontes (bacterias, arqueas) y ciertos microorganismos eucariontes (algas, hongos) excretan sustancias poliméricas extracelulares, tales como polisacáridos, glicoproteína, lipopolisacárido, péptidos solubles, entre otros. Estas sustancias poseen una cantidad importante de grupos funcionales de aniones que pueden absorber iones metálicos.

## Contaminantes

Las reacciones que sufren los contaminantes afectan su biodisponibilidad y movilidad, por lo tanto, influyen en la fitoestabilización. Los metales introducidos a los suelos están sujetos a diversas reacciones que incluyen adsorción, complejación, precipitación y reducción, que controlan su lixiviación, las pérdidas por escorrentía y su biodisponibilidad. Las interacciones químicas que contribuyen a la retención de los metales por los coloides del suelo incluyen la sorción y la formación de complejos con ligandos inorgánicos y orgánicos. Los iones cargados son atraídos a las superficies cargadas del suelo mediante enlaces covalentes electrostáticos y más fuertes que pueden ser específicos o no específicos en naturaleza (Bolan *et al.*, 1999).

En la adsorción no específica, los balances de carga de los iones sobre la superficie del suelo son por atracción electrostática, en tanto que en la adsorción específica se forman enlaces químicos entre los iones y la superficie del suelo (Spark, 1986). La mayoría de los cationes metálicos están fuertemente retenidos como complejos con las superficies cargadas mediante la formación de enlaces covalentes. Los metales pueden reaccionar con la materia orgánica del suelo por intercambio iónico, complejación y precipitación. Los metales son conocidos por formar complejos orgánicos los que afectan a su sorción en las partículas del suelo (Adriano, 2001). Por ejemplo, Bolan *et al.* (2003b) demostraron que la adición de estiércol aumentó la complejación de Cu en los suelos. Por una parte, observaron que la adsorción de  $\text{Cu}_2^+$ , medida como el cambio en la concentración total de Cu en la solución del suelo, no se vio afectada por la adición de biosólidos. Por otra parte, la complejación de Cu, medida como el cambio en la concentración de  $\text{Cu}_2^+$  libre, aumentó con el incremento en el nivel de biosólidos. Sin embargo, el grado de formación de complejos órgano-metálicos varía con diversos factores incluyendo temperatura, factores estéricos y concentración. Todas estas interacciones son controladas por el pH y la fuerza iónica de la solución, la naturaleza de las especies de metales, el catión dominante y la presencia de ligandos inorgánicos y orgánicos en la solución del suelo. Cuando se presentan valores de pH del suelo altos y en presencia de  $\text{S}_4\text{O}_2^-$ ,  $\text{C}_3\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^-$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , la precipitación parece ser el proceso predominante cuando las concentraciones de cationes metálicos son altas (Naidu *et al.*, 1996). Esto ocurre cuando el producto iónico en la solución excede el producto de solubilidad de esa fase. En suelos normales, la precipitación es relativamente poco relevante, pero en suelos contaminados con metales pesados, el proceso de precipitación puede jugar un papel importante en la remediación, especialmente bajo condiciones alcalinas.

Cada vez con mayor frecuencia se está utilizando la adición de fosfato para precipitar los niveles excesivos de metales tales como Zn y Pb. Sin embargo, el fosfato puede movilizar As si se encuentra presente en el suelo (He *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2011).

## Factores ambientales

Las precipitaciones y la temperatura afectan la fitoestabilización a través de sus efectos sobre el crecimiento de las plantas, las reacciones de los contaminantes y la erosión del suelo.

Debido a que la mayoría de los sitios contaminados no presentan un fácil acceso a suministros regulares de agua para el riego, la lluvia juega un papel fundamental para el establecimiento de la vegetación. Las precipitaciones también controlan la lixiviación de los contaminantes y la erosión de los suelos y sedimentos. La temperatura afecta tanto a las características de crecimiento de la planta como de la superficie del suelo, tales como formación de grietas y costras.

La fitoestabilización requiere que las plantas toleren los metales y metaloides presentes en el sustrato. Las especies o variedades también deben tolerar cualquier desequilibrio de nutrientes en el sustrato. Cada sitio contaminado constituye un ambiente único. Por lo tanto, la elección de las especies más adecuadas requiere de ensayos de pequeña escala para evaluar diversas variedades, en particular para sustratos que no son suelos tales como residuos mineros.

## Uso de acondicionadores de suelos

Los acondicionadores de suelos son recursos de gran relevancia para corregir y mejorar limitantes en las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de un determinado suelo o sustrato, y así permitir el establecimiento y el desarrollo de una cobertura vegetal permanente y autosustentable. De esta forma, su uso es indispensable para llevar a cabo con éxito un programa de fitoestabilización de suelos contaminados con metales pesados o metaloides.

Los acondicionadores de suelos consisten en diversos materiales orgánicos e inorgánicos, los cuales pueden utilizarse solos o en distintas mezclas y proporciones, dependiendo de sus potencialidades, de las propiedades del suelo o sustrato que se quiere mejorar y del tipo de vegetación que se desea establecer. Los suelos contaminados generalmente presentan condiciones adversas para el establecimiento de una adecuada cobertura vegetal. Estos factores limitantes deben ser corregidos simultáneamente a través de la aplicación de los acondicionadores de suelos que permitan cumplir con los siguientes requerimientos (Santibáñez *et al.*, 2011):

- Mejorar las propiedades físicas de los suelos contaminados, tales como aireación, infiltración, retención de humedad y estabilidad de los agregados, entre otros.
- Mejorar las propiedades químicas del suelo tales como fertilidad, pH y capacidad de intercambio catiónico (CIC), entre otros.
- Reducir la biodisponibilidad de los metales y metaloides, mediante mecanismos de complejación, adsorción y precipitación.
- Ser de bajo costo, fáciles de manejar y aplicar en terreno.

- Encontrarse disponibles localmente, en cantidades suficientes o bien ser fáciles de producir.
- Ser compatibles con las especies vegetales seleccionadas para el programa de fitoestabilización.
- No deben provocar impactos ambientales secundarios en el sitio donde se van a aplicar (ej. lixiviación de nitratos, generación de olores molestos, entre otros).

Para la elección adecuada de los acondicionadores de suelo en un programa de fitoestabilización, se debe considerar que se corrijan simultáneamente los factores limitantes de los suelos contaminados (físicos, químicos y microbiológicos), de forma de lograr el establecimiento de coberturas vegetales funcionales y autosustentables en el largo plazo. Por ejemplo, el uso de cal y fertilizantes químicos en programas de forestación de relaves mineros en Chile ha permitido neutralizar relaves ácidos y mejorar la fertilidad de estos en el corto plazo. Sin embargo, han mostrado ser insuficientes para sustentar el crecimiento de las plantas introducidas en el largo plazo debido a que no mejoran las características físicas de los relaves, no reducen la fitotoxicidad por metales biodisponibles y no restituyen la actividad microbiana indispensable para la degradación y reciclaje de la hojarasca y la biomasa vegetal muerta aportada por las plantas establecidas sobre el depósito de relaves (Santibáñez *et al.*, 2011).

Por una parte, los acondicionadores de sustrato son benéficos para reducir las vías de exposición al disminuir la fitotoxicidad. Por otra parte, permiten el restablecimiento de formaciones vegetales funcionales y autosustentables al restaurar la actividad microbiana del suelo, balancear el pH, incorporar materia orgánica (MO), aumentar la retención de agua y reducir la compactación, entre otros beneficios. Estos sistemas rehabilitados permiten reducir la erosión del suelo contaminado por el viento y la lluvia.

Para un uso adecuado de los acondicionadores se debe realizar una caracterización apropiada de ellos y del suelo o sustrato en el que serán aplicados.

Las dosis apropiadas de aplicación dependen de las limitaciones específicas que deben ser abordadas y de las características propias de los acondicionadores que serán utilizados. Sin embargo, existen distintas aproximaciones para determinar la dosis de aplicación más adecuada para los acondicionadores. Una aproximación es tomar como referencia un suelo local, saludable, y usar sus parámetros fisicoquímicos como objetivos-meta. Por ejemplo, se puede usar el contenido de materia orgánica del suelo local como referencia para el sitio bajo manejo. Si se sigue esta aproximación, es importante tener presente que una alta fracción de la MO aplicada se descompondrá en dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y agua en un período relativamente corto (durante el primer año de aplicación). Por ello, si el suelo natural posee un 2 % de MO, entonces se sugiere duplicar la adición a un 4 % como una forma de compensar la descomposición inicial rápida. Por una parte, la velocidad de descomposición depende, sin embargo, del tipo de MO aplicada. Específicamente, depende de la proporción C:N y del tipo de compuesto que debe ser degradado.

Por ejemplo, un alto contenido de carbono como lignina o lignocelulosa (ej., residuos leñosos) determina una descomposición muy lenta, mientras que un alto contenido de fuentes carbonadas como azúcares y almidones determina una degradación muy rápida (ej., desechos de pulpas de frutas). Por otra parte, si se incorpora una dosis de materia orgánica muy superior a la de los suelos aledaños, es probable que el sistema presente problemas de invasión de malezas y especies oportunistas, en desmedro de las especies nativas y endémicas. Otra dificultad que podría presentarse al aplicar dosis elevadas del acondicionador orgánico es la lixiviación de contaminantes hacia las aguas subterráneas tales como: nitratos, metales pesados, etc. Es por ello que las tasas de aplicación de acondicionador orgánico deben determinarse mediante pruebas preliminares a pequeña escala, tal como muestra la Figura 2.



**Figura 2.** Uso de acondicionadores de suelos para reducir la toxicidad de los suelos.

## **Acondicionadores orgánicos**

Los acondicionadores orgánicos son materiales de origen vegetal y animal resultantes de la descomposición microbiana de la materia orgánica. Los acondicionadores orgánicos son de gran importancia para la fitoestabilización porque elevan el potencial productivo al actuar como mejoradores de las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de los suelos. Además, constituyen una fuente de diversos nutrientes esenciales para las plantas. Los acondicionadores orgánicos también contribuyen a incrementar el desarrollo radicular de las plantas mejorando el sostén de estas y aportan hormonas que influyen positivamente sobre los mecanismos fisiológicos de las especies vegetales.

Biosólidos: los biosólidos son residuos orgánicos sólidos o semisólidos que resultan del tratamiento de las aguas residuales domésticas. Por su alto valor nutricional pueden ser usados para la fitoestabilización debido a que promueven el crecimiento de las plantas. Su costo es normalmente cero, pero involucra el transporte al sitio de aplicación. Las características de los biosólidos pueden variar bastante entre una planta de tratamiento y otra, pero son bastante homogéneos para una misma planta. Además del beneficio de aportar nutrientes y materia orgánica, los biosólidos a menudo poseen importantes propiedades de neutralización y de adsorbentes (quelantes). Sin embargo, su uso debe ser cuidadoso, debido a la carga excesiva de nutrientes al ser aplicados en altas dosis (lixiviación de N) y a que los olores pueden causar ocasionalmente mala aceptación pública. El contenido de N en los biosólidos es generalmente de lenta liberación, por lo que se vuelve disponible para la vegetación lentamente en un plazo de varios años. Diversos estudios han mostrado que los biosólidos son efectivos para mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas de suelos y residuos mineros, favoreciendo la producción de biomasa vegetal (Santibáñez *et al.*, 2008; Asensio *et al.*, 2013).

Biochar: el biochar o biocarbón consiste de materia orgánica carbonizada que ha sufrido una descomposición térmica controlada a temperatura relativamente baja y en ausencia limitada de oxígeno (Lehmann y Joseph, 2009). El uso de biochar como acondicionador de suelos contaminados con metales pesados ha mostrado una alta eficacia, al reducir la movilidad de metales en el suelo. El biochar tiene el potencial de modificar las condiciones del suelo que impiden el establecimiento y crecimiento vegetal mediante la neutralización de la acidez (Kookana *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2013), adsorción o precipitación de los componentes tóxicos (Beesley y Marmiroli, 2011; Beesley *et al.*, 2011) y mejoramiento de la estructura del suelo y la capacidad de retención hídrica (Denyes *et al.*, 2013, Herath *et al.*, 2013; Jien y Wang, 2013; Laird *et al.*, 2010).

Guano: el contenido de nutrientes del guano animal es extremadamente variable debido principalmente a los siguientes factores: tipo, categoría y raza animal, dieta suministrada, suplementos usados en la dieta, tipo de cama utilizada (cuando se usa material de cama) y manejo y condiciones de almacenamiento de los residuos. El material puede utilizarse fresco o maduro. Sin embargo, un guano maduro contiene nitrógeno en una forma más estable y por lo tanto presenta menos pérdidas de este nutriente por volatilización o lixiviación que el guano fresco. Los distintos tipos de guano presentan contenidos variables de humedad (15-95 %). En términos de conductividad eléctrica, esta puede ser muy elevada en el caso del guano de cabra, alcanzando valores de hasta 19 dS m<sup>-1</sup>.

Compost: el compost es un material orgánico estable generado a partir de la descomposición aeróbica de residuos orgánicos, tales como podas agrícolas, residuos de la industria alimentaria o



subproductos animales. En términos generales, el compost se caracteriza presentar menor humedad que los materiales originales y no posee olores molestos. El compostaje se usa a menudo para reducir la carga de microorganismos patógenos, ya que durante el proceso de compostaje se alcanzan temperaturas lo suficientemente elevadas como para eliminar estos microorganismos. La disponibilidad de compost y su composición varían ampliamente, pero, en general, el compost es generado en volúmenes menores que los guanos y los biosólidos, ya que el proceso de compostaje es costoso y toma tiempo. El compost generalmente presenta contenidos menores de N que los biosólidos o los guanos, sin embargo se encuentran en formas estables y de lenta liberación, lo cual es deseable en programas de fitoestabilización a largo plazo.

## **Acondicionadores inorgánicos**

Los acondicionadores inorgánicos no contienen materia orgánica y por lo tanto no contribuyen a aumentar la fertilidad nutricional y biológica de los suelos, con excepción de los fertilizantes químicos. Estos materiales generalmente se incorporan a los suelos para mejorar las propiedades físicas, como por ejemplo la granulometría o la textura, la tasa de infiltración, el grado de compactación, la porosidad y la estructura, entre otros. En algunos casos también son usados para controlar algunos factores químicos inadecuados del sustrato, tal como la acidez excesiva o la biodisponibilidad excesiva de metales.

Muchos acondicionadores tienen importantes efectos positivos en la escorrentía superficial y en la calidad de las aguas de lavado, además de mitigar las condiciones adversas de acidez para el crecimiento de la vegetación. Adicionalmente, el uso de acondicionadores inorgánicos que constituyen desechos industriales tiene como beneficio el reciclaje y la mejor gestión integral de desechos, con todos los beneficios sociales y ambientales asociados.

Cenizas volantes: las cenizas volantes se generan en grandes cantidades a partir de los procesos de combustión de las plantas termoeléctricas. Las cenizas volantes constituyen un 80 % de las cenizas totales producidas en una planta termoeléctrica, y al ser la fracción más ligera, son arrastradas por los gases de combustión hacia arriba en la chimenea y se recogen mediante procesos mecánicos, precipitadores electrostáticos y los filtros de tela. En las últimas décadas, su utilización como mejorador de suelos ha recibido una creciente relevancia. Las principales características que las hacen atractivas como mejorador de suelos son su tamaño de partículas (limo), baja densidad aparente, alta capacidad de retención de agua, pH favorable y presencia significativa de nutrientes para las plantas. Sin embargo, en algunos casos, dependiendo de las características y naturaleza de las cenizas volantes, la liberación de ciertos elementos traza y sales solubles al suelo podría constituir una limitación. Se han llevado a cabo diversos estudios para evaluar mezclas de cenizas volantes con distintos materiales orgánicos e inorgánicos, tales como cal, yeso, barro rojo, estiércol, guano de ave, biosólidos, compost, vemicompost, biochar,

bioinoculantes, entre otros. Estas mezclas han mostrado diversos beneficios como: mayor disponibilidad de nutrientes, disminución de la biodisponibilidad de metales tóxicos, amortiguación del pH, adición de materia orgánica, estimulación de la actividad microbiana y mejoras en la salud general del suelo (Ram y Masto, 2014).

Lodo rojo: El lodo rojo se produce en grandes cantidades durante la extracción de alúmina a partir de bauxita. Lombi *et al.* (2002a) señalan que el lodo rojo es efectivo para reducir la disponibilidad de metales en el suelo, observándose un cambio desde la fracción intercambiable a la fracción de óxido de Fe y una disminución de la capacidad de extracción ácida de metales. El mecanismo de acción propuesto por estos autores fue el aumento del pH del suelo. Los resultados obtenidos por estos autores sugieren que la quimisorción específica, y posiblemente, la difusión de los metales hacia el interior de las partículas oxídicas, podrían ser los mecanismos responsables de la fijación de metales por lodo rojo.

En otro estudio, Lombi *et al.* (2002b) pusieron de manifiesto efectos biológicos positivos tras la adición de lodo rojo en suelos contaminados con metales pesados. La adición de lodo rojo redujo la fitotoxicidad de los metales pesados, mejorando el crecimiento de las plantas y disminuyendo la concentración de metales pesados en estas. El lodo rojo también incrementó significativamente la biomasa microbiana del suelo.

La efectividad del lodo rojo para la fijación de metales *in situ* en suelos contaminados ha sido contrastada por Lombi *et al.* (2003) en un estudio que evaluó el efecto del pH y la reacidificación en la movilidad de metales inmovilizados mediante la incorporación de diversos acondicionadores orgánicos. En suelos contaminados con metales pesados a los cuales se les incorporó lodo rojo la movilidad de metales fue siempre menor que para los suelos sin lodo rojo, incluso en presencia de reacidificación del suelo.

Cal: el incremento del pH de los suelos mediante la adición de distintos compuestos como carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) o caliza molida, óxido de calcio ( $\text{CaO}$ ) o cal viva, hidróxido de calcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) o cal hidratada o apagada, se ha utilizado en numerosos casos para inducir una inmovilización de metales y una reducción de su biodisponibilidad, al afectar a los procesos involucrados en el intercambio de iones y en el incremento de superficies complejantes de los suelos contaminados (Hooda y Alloway, 1996). La aplicabilidad de estos materiales depende a la realización del análisis de contenido de  $\text{CaCO}_3$  equivalente (CCE), contenido de humedad y tamaño de partícula. La neutralización es comúnmente usada para revertir la fitotoxicidad de metales, pero la neutralización excesiva puede generar problemas de deficiencia de nutrientes esenciales, tales como fósforo y manganeso, dependiendo de sus contenidos en el suelo.

Fertilizantes sintéticos: los fertilizantes sintéticos proporcionan una manera muy conveniente para mejorar el estado nutricional de los suelos. Presentan las ventajas que son fáciles de obtener y

manipular, requieren menos espacio para almacenarlos y transportarlos que otros tipos de acondicionadores orgánicos y son relativamente económicos. Los fertilizantes son componentes esenciales en las etapas iniciales de un programa de fitoestabilización. Sin embargo, el efecto de estos productos es solo temporal y no se mantiene en el largo plazo, además no contribuyen a mejorar las propiedades físicas de los suelos. Por lo tanto, es recomendable utilizar estos productos junto con algún acondicionador orgánico, de manera de mejorar la capacidad de retención y ciclado de nutrientes. Siempre es preferible realizar diversas aplicaciones pequeñas, en vez de una masiva. Debe tenerse en cuenta que si además se incorpora un acondicionador orgánico, las cantidades de fertilizante deben reducirse en función del contenido nutricional del acondicionador.

## **Conclusiones**

La fitoestabilización es una tecnología considerablemente menos costosa que otras tecnologías de remediación tales como excavación y remoción del suelo contaminado. La fitoestabilización requiere que el sitio sea evaluado y se escojan los acondicionadores de suelo y especies vegetales más adecuados. Existe un importante potencial para generar ingresos a partir de la vegetación utilizada en la fitoestabilización. Estos sitios se pueden manejar de forma que produzcan productos de valor a partir de la biomasa generada. Estos pueden ser productos no comestibles como la madera, bioenergía, biochar o la producción de aceites esenciales o fitoquímicos. Además, se puede utilizar para generar un ecosistema de flora y fauna autóctona, aumentando así el valor ecológico del sitio.

La adecuada elección de las especies vegetales es fundamental para llevar a cabo un programa de fitoestabilización exitoso. La historia está llena de ejemplos desastrosos en los cuales se han introducido especies vegetales, las cuales se dispersan rápidamente generando importantes daños sobre los ecosistemas nativos. Por ello, se deben privilegiar las especies nativas por sobre las especies exóticas, pese a que estas últimas pueden ser aceptables bajo ciertas condiciones que deben ser evaluadas cuidadosamente.

## **Bibliografía**

ADRIAENSEN, K.; VAN DER LELIE, D.; VAN LAERE, A.; VANGRONVELD, J.; COLPAERT, J.V. 2004. A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress. *New Phytologist* 161:549-555.

ADRIANO, D.C. 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments; Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals. 2<sup>nd</sup> ed., Springer, Nueva York.

- ADRIANO D.C.; WENZEL, W.W.; VANGRONSVELD, J.; BOLAN, N.S. 2004. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* 122:121-142.
- AIRA, M.; GÓMEZ-BRANDÓN, M.; LAZCANO, C.; DOMÍNGUEZ, J. 2010. Plant genotype strongly modifies the structure and growth of maize rhizosphere microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 42:2276-2281.
- ASENSIO, V.; VEGA, F.A.; ANDRADE, M.L.; COVELO, E.F. 2013. Tree vegetation and waste amendments to improve the physical condition of copper mine soils. *Chemosphere* 90:603-610.
- BAKER, A.J.M.; WALKER, P.L. 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. En: Shaw, A.J. (ed.). *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 155-177.
- BEESLEY, L.; INNEH, O.; NORTON, G.; MORENO-JIMENEZ, E.; PARDO, T.; CLEMENTE, R.; DAWSON, J. 2014. Assessing the influence of compost and biochar amendments on the mobility and toxicity of metals and arsenic in a naturally contaminated mine soil. *Environ. Pollut.* 186:195-202.
- BEESLEY, L.; MARMIROLI, M. 2011. The immobilization and retention of soluble arsenic, cadmium and zinc by biochar. *Environ. Pollut.* 159:474-480.
- BEESLEY, L.; MORENO-JIMENEZ, E.; GOMEZ-EYLES, J.L.; HARRIS, E.; ROBINSON, B.; SIZMUR, T. 2011. A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils. *Environ. Pollut.* 159:3269-3282.
- BOLAN, N.S.; NAIDU, R.; SYERS, J.K.; TILLMAN, R.W. 1999. Surface charge and solute interactions in soils. *Adv. Agron.* 67:88-141.
- BOLAN, N.S.; HEDLEY, M.J. 2003a. The role of carbon, nitrogen and sulphur in soil acidification. En: Rengel, Z. (ed.). *Hand Book of Soil Acidification*. Marcel and Dekker Inc., Nueva York. pp. 29-56.
- BOLAN, N.S.; ADRIANO, D.C.; MANI, S.; KHAN, A.R. 2003b. Adsorption, complexation and phytoavailability of copper as influenced by organic manure. *Environ. Toxicol. Chem.* 22:450-456.
- CUNNINGHAM, S.D.; SHANN, J.R.; CROWLEY, D.E.; ANDERSON, T.A. 1997. Phytoremediation of contaminated water and soil. En: Kruger, E.L.; Anderson, T.A.; Coats, J.R. (ed.). *Phytoremediation of Soil Water Contaminants*. American Chemical Society, Washington, DC. pp. 2-17.
- DENYES, M.J.; RUTTER, A.; ZEEB, B.A. 2013. In situ application of activated carbon and biochar to PCB-contaminated soil and the effects of mixing regime. *Environ. Pollut.* 182:201-208.
- ENTRY, J.A.; VANCE, N.A.; HAMILTON, M.A.; ZABOWSKY, D.; WATRUD, L.S.; ADRIANO, D.C. 1996. Phytoremediation of soil contaminated with low concentrations of radionuclides. *Water Air Soil Pollut.* 88:167-176.
- GONG, Y.; TANG, J.; ZHAO, D. 2015. Application of Iron Sulfide Particles for Groundwater and Soil Remediation: A Review. *Water Research*. (en prensa).
- GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M.C.; CARRILLO-GONZÁLEZ, R.; WRIGHT, S.F.; NICHOLS, K.A. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi in sequestering potentially toxic elements. *Environ. Pollut.* 130:317-323.
- GONZÁLEZ-MENDOZA, D.; ZAPATA-PÉREZ, O. 2008. Mecanismos de tolerancia a elementos potencialmente tóxicos en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 82: 53-61.
- HAFSTEINSDÓTTIR, E.G.; CAMENZULI, D.; ROCAVERT, A.L.; WALWORTH, J.; GORE, D.B. 2015. Chemical immobilization of metals and metalloids by phosphates. *Appl. Geochem.* 59:47-62.
- HE, Z.L.; YANG, X.E.; STOFFELLA, P.J. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19, 125-140.

- HERATH, H.M.S.K.; CAMPS-ARBESTAIN, M.; HEDLEY, M. 2013. Effect of biochar on soil physical properties in two contrasting soils: an Alfisol and an Andisol. *Geoderma* 209-210:188-197.
- HINSINGER, P.; GOBRAN, G.R.; GREGORY, P.J.; WENZEL, W.W. 2005. Rhizosphere geometry and heterogeneity arising from root-mediated physical and chemical processes. *New Phytol.* 168:293-303.
- HOODA, P.; ALLOWAY, B.J. 1996. The effect of liming on heavy metal concentrations in wheat, carrots and spinach grown on previously sludge amended soils. *J. Agric. Sci. Cambr.* 127:289-294.
- JENTSCHKE, G.; GODBOLD, D.L. 2000. Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiologia Plantarum* 109:107-116.
- JIEN, S.H.; WANG, C.S. 2013. Effects of biochar on soil properties and erosion potential in a highly weathered soil. *Catena* 110:225-233.
- JOHNSON, A.W.; GUTIÉRREZ, M.; GOUZIE, D.; MCALILEY, L.R. 2016. State of remediation and metal toxicity in the Tri-State Mining District, USA. *Chemosphere.* 144:1132-1141.
- KOOKANA, R.S.; SARMAH, A.K.; VAN ZWIETEN, L.; KRULL, E.; SINGH, B. 2011. Biochar application to soil: agronomic and environmental benefits and unintended consequences. *Adv. Agron.* 112:103-143.
- LAIRD, D.A.; FLEMING, P.; DAVIS, D.D.; HORTON, R.; WANG, B.; KARLEN, D.L. 2010. Impact of biochar amendments on the quality of a typical Midwestern agricultural soil. *Geoderma* 158:443-449.
- LEE, S.; JI, W.; LEE, W.; KOO, N.; KOH, H.; KIM, M.; PARK, J. 2014. Influence of amendments and aided phytostabilization on metal availability and mobility in Pb/Zn mine tailings. *J. Environ. Manag.* 139:15-21.
- LEHMANN, J.; JOSEPH, S. 2009. Biochar for environmental management: an introduction. En: Lehmann, J.; Joseph, S. (ed.). *Biochar for Environmental Management.* Earthscan, Londres, Reino Unido, pp. 1-12.
- LI, Y.; WANG, Q.; WANG, L.; HE, L.; SHENG, X. 2016. Increased growth and root Cu accumulation of *Sorghum sudanense* by endophytic *Enterobacter* sp. K3-2: Implications for *Sorghum sudanense* biomass production and phytostabilization. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 124:163-168.
- LOMBI, E.; ZHAO, F.J.; ZHANG, G.; SUN, B.; FITZ, W.; ZHANG, H.; MCGRATH, S.P.; 2002a. In situ fixation of metals in soils using bauxite residue: chemical assessment. *Environ. Pollut.* 118:435-443.
- LOMBI, E.; ZHAO, F.J.; WIESHAMMER, G.; ZHANG, G.; MCGRATH, S.P. 2002b. In situ fixation of metals in soils using bauxite residue: biological effects. *Environ. Pollut.* 118:445-452.
- LOMBI, E.; HAMON, R.E.; MCGRATH, S.P.; MCLAUGHLIN, M.J. 2003. Liability of Cd, Cu, and Zn in polluted soils treated with lime, beringite, and red mud and identification of a non-labile colloidal fraction of metals using isotopic techniques. *Environ. Sci. Tech.* 37:979-984.
- MILLER, J.R.; MILLER, S.M.O. 2007. *Contaminated Rivers.* Springer, Dordrecht.
- MORENO, F.N.; ANDERSON, C.; STEWART, R.B.; ROBINSON, B.H. 2005. Mercury volatilisation and phytoextraction from base-metal mine tailings. *Environ. Pollut.* 136:341-352.
- MORGAN, J.A.W.; BENDING, G.D.; WHITE, P.J. 2005. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56:1729-1739.
- NAIDU, R.; KOOKANA, R.S.; SUMNER, M.E.; HARTER, R.D.; TILLER, K.G. 1996. Cadmium adsorption and transport in variable charge soils: A review. *J. Environ. Qual.* 26:602-617.
- NAIDU, R.; POLLARD, S.J.T.; BOLAN, N.S.; OWENS, G.; PRUSZINSKI, A.W. 2008. Bioavailability: The underlying basis for risk based land management. En "Chemical Bioavailability in Terrestrial Environment" (R. Naidu, Ed.), pp. 53-72. Elsevier, Amsterdam.

- NIROLA, R.; MALLAVARAPU, R.; PALANISAMI, T.; ARYAL, R.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R. 2015. Evaluation of metal uptake factors of native-trees colonizing an abandoned copper mine; a quest for phytostabilization. *J. Sustain. Min.* 16:1-9.
- NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2003. *Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments*. Academy Press, Washington.
- PARRA, A.; ZORNOZA, R.; CONESA, E.; GÓMEZ-LÓPEZ, M.D.; FAZ, A. 2016. Evaluation of the suitability of three Mediterranean shrub species for phytostabilization of pyritic mine soils. *Catena* 136:59-65.
- PARK, J.H.; BOLAN, N.S.; MALLAVARAPU, M.; NAIDU, R. 2011b. Comparative value of phosphate sources on the immobilization of lead, and leaching of lead and phosphorus in lead contaminated soils. *Sci. Total Environ.* 409:853-860.
- PAVEL, P.; PUSCHENREITER, M.; WENZEL, W.; DIACU, E.; BARBU, C. 2014. Aided phytostabilization using *Miscanthus sinensis x giganteus* on heavy metal-contaminated soils. *Sci. Total Environ.* 479-480:125-131.
- RAJKUMAR, M.; MA, Y.; FREITAS, H. 2013. Improvement of Ni phytostabilization by inoculation of Ni resistant *Bacillus megaterium* SR28C. *J Environ. Manag.* 128:973-980.
- RAM, L.C.; MASTO, R.E. 2014. Fly ash for soil amelioration: A review on the influence of ash blending with inorganic and organic amendments. *Earth-Science Rev.* 128:52-74.
- RIZZI, L.; PETRUZZELLI, G.; POGGIO, G.; GUIDI, G. 2004. Soil physical changes and plant availability of Zn and Pb in a treatability test of phytostabilization. *Chemosphere* 57:1039-1046.
- ROBINSON, B.H.; BAÑUELOS, G.; CONESA, H.M.; EVANGELOU, M.W.H.; SCHULIN, R. 2009. The phytomanagement of trace elements in soil. *Cr. Rev. Plant Sci.* 28: 240-266.
- RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; JONES, D.L. 2001. Function and mechanism of organic acid exudation from roots. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:527-560.
- SANTIBÁÑEZ, C.; VERDUGO, C.; GINOCCHIO, R. 2008. Phytostabilization of copper mine tailings with biosolids: Implications for metal uptake and productivity of *Lolium perenne*. *Science of The Total Environment* 395:1-10.
- SANTIBÁÑEZ, C.; GINOCCHIO, R. 2010. Rehabilitation of post-operative mine tailings under semiarid climate conditions: importance of soil microbial activity. *Proceedings Contribution in extenso. ISCO 2010.* pp 362-367.
- SANTIBÁÑEZ, C.; GINOCCHIO, R.; BROWN, S. 2011. Guía 2: Aplicación sustentable de acondicionadores a relaves. En: *Fitoestabilización de depósitos de relaves en Chile*. Centro de Investigación Minera y Metalúrgica (CIMM) e Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA).
- SMITH, S.E.; READ, D.J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Second edition. Academic Press, San Diego.
- SPARK, D.L. 1986. *Soil Physical Chemistry*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- SU, X.; QINGLING, J.Z.; ZUO, J.; LIU, Y.; HU, H. 2015. Immobilization of lead in anthropogenic contaminated soils using phosphates with/without oxalic acid. *J. Environ. Sci.* 28:64-73.
- SUN, Y.; SUN, G.; XU, Y.; LIU, W.; LIANG, X.; WANG, L. 2016. Evaluation of the effectiveness of sepiolite, bentonite, and phosphate amendments on the stabilization remediation of cadmium-contaminated soils. *Journal of Environmental Management.* 166: 204-210.
- TANG, C.; RENGEL, Z. 2003. Role of plant cation/anion uptake ratio in soil acidification. En: Rengel, Z. (ed.). *Handbook of Soil Acidity*. Marcel Dekker, Nueva York. pp. 57-81
- TANG, J.; ZHU, W.; KOOKANA, R.; KATAYAMA, A. 2013. Characteristics of biochar and its application in the remediation of contaminated soil. *J. Biosci. Bioeng.* 116:653-659.

- TULLIO, M.; PIERANDREI, F.; SALERMO, A.; REA, E. 2003. Tolerance to cadmium of vesicular arbuscular mycorrhizae spores isolated from a cadmium-polluted and unpolluted soil. *Biology and Fertility of Soils* 37:211-214.
- VALENTÍN-VARGAS, A.; ROOT, R.; NEILSON, J.; CHOROVER, J.; MAIER, R. 2014. Environmental factors influencing the structural dynamics of soil microbial communities during assisted phytostabilization of acid-generating mine tailings: A mesocosm experiment. *Sci. Total Environ.* 500-501:314-324.
- VOGEL-MIKUS, K.; PONGRAC, P.; KUMP, P.; NECEMER, M.; REGVAR, M. 2006. Colonisation of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. *Environ. Pollut.* 139:362-371.
- YANG, J.Y.; YANG, X.E.; HE, Z.L.; LI, T.Q.; SHENTU, J.L.; STOFFELLA, P.J. 2006. Effects of pH, organic acids, and inorganic ions on lead desorption from soils. *Environ. Pollut.* 143:9-15.
- ZACCONE, C.; SOLER-ROVIRA, P.; PLAZA, C.; COCOZZA, C.; MIANO, T.M. 2009. Variability in As, Ca, Cr, K, Mn, Sr, and Ti concentrations among humic acids isolated from peat using NaOH, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> and NaOH + Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> solutions. *J. Hazard. Mater.* 167:987-994.

## CAPÍTULO 18

### Impacto del cadmio sobre la acumulación y la producción de granos en cultivos de maní

Eliana Bianucci<sup>1,3</sup>, Ana Furlan<sup>1</sup>, María del Carmen Tordable<sup>1</sup>, Adriana Fabra<sup>1</sup>, Luis Hernández<sup>2</sup>, Ramón Carpena-Ruiz<sup>3</sup>, Stella Castro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36 km 601. 5800-Río Cuarto, Córdoba, Argentina. <sup>2</sup>Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid. Campus de Cantoblanco, 28049-Madrid, España. <sup>3</sup>Departamento de Química Agrícola. Universidad Autónoma de Madrid. Campus de Cantoblanco, 28049-Madrid, España.

E-mail: elianabianucci@yahoo.com.ar

#### Introducción

El maní es uno de los cultivos más importantes del mundo, y Argentina ocupa el primer y segundo lugar entre los exportadores mundiales de aceite y granos de maní, respectivamente. La contaminación de los cultivos por el incremento de las actividades antropogénicas constituye un serio riesgo ambiental que a largo plazo impactaría negativamente en su producción, pudiendo también ocasionar severos daños a la población humana. Los fertilizantes orgánicos e inorgánicos a base de fósforo (P) contienen como elemento traza al metal pesado cadmio (Cd), por lo que, aplicados inadecuadamente pueden incrementar la concentración de este metal en el suelo. Así, leguminosas como el maní, soja, entre otras, pueden absorber este elemento directamente del sustrato lo cual genera una alteración del crecimiento, de la nodulación y la subsecuente contaminación del fruto. En este capítulo se detallan los aspectos más relevantes del impacto del Cd sobre la interacción simbiótica maní-rizobio, el cultivo y productividad del maní, dilucidando además, la importancia de la tolerancia al metal de las cepas utilizadas como inoculantes.

#### El cadmio como contaminante en la naturaleza

Los metales pesados se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. La mayoría se presenta como cationes asociados a diversos ligandos orgánicos e inorgánicos (Carpena *et al.*, 2006). Sin embargo, las actividades antropogénicas desarrolladas en la agricultura (abono con residuos urbanos, aguas residuales, residuos ganaderos, aplicación de fertilizantes fosfatados, entre otros) y en las industrias, constituyen las fuentes principales de aporte de estos elementos al medio (Zhu *et al.*, 1999; Mann *et al.*, 2002). La clasificación de los metales ha sido discutida a lo largo del tiempo, pero en términos generales se los caracteriza por sus propiedades físicas



(capacidad de conducir el calor y resistencia eléctrica). Actualmente, se consideran metales pesados a aquellos elementos de transición de la tabla periódica con densidad superior a  $5 \text{ g cm}^{-3}$  (Duffus, 2002). Metales como el Fe, Co, Mn, Mb y Zn resultan fundamentales para la vida (Lane y Morel, 2000) ya que forman parte de biomoléculas esenciales. No obstante, altas concentraciones pueden ser perjudiciales y generar efectos adversos en las células. Otros metales pesados (Hg, Pb, Cd, entre otros) son muy tóxicos a bajas concentraciones y su acumulación a lo largo del tiempo y en las cadenas tróficas genera serios problemas sanitarios. Uno de los metales pesados más perjudiciales para la naturaleza y que ha cobrado interés en los últimos años es el Cd (Ibekwe *et al.*, 1995).

## Aspectos químicos del metal pesado cadmio

El Cd es un metal blando, maleable, de color blanco grisáceo y pertenece, junto con el Zn y el Hg, al grupo IIb de la tabla periódica. Este metal raramente se halla en estado puro, su estado de oxidación es +2, generalmente forma complejos con distintos elementos como por ejemplo el azufre y el cloro, además de complejos orgánicos. En la corteza terrestre, se encuentra en cantidades muy bajas ( $< 1 \text{ mg Kg}^{-1}$ ; Roberts, 1996) y su concentración en un suelo no contaminado, según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 1999), debe mantenerse en niveles inferiores a  $1 \text{ mg Kg}^{-1}$ . No obstante, habitualmente su concentración en los suelos es inferior a los  $3 \text{ mg Kg}^{-1}$ . En 1993, la legislación argentina determinó por decreto reglamentario 831 de la Ley Nacional de residuos 24051 los niveles guía o valores permitidos de Cd en los suelos. Mediante esta ley se reglamentó que el contenido del metal en los suelos agrícolas, de uso residencial y de uso industrial no debiera sobrepasar los 3, 5 y  $20 \text{ mg Kg}^{-1}$ , respectivamente. Sin embargo, estas concentraciones de Cd en los suelos podrían incrementar debido a las condiciones ambientales o a las malas prácticas de las actividades humanas (minería, uso de fertilizantes, pesticidas, entre otros).

El Cd generado por erupciones volcánicas y actividades antropogénicas es removido de la atmósfera por deposición de partículas o por precipitación y finalmente puede ser transportado a ríos y océanos. De igual forma, los efluentes industriales con Cd llegan a los ríos donde es absorbido por la materia particulada (Salazar y Reyes, 2000). Así, los ríos contaminados con este elemento pueden a su vez contaminar los suelos aledaños a través de la irrigación de cultivos o por deposición de sedimentos. Este metal puede combinarse con otros elementos formando cloruros, óxidos y sulfuros, los cuales se unen fuertemente a las partículas del suelo permaneciendo en él por muchos años. De esta manera, el Cd constituye un metal altamente perjudicial ya que es considerado más nocivo que la mayoría de los metales pesados y además, no puede ser química o biológicamente degradado ni transformado en un compuesto menos tóxico (Morrow, 1990; UNEP, 2010). Un dato de relevancia es que se estima que la vida media del Cd es de aproximadamente 15 a 30 años (Henson y Chedrese, 2004; Maruthi *et al.*, 2005).

Este metal es considerado por la Agencia para la Investigación del Cáncer como un elemento carcinogénico humano de clase 1 (IARC, 1993), aunque es débilmente genotóxico (Beyersmann *et al.*, 2008). Como todos los metales pesados, el Cd puede acumularse en los organismos, transferirse de un nivel trófico al siguiente y multiplicar su concentración a lo largo de las cadenas tróficas (De Acevedo, 2003). Esto posiblemente, no solo ocasionaría problemas en la salud, sino también importantes pérdidas económicas para aquellos países que, como Argentina, exportan gran parte de su producción agrícola.

## **Los fertilizantes fosfatados como fuente de cadmio en el suelo**

El P biodisponible constituye uno de los elementos, después del nitrógeno (N), más requerido por las plantas (Alexander, 1980). Su baja disponibilidad, debido a la precipitación del P soluble con iones Ca, Fe o Al (Rodríguez y Fraga, 1999), y la relativa inmovilidad del ion en el suelo hacen de este elemento un factor limitante del crecimiento vegetal (Bhat y Nye, 1974; Rendig y Taylor, 1989; Abd-Alla, 1994). La carencia de P en suelos de uso agrícola constituye un problema a nivel mundial (UNEP, 2008). Particularmente, en la provincia de Córdoba, estudios realizados en los suelos maniseros de la zona de General Cabrera demostraron un déficit de este elemento (Bonadeo *et al.*, 1997,1998; Severina, 2006). Así, en los suelos cultivables de la zona de Marcos Juárez, se encontró una disminución de la fertilidad por la carencia de P (Bosch y Da Veiga, 2002). En consecuencia, la utilización de fertilizantes fosfatados resulta una práctica común para la incorporación de este nutriente en suelos.

Los fertilizantes fosfatados están formulados sobre todos los elementos químicos de la tabla periódica (Besoain *et al.*, 1999). La materia prima proviene de la roca fosfórica, y la concentración de Cd que estos poseen depende del tipo de roca de la cual se obtiene el fertilizante. Existen dos tipos de roca fosfórica, ígnea y sedimentaria, las cuales poseen notables diferencias en cuanto a sus características mineralógicas, texturales y químicas. Sin embargo, es la roca sedimentaria la que mayor contenido de metales pesados presenta ( $15 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) (Steen, 1998) y la más utilizada para la formulación de fertilizantes a base de P. Los fertilizantes más comercializados en el mundo son los superfosfatos (simples y triples) y el fosfato mono y diamónico (Arias Jiménez, 2001). López-Camelo *et al.* (1997) analizaron la concentración de Cd en los fertilizantes fosfatados más utilizados en cultivos de gramíneas y leguminosas en Argentina. Estos investigadores encontraron que la aplicación de fertilizantes fosfatados inorgánicos produce un incremento en la concentración no solo de Cd, sino también de Cr, Cu, Zn, Ni y Pb, promoviendo la contaminación de los suelos. Martí *et al.* (2002) analizaron el contenido de Cd en distintos fertilizantes utilizados en la provincia de Mendoza, encontrando que la concentración de dicho metal era alto en los fertilizantes fosfatados y, dentro de este grupo, las mayores concentraciones se encontraron en aquellos en los que el pentóxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) era el compuesto predominante en su formulación (fosfatos de amonio y superfosfatos triples). Un dato relevante es que en el suelo

persiste al menos el 80 % del Cd contenido como impurezas de los fertilizantes fosfatados aplicados (Kponblekou y Tabatabai, 1994).

La industria de los fertilizantes ha trabajado arduamente intentando disminuir el contenido de Cd mediante técnicas de eliminación y purificación (Isherwood, 1992). Actualmente, la estrategia está orientada al uso de fertilizantes con bajas concentraciones de este metal. No obstante, numerosos países han implementado regulaciones que limitan no solo la concentración de Cd en los fertilizantes, sino también su aplicación. Japón, Australia y algunos países de Europa han propuesto límites en la concentración de Cd de los fertilizantes fosfatados que se comercializan y, cuando el contenido excede el valor límite, se debe declarar su concentración en el producto. Así, los países de la Organización para el Desarrollo y Cooperación Económica (OECD) han sugerido niveles de tolerancia en el contenido de Cd por kg de P que aportan; estos son menores de 50 mg Cd kg<sup>-1</sup> P para Suiza y Finlandia, de 100 mg Cd kg<sup>-1</sup> P para Noruega y Suecia, de 210 mg kg<sup>-1</sup> P en el caso de Bélgica y Alemania y hasta 340 mg Cd kg<sup>-1</sup> P en el caso de Japón y Australia (Laegreid *et al.*, 1999).

Los fertilizantes fosfatados pueden, de manera indirecta, afectar la biodisponibilidad de Cd dado que reducen el pH del suelo incrementando la solubilidad y la movilidad del metal en el medio (Carrillo-Gonzalez *et al.*, 2006; Rieuwerts *et al.*, 2006). De la misma forma, la humedad, la materia orgánica, el tipo y la cantidad de arcilla, así como también la cantidad y la duración de aplicación de fertilizantes fosfatados son factores determinantes de la disponibilidad y movilidad del elemento en el suelo (Laegreid *et al.*, 1999). Así, el contenido de Cd de los cultivos está íntimamente relacionado con la concentración de metal que se encuentra en el suelo (Adams *et al.*, 2004) por lo que, la aplicación de fertilizantes fosfatados durante largos períodos tiende a incrementar la concentración del metal en el sustrato aumentando las posibilidades de ser incorporado por los cultivos (Williams y David, 1973; 1976; Mulla *et al.*, 1980; Jones *et al.*, 1987; Jones y Johnston, 1989; Hamon *et al.*, 1998; Kashem y Singh, 2002; Brennan y Bolland, 2004). En numerosos trabajos se ha demostrado que cultivos expuestos a la aplicación de fertilizantes a base de fosfatos, aun cuando estos contenían solo trazas de Cd, fueron capaces de acumular el metal en los tejidos (Choudhary *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 2002; Jiao *et al.*, 2004). Estudios realizados en cultivos de trigo candeal y papa demostraron que la aplicación de fosfato monoamónico, conteniendo diferentes concentraciones de Cd, durante cortos períodos (3 años) no aumentó el contenido del metal pesado en los vegetales (McLaughlin *et al.*, 1995; Roberts, 2014). No obstante, investigaciones realizadas en Nueva Zelanda indicaron que la excesiva y prolongada aplicación de fertilizantes fosfatados incrementa las cantidades de Cd en el suelo, afectando los cultivos (Bonomelli *et al.*, 2003). Grant (2011) reveló que la aplicación de fertilizantes fosfatados conteniendo entre 20 a 50 mg kg<sup>-1</sup> de Cd conduce a un significativo aumento del contenido del metal en suelos lo que puede llevar a una mayor acumulación del contaminante en el cultivo. Experimentos llevados a cabo en Estados Unidos aplicando por más de 50 años fertilizantes fosfatados que contenían concentraciones de Cd recomendadas para dicho producto (5 mg Cd kg<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>) incrementaron la concentración en el suelo de este metal entre un 0 a 0,5 % por año (Mortvedt, 1987).

## **Toxicidad del cadmio en plantas**

Todas las formas de vida, incluyendo microorganismos, plantas y animales, se ven afectadas por la presencia de Cd en el medio (Del Ramo *et al.*, 1993). De todos los efectos adversos que los metales pesados ocasionan en los organismos, la inducción del estrés oxidativo constituye uno de los más severos. Por lo tanto, el impacto negativo que los metales pesados producen sobre los organismos se debe en gran parte al estallido oxidativo que se genera por el aumento de las especies reactivas del oxígeno (EROs) (Stohs y Bagchi, 1995). Los cationes metálicos como el Cd y Pb no experimentan cambios redox, como sucede con el Fe o Cu, y por lo tanto no intervienen directamente en la generación de EROs. Sin embargo, actúan como prooxidantes a través de la reducción del contenido de glutatión (GSH) disminuyendo así las defensas antioxidantes (Pinto *et al.*, 2003) y generando estrés oxidativo. Específicamente, los efectos tóxicos del Cd sobre las plantas han sido ampliamente estudiados (Sanitá di Toppi y Gabrielli, 1999; Benavides *et al.*, 2005). No obstante, los mecanismos de su toxicidad no están completamente elucidados. En general, la presencia de Cd en las plantas ocasiona: a) interferencia en la entrada, en el transporte y en la utilización de elementos esenciales (Ca, Mg, P y K) y del agua, provocando desequilibrios nutricionales e hídricos (Poschenrieder *et al.*, 1989; Sandalio *et al.*, 2001; Singh y Tewari, 2003); b) reducción en la absorción y transporte de nitratos de la raíz al tallo, además de inhibir la actividad nitrato reductasa en tallos (Gouia *et al.*, 2000); c) modificaciones en la apertura estomática, fotosíntesis y transpiración (Sandalio *et al.*, 2001); d) clorosis producida por una deficiencia de Fe (Benavides *et al.*, 2005), fosfatos o por la reducción del transporte de Mn (Goldbol y Hutterman, 1985); e) alteraciones en la funcionalidad de la membrana plasmática (Fodor *et al.*, 1995; Sandalio *et al.*, 2001); f) desequilibrios en el metabolismo del cloroplasto por inhibición de la síntesis de clorofila y reducción de la actividad de enzimas implicadas en la fijación de CO<sub>2</sub> (Ali *et al.*, 2000; Maksymiec *et al.*, 2007); g) daño oxidativo a membranas, tales como peroxidación lipídica (Lozano-Rodríguez *et al.*, 1997; Sandalio *et al.*, 2001; Wua *et al.*, 2003; Balestrasse *et al.*, 2004), y a proteínas por formación de grupos carbonilos proteicos (Romero-Puertas *et al.*, 2002); h) alteración de las actividades de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, glutatión reductasa, ascorbato peroxidasa, peroxidasa y catalasa, encargadas de la defensa celular frente a las EROs (Sies, 1990), así como también incremento de la síntesis de fitoquelatinas (PCs) (Bianucci *et al.*, 2012).

## Impacto del cadmio sobre el cultivo de maní

Características generales del maní: importancia del cultivo en Argentina

El maní (*Arachis hypogaea* L.) o cacahuete es el nombre común de una planta anual propia de zonas cálidas, originaria de la región andina del noroeste de Argentina y sur de Bolivia (Faucher, 2001). Esta leguminosa es una dicotiledónea que pertenece al orden Fabales, familia de las Fabaceas, subfamilia Papilionoidea, tribu Aeschynomeneae, subtribu Stylosanthinae (Stalker, 1997). El género *Arachis* comprende 22 especies, de las cuales 9 son noduladas y solo una (*Arachis hypogaea* L.) es actualmente cultivada. Es una planta herbácea que alcanza un crecimiento de 20 a 60 cm de altura y hasta 1,2 m de extensión. Algunos tipos de plantas de maní desarrollan un porte erguido y compacto, y otros, los denominados rastreros, se extienden sobre el terreno. Casi todas las formas que se cultivan comercialmente pertenecen al primer grupo. Es una planta geocárpica, y por lo tanto la infrutescencia



Figura 1. Fruto de maní.

se introduce en el suelo después de la floración y luego el fruto madura dentro de la tierra, tomando contacto así con las partículas del suelo y los microorganismos que habitan en la rizósfera (Cole *et al.*, 1987; Moss y Guarino, 1995). Los frutos, que se desarrollan aproximadamente entre 3 y 10 cm de profundidad en el suelo, pueden llegar a tener una longitud de hasta 7 cm y contener de 1 a 4 semillas de color café amarillento con tegumento de color rojo claro u oscuro.

Comercialmente, a los cultivares de maní se los clasifica por las características de sus granos y el color del tegumento en Virginia, Runner, Valencia y Español. En la región manisera argentina solo se emplean los cultivares Runner (Florman INTA, Tegua, Granoleico, Nahuel y Florunner) y Valencia (Colorado irradiado INTA) (Giandana, 1997). Actualmente el cultivar más utilizado en la región de Córdoba es el Granoleico ya que:

- posee una alta relación oleico/linoleico (20), con contenido del 75-80 % ácido oleico y 2-3 % de ácido linoleico lo que le otorga una mayor estabilidad frente a procesos oxidativos,

- tiene una estabilidad química y sensorial que se estima hasta diez veces mayor en relación con los granos de maní que no poseen alto contenido oleico,
- produce granos de mayor tamaño (granulometrías entre 35/38 y 38/42) en comparación a otros cultivares.

El ciclo del maní posee dos estados: vegetativo (hojas y tallos) y reproductivo (flores, clavos y vainas). El tiempo y la velocidad de desarrollo de cada una de estos estados dependen de la temperatura y humedad del suelo (INTA, 2010). Si bien, actualmente se dispone de información suficiente sobre los factores que intervienen en la duración del ciclo biológico y en la producción de los cultivos (climáticos, edáficos y biológicos), es frecuente encontrar que para referirse a un momento determinado del ciclo se lo considere en términos de una escala de tiempo. Es por ello que, cada vez cobra mayor importancia el uso de escalas fenológicas que permiten referirse a las observaciones y prácticas de manejo del cultivo en una etapa de desarrollo determinado.

Argentina ocupa el primer y segundo puesto de exportadores mundiales de aceite y granos de maní, respectivamente. En la campaña 2014/2015 la producción de maní en caja para la provincia de Córdoba fue 1.102.200 toneladas, resultando un 20 % superior al obtenido durante el ciclo anterior. La producción en grano también incrementó con respecto a la campaña pasada (26 %), alcanzando un valor de 778.700 toneladas (Bolsa de Cereales de Córdoba, 2015). Aproximadamente el 70 % de dicha producción se destina a maní confitería, que se exporta para consumo humano, el 10 % se exporta como grana (maní partido que se usa para cobertura en repostería o como pasta en la elaboración de manteca) y el 20 % restante para la extracción de aceite (Todoagro, 2012).

En cuanto a las proyecciones de oferta y demanda mundial del maní para el 2020, distintas fuentes internacionales, tales como FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), FAPRI (Instituto de investigación de políticas agrícolas y de alimentos) y la consultora especializada OilWorld, coinciden en que se espera que la producción de maní crezca a nivel mundial en los próximos 10 años, alcanzando un total de 440 millones de toneladas vs. 360 millones de la media de los últimos cinco años (López, 2011).

Uno de los factores que afecta al rendimiento del cultivo del maní es la disponibilidad de nitrógeno (N), el cual es uno de los elementos más ampliamente distribuidos en la naturaleza. En la atmósfera, cerca del 78 % se encuentra en el estado gaseoso bajo la forma de nitrógeno molecular ( $N_2$ ) y es la única reserva de N accesible en la biosfera. El N es de vital importancia ya que forma parte de moléculas que participan en diversos procesos biológicos elementales, tales como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas.

La incorporación de N por las plantas puede llevarse a cabo mediante la absorción directa desde el suelo en forma de nitrato ( $NO_3^-$ ) y amonio ( $NH_4^+$ ), o por las bacterias fijadoras de N que reducen el  $N_2$  atmosférico en  $NH_4^+$ , proceso denominado fijación biológica del nitrógeno (FBN). La FBN es la principal fuente de N en la biosfera y contribuye con un 65 % al aporte global de N (más del doble del proveniente de los fertilizantes nitrogenados). Por lo tanto, este proceso de fijación

representa una alternativa más económica y ecológicamente sostenible frente al uso de fertilizantes nitrogenados (Wang *et al.*, 2003) que pueden causar una alta contaminación ambiental.

La FBN es llevada a cabo por un escaso grupo de microorganismos procariotas llamados diazótrofos cuya característica principal es la de poseer el complejo nitrogenasa, encargado de transformar el nitrógeno atmosférico en amonio. La interacción simbiótica establecida por la planta de maní se realiza con los microorganismos comúnmente conocidos con el nombre de rizobios, representando uno de los sistemas de fijación de nitrógeno más eficiente. Además, este tipo de interacción es altamente benéfica para ambos miembros del par simbiótico ya que la bacteria fija  $N_2$  y cede gran parte de este a la planta permitiendo su crecimiento. La planta, por su parte, fija carbono por medio de la fotosíntesis y aporta gran cantidad de compuestos carbonados a la bacteria. Este tipo de simbiosis no solo favorece significativamente al ciclo global del nitrógeno, sino que además permite mantener la fertilidad de los suelos incrementando la productividad del maní.

Las bacterias que nodulan maní han sido clasificadas como *Bradyrhizobium* sp., miembros del Phylum Proteobacteria, ubicándose la mayor parte de ellos en el orden VI, Rhizobiales, de la clase I  $\alpha$ -proteobacterias, no habiéndose aún definido las especies. La bibliografía indica que los rizobios nodulantes de esta leguminosa son bacilos Gram negativos de crecimiento lento y pertenecen a la familia Bradyrhizobiaceae (Fabra *et al.*, 2010; Muñoz *et al.*, 2014). Sin embargo, el análisis morfofisiológico y molecular realizado en microorganismos simbiotes de maní obtenidos de diferentes regiones geográficas de la provincia de Córdoba reveló la presencia de rizobios de crecimiento rápido asociados a nódulos de plantas de maní cultivadas en el área manisera de Córdoba (Taurian *et al.*, 2002; Ibáñez *et al.*, 2008).

La información acerca del efecto del Cd sobre la asociación simbiótica rizobio-leguminosa es escasa. Investigaciones recientes revelaron que la presencia de metales pesados en concentraciones mayores que los límites permitidos afecta no solo la supervivencia de los rizobios, sino también la formación de nódulos en leguminosas y la eficiencia de fijación de nitrógeno (Alexander *et al.*, 1999; Broos *et al.*, 2004; Younis, 2007). Asimismo, este metal ocasiona daño oxidativo en raíces de soja y nódulos afectando la asimilación del N (Balestrasse *et al.*, 2001, 2003). El Cd en el suelo reduce la formación y funcionalidad del nódulo en numerosas leguminosas tales como arveja (Hernández *et al.*, 1995), soja (Huang y Vanderhoef, 1974), alfalfa (Porter *et al.*, 1981), poroto (Vigue *et al.*, 1981) y lupino (Carpena *et al.*, 2003). Particularmente, en la asociación simbiótica establecida entre el maní y las bacterias del género *Bradyrhizobium*, el Cd genera un impacto negativo no solo sobre el crecimiento de plantas, sino también sobre el proceso de nodulación inducido tanto por bradirizobios sensibles o tolerantes a dicho metal (Bianucci *et al.*, 2011; 2013). Además, se ha demostrado, en ensayos realizados en cámaras de cultivo, que las raíces y nódulos de maní acumulan gran cantidad de Cd limitando los niveles que se translocan y acumulan en la parte aérea, indistintamente de la tolerancia al Cd que presenten

las cepas rizobianas inoculadas. No obstante, un dato importante es que la inoculación de plantas de maní, expuestas al elemento, con la cepa tolerante al Cd *Bradyrhizobium* sp. NLH25 limita la absorción de este metal en las raíces en comparación con la inoculación de la leguminosa con la cepa sensible (Bianucci *et al.*, 2013).

### **Acumulación de cadmio y producción en grano del cultivo de maní**

Dada la importancia del maní en la Argentina, la comercialización de este se realiza según la Norma de Calidad para la Comercialización de Maní de la SAGPyA (Senasa, 2006). Al momento de la venta se consideran como principales parámetros de calidad del maní confitería, la granulometría y los niveles de aflatoxinas. Otro aspecto que hace referencia a la calidad del producto es la composición química del grano. Si bien en Argentina la norma de comercialización vigente (Res. SAGPyA 12/99) no establece especificación referida a metales pesados, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) decreta que el contenido de Cd en cereales, legumbres y leguminosas no debe superar los 0,1 mg kg<sup>-1</sup> aunque no tiene normativa específica que determine límites de metales pesados en el grano de maní u otros frutos secos. En otros países, tales como Sudáfrica el límite máximo es de 0,1 mg Cd kg<sup>-1</sup> para cereales, legumbres y leguminosas. En Suiza se estableció un nivel de Cd máximo de 0,2 mg Cd kg<sup>-1</sup> para maní sin los tegumentos, salvo aquellos utilizados para obtención de aceites vegetales. Un dato para destacar es que en el Código Alimentario internacional no existe regulación de Cd para maní y derivados. Aun así, el maní para exportación debe cumplir con una serie de requisitos impuestos por el país importador que especifican la concentración máxima de metales pesados que puede tener el grano para ser aceptado.

Todos los suelos tienen un contenido base de Cd que varía de acuerdo a la roca parental de la cual se deriva. La leguminosa maní es una planta geocárpica y sus frutos se encuentran en íntimo contacto con el suelo (Cole *et al.*, 1987; Moss y Guarino, 1995), por lo que la posibilidad de incorporar Cd en suelos contaminados incrementaría pudiendo incorporarse a la cadena trófica.

En Australia se conoce que la concentración de Cd en las leguminosas de invierno tales como el lupino varía entre un 0,01 y 0,08 mg kg<sup>-1</sup> (Petterson y Harris, 1995); 0,5 mg kg<sup>-1</sup> es el máximo permitido (Food Standards Australia New Zealand, 2008). En el tegumento y en el grano de maní se encontraron concentraciones de Cd por encima de los límites permitidos (0,67 mg kg<sup>-1</sup>) (Bell *et al.*, 1997). En Argentina, Inga *et al.* (2003) y Badini *et al.*, (2012) analizaron los niveles de Cd en granos de maní provenientes de la región manisera de Córdoba, encontrando valores de 0,04 mg kg<sup>-1</sup> y por debajo de los 0,05 mg kg<sup>-1</sup>. Teniendo en cuenta que los fertilizantes, en particular los elaborados a base de P, contienen como elemento traza al metal pesado Cd, es de esperar que el agregado de estos compuestos o suplementos podría incrementar los niveles del metal en suelo degradando la calidad del maní.



Considerando que la contaminación con Cd resultaría en una importante pérdida económica del cultivo maní, el impacto de este metal en esta leguminosa no ha sido estudiado aún en Argentina. El relevamiento de información acerca del análisis de metales pesados, en particular el Cd, en los suelos agrícolas del país son escasos (Zubullaga y Lavado, 2002), mientras que en suelos maniseros de la provincia de Córdoba no hay información disponible. Estudios realizados por nuestro grupo de investigación revelaron que el contenido de este metal en suelos de uso manisero de la provincia de Córdoba (Ascasubi, General Cabrera, Jovita y Río Cuarto) fue del orden de  $0,25 \mu\text{g g}^{-1}$  suelo (Tabla 1), lo cual es inferior al límite establecido por la legislación Argentina por decreto reglamentario 831 (1993) de la Ley Nacional 24051 Residuos ( $3 \mu\text{g g}^{-1}$  suelo).

Los estudios de acumulación de la acumulación de Cd en la interacción simbiótica maní-rizobio llevados a cabo en medio semihidropónico (perlita estéril) hasta la madurez de cosecha revelan una distribución diferencial del metal en los distintos tejidos de la planta cuando se inocula con una cepa sensible o tolerante al metal. Por una parte, de esta manera, plantas de maní inoculadas con la cepa sensible *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 mostraron que la mayor concentración de Cd se encontraba en hojas y nódulos, seguido por raíces, granos y por último las cáscaras. En cambio, plantas inoculadas con la cepa tolerante al Cd *Bradyrhizobium* sp. NLH25 presentaron similar contenido de este metal en hojas, raíces, cáscaras y granos encontrándose que los nódulos fueron los que mayor contenido del metal poseían. Por otra parte, la comparación de la acumulación de Cd entre los órganos analizados reveló que el contenido del metal en hojas, raíces y granos de las plantas inoculadas con la cepa sensible fue significativamente mayor que el hallado en aquellas inoculadas con la cepa tolerante. En cambio, el contenido de Cd en nódulos y cáscaras fue semejante, independientemente de la cepa con la que se inoculó la planta (Tabla 2). Estos resultados permitieron sugerir que para un mismo cultivar de maní, la tolerancia de las cepas inoculadas cumple un rol fundamental en la distribución de Cd en la leguminosa.

**Tabla 1.** Contenido de cadmio en suelos de la región manisera de Córdoba.

		<b>Cd (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math> suelo)</b>	
	Ascasubi	$0,22 \pm 0,003$	
	General Cabrera	$0,20 \pm 0,010$	
	Jovita	$0,24 \pm 0,010$	
Los	Río Cuarto	$0,27 \pm 0,011$	datos representan la media $\pm$

ES (n=6).

**Tabla 2.** Contenido de cadmio en las plantas de maní inoculadas con una cepa tolerante o sensible al metal.

Cepas	Contenido de Cd ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )				
	Hojas	Raíces	Nódulos	Cáscara	Granos
SEMIA6144	8,20 $\pm$ 0,39	6,19 $\pm$ 0,33	7,92 $\pm$ 0,18	4,10 $\pm$ 0,43	6,04 $\pm$ 0,94
	A1	A2	A1	A3	A2
NLH25	5,03 $\pm$ 0,82	4,87 $\pm$ 0,44	7,17 $\pm$ 0,92	3,52 $\pm$ 0,21	3,53 $\pm$ 0,25
	B1	B1	A2	A1	B1

Los datos se expresan como la media  $\pm$  ES (n=3). Letras distintas en columnas indican diferencias significativas entre cepas para una misma estructura. Números distintos entre filas indican diferencias significativas entre estructuras para una misma cepa.  $P < 0,05$ , según la prueba de Duncan.

Otro punto importante para tener en cuenta es que el maní, como otras leguminosas, es considerado de alto riesgo debido a su habilidad por acumular altas concentraciones de Cd en el producto cosechado (Gross *et al.* 1987; Bell *et al.* 1997; McLaughlin *et al.* 2000). En el período reproductivo del maní, son las hojas y ramificaciones las encargadas de enviar fotoasimilados principalmente a los frutos (Ashley, 1984), por lo que un alto contenido de Cd en hojas podría influir en el contenido del metal en granos. De esta manera, la inoculación de las plantas de maní con la cepa tolerante *Bradyrhizobium* sp. NLH25 restringiría la captación de Cd del medio limitando su translocación hacia el grano. Es así que mientras más baja sea la concentración de Cd que se alcance en hojas, menor será el contenido del metal en el fruto. Más aún, debido a los bajos valores de Cd hallados en las plantas inoculadas con la cepa tolerante, se podría sugerir que la tolerancia de esta cepa estaría involucrada en la captación y transporte de Cd, limitando la absorción y posterior translocación del metal. En la mayoría de las plantas, el contenido de Cd es superior en raíces que en hojas, sugiriendo que el transporte del Cd hacia el xilema estaría restringido. Asimismo, se ha demostrado que el contenido de este metal es menor aún en granos y tubérculos, por lo que la translocación de Cd vía floema también se encontraría limitada (Seregin y Kozhevnikova, 2008; Conn y Gilliam, 2010). Si bien la incorporación de nutrientes se realiza vía xilema, y la mayor cantidad de Cd encontrado en los granos proviene del transporte de los fotoasimilados de las hojas, los pelos absorbentes de las cáscaras también participan en la absorción de Cd a través de transportadores de iones como el Ca y Zn, que se extraen directamente del sustrato en donde se encuentren (Zharare *et al.*, 1993; Bell *et al.* 1997). No obstante, la concentración que se acumula por absorción directa resulta despreciable en comparación con lo que se transporta vía xilema. En Australia, cultivos de maní crecidos a campo expuestos a altas concentraciones de Cd, producto de la contaminación natural de los suelos, presentaron una alta concentración del metal proveniente de xilema observándose una baja

proporción proveniente directamente de la absorción directa del suelo a través de los pelos absorbentes del fruto (McLaughlin *et al.*, 2000).

Dado que el Cd es capaz de ser translocado hacia la parte aérea y consecuentemente a los granos es posible esperar un impacto negativo del metal sobre el rendimiento de la leguminosa. Los cultivos en el campo se encuentran afectados por innumerables factores ambientales que disminuyen la productividad. Algunos de ellos son el déficit hídrico, ataque por depredadores, altas temperaturas, enfermedades producidas por hongos, entre otros. Donoso (1997) afirma que la productividad de trigo y alfalfa, cultivos crecidos en suelos contaminados por riego con agua conteniendo elevado contenido de metales pesados, se encontró significativamente afectada. Sin embargo, el agregado de lodos, cuya concentración de metales pesados es relativamente alta, especialmente aquellos provenientes de plantas de tratamiento de agua residual industrial, no modificaron el rendimiento de plantas de trigo (Martinez de la Cerda *et al.*, 2004). Plantas de maní creciendo en medio semihidropónico hasta tiempo de cosecha en presencia de Cd mostraron una disminución significativa del número de frutos y su peso seco, independientemente de la cepa con la que se haya inoculado la planta de maní. De igual manera, el análisis del número de granos por planta mostró que este disminuyó significativamente cuando la planta creció en presencia de Cd (Tabla 3).

Estos resultados ponen en evidencia el efecto tóxico del Cd sobre la productividad del maní. Si bien nuestro estudio se limita a ensayos en invernáculo, permite inferir posibles daños en el cultivo creciendo en suelos contaminados. Teniendo en cuenta que el sustrato utilizado permite un crecimiento semejante al que la planta tendría en el suelo, es posible proponer que la estimación de la productividad en las condiciones estudiadas sería adecuada para determinar el impacto que el metal pesado tiene sobre este parámetro.

En síntesis, es posible sugerir que el uso indiscriminado de fertilizantes fosfatados que contengan metales pesados podría aumentar los niveles de Cd en el suelo disminuyendo de esta manera el rendimiento del cultivo. Además, el Cd absorbido por la planta, se transloca al grano pudiendo generar no solo una contaminación alimentaria, sino también una gran pérdida económica a países que presenten una intensa actividad agrícola como Argentina.

**Tabla 3.** Efecto del cadmio sobre la producción de granos de maní.

Cepas	N.º frutos		Peso por fruto (g)		N.º de grano planta <sup>-1</sup>		Los datos se expresan como la media
	0	10	0	10	0	10	
SEMIA6144	3,6 ± 1,2	1,0 ± 0,5	0,5 ± 0,2	1,9 ± 0,3	6,0 ± 1,1	1,3 ± 0,8	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	
NLH25	4,0 ± 1,0	1,6 ± 0,8	0,6 ± 0,4	1,8 ± 0,5	6,3 ± 0,8	2,3 ± 1,4	
	A1	A2	A1	A2	A1	A2	

± ES (n=3). Letras distintas entre columnas indican diferencias significativas entre cepas para un mismo tratamiento. Números distintos entre filas indican diferencias significativas entre tratamientos para una misma cepa. P<0,05, según la prueba de Duncan.

## Conclusión

Las malas prácticas agrícolas, tal como la aplicación inadecuada de fertilizantes químicos, constituyen un serio riesgo ambiental que puede impactar en los cultivos y en la salud humana. El P es un elemento esencial para los cultivos y se requiere de un adecuado suministro para obtener los máximos rendimientos. Tanto los fertilizantes orgánicos e inorgánicos a base de este elemento pueden contener Cd. Dado que el ingreso de este metal a los suelos se incrementa con la aplicación de fertilizantes fosfatados, la concentración de Cd en los fertilizantes como la frecuencia de aplicación resultan parámetros de gran importancia que afectan su disponibilidad en los suelos. En este sentido, la búsqueda de alternativas que disminuyan el problema de contaminación resulta de relevancia. Los estudios tendientes a conocer el efecto del Cd sobre la leguminosa maní demostraron que el metal impacta negativamente sobre el cultivo provocando una alta translocación del metal hacia la parte aérea y granos, además de ocasionar una disminución del rendimiento. De esta manera, el uso de microsimbiontes de maní tolerantes al Cd que permitan acumular altas concentraciones del contaminante en el nódulo, limitando su translocación hacia parte aérea y fruto o grano constituye una alternativa favorable frente al uso de fertilizantes químicos que contaminen aún más nuestro ecosistema.

## Bibliografía

- ABD-ALLA, M.H. 1994. Phosphatases and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*. Letters in Applied Microbiology, 18:294-296.
- ADAMS, M.L.; ZHAO, F.J.; MCGRATH, S.P.; NICHOLSON, F.A.; CHAMBERS, B.J. 2004. Predicting cadmium concentrations in wheat and barley rain using soil properties. Journal of Environmental Quality, 33: 532-541.
- ALEXANDER, M. 1980. Transformaciones microbianas del fósforo. En: Introducción a la microbiología del suelo. AGT editor, México, pp. 355-371.
- ALI, G.; SRIVASTAVA, P.S.; IQBAL, M. 2000. Influence of cadmium and zinc on growth and photosynthesis of *Bacopa monniera* cultivated *in vitro*. Biologia Plantarum 43:599-601.
- ARIAS JIMÉNEZ, A.C. 2001. Suelos tropicales. En: Editorial Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica. Capítulo 6. Fertilidad del suelo y la nutrición mineral, pp. 82-100.

- ASHLEY, J.M. 1984. Groundnut. En: Golsworthy, P.R.; Fisher, N.M. The physiology of tropical field crops. John Wiley and Sons Ltda. Cap. 13. pp.453-494.
- BADINI, R.G.; INGA, C.M.; AGUILAR, R.C.; SILVA, M.C., MARTINEZ, M.J. 2012. Análisis elemental comparativo en maní confitería de Córdoba por técnicas de espectroscopía atómica. INTA 2012/37.
- BALESTRASSE, K.B.; GARDEY, L.; GALLEGOS, S.M.; TOMARO, M.L. 2001. Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Plant Physiology* 28: 497-504.
- BALESTRASSE, K.B.; BENAVIDES, M.P.; GALLEGOS, S.M.; TOMARO, M.L. 2003. Effect on cadmium stress on nitrogen metabolism in nodules and roots of soybean plants. *Functional Plant Biology* 30: 7-64.
- BALESTRASSE, K.B.; GALLEGOS, S.M.; TOMARO, M.L. 2004. Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max* L.) plants. *Plant Soil* 262: 373-381.
- BELL, M.J.; McLAUGHLIN, M.J.; WRIGHT, G.C.; CRUICKSHANK, A. 1997. Inter- and intra-specific variation in accumulation of cadmium by peanut, soybean and navy bean. *Australian Journal of Agricultural Research* 48: 1151-1160.
- BENAVIDES, M.P.; GALLEGOS, S.M.; TOMARO, M. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17:21-34.
- BESOAIN, E.; LEÓN, L.; CHIEN, S.; VAN KAUWENBERGH, S.; AMBERGER, A. 1999. Las rocas fosfóricas. En: INIA-LA PLATINA. Las rocas fosfóricas y sus posibilidades de uso agrícola en Chile. Chile. pp. 41-43.
- BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. 2008. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology* 82: 493-512.
- BHAT, K.K.S.; NYE, P.H. 1974. Diffusion of phosphate to plant root: III. Depletion of phosphate around onion roots without root hairs. *Plant soil* 41: 383-394.
- BIANUCCI, E.; FABRA, A.; CASTRO, S. 2011. Cadmium accumulation and tolerance in *Bradyrhizobium* spp. (peanut microsymbionts). *Current Microbiology* 62: 96-100.
- BIANUCCI, E.; SOBRINO-PLATA, J.; CARPENA-RUIZ, R.O.; TORDABLE, M.C.; FABRA, A.; HERNÁNDEZ, L.E.; CASTRO, S. 2012. Contribution of phytochelatins to cadmium tolerance in peanut plants. *Metallomics*, 4:1119-1124.
- BIANUCCI, E.; FURLAN, A.; RIVADENEIRA, J.; SOBRINO-PLATA, J.; CARPENA-RUIZ, R.O.; TORDABLE, M.C.; FABRA, A.; HERNÁNDEZ, L.E.; CASTRO, S. 2013. Influence of cadmium on the symbiotic interaction established between peanut (*Arachis hypogaea* L.) and sensitive or tolerant bradyrhizobial strains. *Journal of Environmental Management*, 130:126-134.
- BOLSA DE CEREALES DE CÓRDOBA. Informe 2014/15 Disponible: [www.bccba.com.ar/bcc/](http://www.bccba.com.ar/bcc/) consultado: 16 de octubre de 2016.
- BONADEO, E.; MORENO, I.; PEDELINI, R. 1997. Algunos aspectos nutricionales del cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.). 12.º Jornada Nacional del Maní. General Cabrera-Córdoba, pp.: 29-31.
- BONADEO, E.; MORENO, I.; PEDELINI, R. 1998. Estudio preliminar sobre los niveles de nitrógeno, fósforo, calcio y boro en suelo y su relación con el cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.). III Reunión Nacional de Oleaginosos. Bahía Blanca, Argentina. p. 225,.
- BONOMELLI, C.; BONILLA, C.; VALENZUELA, A. 2003. Efecto de la fertilización fosforada sobre el contenido de cadmio en cuatro suelos de Chile. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38: 1179-1186.
- BOSCH, E.N.; DA VEIGA, A. 2002. Pérdida de fertilidad de un suelo agrícola. INTA, Buenos Aires.
- BRENNAN, R.F.; BOLLAND, M.D.A. 2004. Wheat and canola response to concentrations of phosphorus and cadmium in a sandy soil. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44: 1025-1029.

- BROOS, K.; UYTTEBROEK, M.; MERTENS, J.; SMOLDERS, E. 2004. A survey of symbiotic nitrogen fixation by white clover grown on metal contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 36:633-640.
- CARPENA, R.; ESTEBAN, E.; VÁZQUEZ, S.; ZORNOZA, P.; FERNÁNDEZ-PASCUAL; DE FELIPE, M. 2003. Cadmium-stress in white lupin: effects on nodule structure and functioning. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 911-919, 2003.
- CARPENA, R.; ESTEBAN, E.; LUCENA, J.J.; PEÑALOSA, S.; VÁZQUEZ, P.; ZORNOZA, P.; GÁRATE, A. 2006. Simbiosis y fitorrecuperación de suelos. En: Bedmar, E.J.; González, J.; Lluch, C.; Rodelas, M.B. (ed.). *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno, Granada, pp. 255-268.
- CARRILLO-GONZÁLEZ, R.; SIMUNEK, J.; SAUVÉ, S.; ADRIANO, D. 2006. Mechanisms and pathways of trace element mobility in soils. *Advances in Agronomy* 91: 111-178.
- CHOUDHARY, M.; BAILEY, L.D.; GRANT, C.A. 1994. Effect of zinc on cadmium concentration in the tissue of durum wheat. *Canadian Journal of Plant Science* 74: 549-552.
- COLE, R.J.; SANDERS, T.H.; DORNER, J.W.; BLANKENSHIP, P.D. 1987. Environmental conditions required to induce preharvest aflatoxins contamination of groundnuts: Summary of six years research. En: *Aflatoxin contamination of groundnuts proceedings of the International workshop*. ICRISAT Center, India. pp. 279-287.
- CONN, S.; GILLIHAM, M. 2010. Comparative physiology of elemental distributions in plants. *Annals of Botany* 105: 1081-1102.
- DE ACEVEDO, F. 2003. *Toxicología do Mercúrio*. RiMa. Sao Paulo, Brasil. p. 292.
- DEL RAMO, J.; MARTÍNEZ, M.; PASTOR, A.; TORREBLANCA, A.; DÍAZ-MAYANS, J. 1993. Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia parthenogenetica*. *Aquaculture* 112:315-325.
- DONOSO, G. 1997. Contaminación por Metales Pesados: El Efecto del Cobre Sobre el Rendimiento y los Momentos Superiores de la Distribución de Trigo y Alfalfa. *Ciencia e Investigación Agraria* 24: 19-30.
- DUFFUS, J.H. 2002. "Heavy metals"-a meaningless term? *Pure and Applied Chemistry* 74:793-807.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA)-UNITED STATES. 1999. *Biosolids Generation, Use, and Disposal in The United States*. Municipal and Industrial Solid Waste Division Office of Solid Waste. EPA 530-R-99-009. 74 p.
- FABRA, A.; CASTRO, S.; TAURIAN, T.; ANGELINI, J.; IBAÑEZ, F.; DARDANELLI, M.; TONELLI, M.; BIANUCCI, E.; VALETTI, L. 2010. Interaction among *Arachis hypogaea* L. (peanut) and beneficial soil microorganisms: how much is it known? *Critical Reviews in Microbiology* 36:179-194.
- FAUCHER, R. 2001. Área de siembra. *Revista agro mercado: maní*, p. 22.
- FODOR, A.; SZABÓ-NAGY, A.; ERDEI, L. 1995. The effects of cadmium on the fluidity and H<sup>+</sup>-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. *Journal of Plant Physiology* 14: 787-792.
- FOOD STANDARDS AUSTRALIA NEW ZEALAND (FSANZ). 2008. Final assessment report application a552. Cadmium in peanuts. Disponible: <http://www.foodstandards.gov.au/srcfiles/A552%20Cadmium%20in%20peanuts%20FAR%20FINAL.pdf>. Visitado 16 de octubre de 2016.
- GIANDANA, E.H. 1997. Variedades de maní. La tendencia de su mejoramiento en la Argentina. XII Jornada Nacional del Maní. Gral. Cabrera, Córdoba. p. 42.
- GOLDBOL, D.L.; HUTTERMAN, A. 1985. Effect of zinc, cadmium and mercury on root elongation on *Picea abies* (Karst.) seedlings and the significance of these metals to forest die-back. *Environmental Pollution* 38:375-381.

- GOUIA, H.; GHORBAL, M.H.; MEYER, C. 2000. Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:629-638.
- GRANT, C.M.; PERRONE, G.; DAWES, I.W. 1998. Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 253:893-898.
- GRANT, C.A.; BAILEY, L.D.; HARAPIAK, J.T.; FLORE, N.A. 2002. Effect of phosphate source, rate and cadmium content and use of *Penicillium bilaii* on phosphorus, zinc and cadmium concentration in durum wheat grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 301-308.
- GROSS, R.; AUSLITZ, J.; SCHRAMMEL, P.; PAYER, H.D. 1987. Concentrations of lead, cadmium, mercury and other elements in seeds of *Lupinus mutabilis* and of other legumes *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 7, 59-66.
- HAMON, R.E.; MCLAUGHLIN, M.J.; NAIDU, R.; CORRELL, R. 1998. Long-term changes in cadmium bioavailability in soil. *Environmental Science & Technology* 32: 3699-3703.
- HENSON, M.C.; CHEDRESE, P.J. 2004. Endocrine Disruption by Cadmium, a Common Environmental Toxicant with Paradoxical Effects on Reproduction. *Experimental Medicine* 229: 383-392.
- HERNÁNDEZ, J.A.; OLMOS, E.; CORPAS, F.J.; SEVILLA, F.; DEL RÍO, L.A. 1995. Salt induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science* 105: 151-167.
- HUANG, F.A.; VANDERHOEF, L.N. 1974. The inhibition of soybean metabolism by cadmium and lead. *Plant Physiology* 54: 122-126.
- IBAÑEZ, F.; TAURIAN, T.; ANGELINI, J.; TONELLI, M.L.; FABRA, A. 2008. Rhizobia phylogenetically related to common bean symbionts *Rhizobium giardinii* and *R. tropici* isolated from peanut nodules in central Argentina. *Soil Biology and Biochemistry* 40:537-539.
- IBEKWE, A.M.; ANGLE, J.S.; CHANEY, R.L.; BERKUM, P. 1995. Sewage sludge and heavy-metal effects on nodulation and nitrogen fixation legumes. *Journal of Environmental Quality* 24: 1199-1204.
- INGA, C.; CABRERA, J.; SPAHN, J.; LUTTI, G.; BADINI, R.; AGUILAR, R.; MARTINEZ, M.; CASINI, C. 2003. Valores bajos de Cd em el maní de la provincia de Córdoba. XVIII Jornada Nacional de Maní. p. 60.
- ISHERWOOD, K.F. 1992. Phosphate industry and the environment. En: International workshop of phosphate fertilizer on the environment, Tampa. Proceedings. Tampa: International Fertilizer Development Center, pp. 115-123.
- JIAO, Y.; GRANT, C.A.; BAILEY, L.D. 2004. Effects of phosphorus and zinc fertilizer on cadmium uptake and distribution in flax and durum wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 777-785.
- JONES, K.C.; SYMON, C.J.; JOHNSTON, A.E. 1987. Long term changes in soil and cereal grain cadmium: studies at Rothamsted Experimental Station. *Trace Substances Environmental Health. Proceeding of Univ. Mo. Annual Conference Trace Substances and Environmental Health*, 450-460.
- JONES, K.C.; JOHNSTON, A.E. 1989. Cadmium in cereal grain and herbage from long-term experimental plots at Rothamsted, UK. *Environmental Pollution* 57: 199-216.
- KASHEM, M.A.; SINGH, B.R. 2002. The effect of fertilizer additions on the solubility and plant-availability of Cd, Ni and Zn in soil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 62: 287-296.
- KPONBLEKOU, A.; TABATABAI, M. 1994. Metal contents of phosphate rocks. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 26: 2781-2882.
- LAEGREID, M.; BOCKMAN, O.C.; KAARSTAD, E.O. 1999. Agriculture fertilizers and environment. Wallingford: CAB. p. 294.

- LANE, T.W.; MOREL, F.M. 2000. A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:4627-4631.
- LÓPEZ, M. 2011. Serie de estudios sectoriales: Caso del maní y derivados del maní. Disponible: [http://www.inai.org.ar/sitio\\_nuevo/index.asp](http://www.inai.org.ar/sitio_nuevo/index.asp). Visitado 17 de octubre de 2016.
- GIUFFRÉ DE LÓPEZ CAMELO, L.; DE MIGUEZ, S.R.; MARBÁN, L. 1997. Heavy metals input with phosphate fertilizers used in Argentina. *Science of the Total Environment* 204: 245-250.
- LOZANO-RODRÍGUEZ, E.; HERNÁNDEZ, L.E.; BONAY, P.; CARPENA-RUIZ, R.O. 1997. Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. *Journal Experimental Botany* 48: 123-128.
- MAKSYMIEC, W.; WOJCIK, M.; KRUPA, Z. 2007. Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. *Chemosphere* 66:421-427.
- MANN, S.S.; RATE, A.W.; GILKES, R.J. 2002. Cadmium accumulation in agricultural soils in Western Australia. *Water Water Air and Soil Pollution* 141: 281-97.
- MARTÍ, L.; BURBA, J.N.; CAVAGNARO, M. 2002. Metales pesados en fertilizantes fosfatados, nitrogenados y mixtos *Rev. FCA UNCuyo*. Tomo XXXIV. N.º 2.
- MARTÍNEZ-DE LA CERDA, J.; OLIVARES-SAÉNZ, E.; SALINAS-GARCÍA, G.; ZÁVALA-GARCÍA, F.; ARANDA-RUIZ, J. 2004. Efecto residual del lodo en trigo (*Triticum*spp. L.) *Phyton International Journal of Experimental Botany* 73 237-242.
- MARUTHI, B.B.S.; DILE, S.V.; HAN, F.X.; MONTS, D.L.; SU, Y. 2005. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environmental and Experimental Botany* 54: 131-141.
- MCLAUGHLIN, M.J.; MAIER, N.A.; FREEMAN, K.; TILLER, K.G.; WILLIAMS, C.M.J.; SMART, M.K. 1995. Effect of potassic and phosphatic fertilizer type, fertilizer Cd concentration and zinc rate on cadmium uptake by potatoes. *Fertilizer Research* 40: 63-70.
- MCLAUGHLIN, M.; BELL, M.; WRIGHT, G.; COZENS, G. 2000. Uptake and partitioning of cadmium by cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant and Soil* 222:51-58.
- MORROW, H. 1990. Cadmium (Cd), *Metals Handbook*, 10<sup>th</sup> Edition, Volume 2, ASM International, Metals Park, Ohio.
- MORTVEDT, J.J. 1987. Cadmium levels in soils and plants from some long-term soil fertility experiments in the United States of America. *Journal of Environmental Quality* 16: 137-142.
- MOSS, H.; GUARINO, L. 1995. Gathering and recording data in the field. En: L Guarino, L.; Ramanatha Rao, V.; Reid, R. (ed.). *Collecting Plant Genetic Diversity*. CAB International, Wallingford, Reino Unido. pp. 367-417.
- MULLA, D.J.; PAGE, A.L.; GANJE, T.J. 1980. Cd accumulation and bioavailability in soils from long-term fertilization. *Journal of Environmental Quality* 9: 408-412.
- MUÑOZ, V.; IBAÑEZ, F.; TORDABLE, M.; MEGÍAS, M.; FABRA, A. 2014. Role of reactive oxygen species generation and Nod factors during the early symbiotic interaction between bradyrhizobia and peanut, a legume infected by crack entry. *Journal of Applied Microbiology* 1-11.
- PETTERSON, D.S.; HARRIS, D.J. 1995. Cadmium and lead content of lupin seed grown in Western Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35: 403-407.



- PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T.C.S.; LEITÃO, M.; OKAMOTO, O.K.; MORSE, D.; COLEPICCOLO, P. 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology* 39:1008-1018.
- PORTER, J.R.; SHERIDAN, R.P. 1981. Inhibition of nitrogen fixation in alfalfa by arsenate, heavy metals, fluoride, and simulated acid rain. *Plant Physiology* 68:143-148.
- POSCHENRIEDER, C.; GUNSÉ, B.; BARCELÓ, J. 1989. Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiology* 90:1365-1371.
- RENDIG, V.V.; TAYLOR, H.M. 1989. *Principles of Soil-Plant Interrelationships*. p. 20. Nueva York: McGraw-Hill.
- RIEUWERTS, J.S.; ASHMORE, M.R.; FARAGO, M.E.; THORNTON, I. 2006. The influence of soil characteristics on the extractability of Cd, Pb and Zn in upland and moorland soils. *Science of the Total Environment* 366: 864-875.
- ROBERTS, M. 1996. EU eyes cadmium in phosphate fertilizers. *Chemical Week*. 158: 23-13, Nueva York, EUA.
- ROBERTS, T.L. 2014. Cadmium and Phosphorous Fertilizers: The Issues and the Science. *Procedia Engineering* 83:52-59.
- RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17:319-339.
- ROMERO-PUERTAS, M.C.; PALMA, J.M.; GÓMEZ, M.; DEL RÍO, L.A.; SANDALIO, L.M. 2002. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell and Environment*. 25:677-686.
- SALAZAR, R.; REYES, R. 2000. Efectos tóxicos y mecanismos de tolerancia al cadmio en los seres vivos. *Universidad, Ciencia y Tecnología*. 13: 17-22.
- SANDALIO, L.M.; DALURZO, H.C.; GÓMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; DEL RÍO, L.A. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* 52:2115-2126.
- SANITÁ DI TOPPI, L.; GABBRIELLI, R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41:105-130.
- SEREGIN, I.V.; KOZHEVNIKOVA, A.D. 2008. Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium. *Russian Journal of Plant Physiology* 55:1-22.
- SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA (SENASA). 2006. La comercialización se realiza según la Norma de Calidad para la Comercialización de Maní de la SAGPyA SENASA - Res. 12/99 NORMA XIII MANÍ.
- SEVERINA, I. 2006. Informe análisis de muestras de suelo manisero, General Cabrera, Proyecto Agricultura sustentable.
- SIES, H. 1990. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine* 27: 916-21.
- SINGH, P.K.; TEWARI, R.K. 2003. Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. *Environmental Biology* 24:107-112.
- STEEN, I. 1998. Phosphorus availability in the 21<sup>st</sup> century: Management of a non-renewable resource. *Phosphorus and Potassium* 217:225. Londres..
- STOHS, S.J.; BAGCHI, D. 1995. Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medical* 18: 321-36.
- TAURIAN, T.; AGUILAR, O.M; FABRA, A. 2002. Characterization of nodulating peanut rhizobia isolated from a native soil population in Córdoba, Argentina. *Symbiosis* 33: 59-72.
- TODOAGRO. 2012. Disponible: <http://www.todoagro.com.ar/>. Visitado 20 de noviembre de 2016.

- UNEP: PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE. Disponible: <http://www.unep.org/spanish/>, 2008-2010. Visitado 20 de noviembre de 2016.
- VIGUE, G.T.; PEPPER, I.L.; BEZDICEK, D.F. 1981. Effect of cadmium on nodulation and nitrogen fixation by dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Environmental Quality* 10: 87-90.
- WANG, T.; MARTÍNEZ ROMERO, J.; LÓPEZ LARA, I.M. 2003. Microbios en línea. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. Editores: Tao Wang, Julio Martínez Romero, Isabel López Lara. Capítulo 8. p. 345.
- WILLIAMS, C.H.; DAVID, D.J. 1973: The effect of superphosphate on the cadmium content of soils and plants. *Australian Journal of Agricultural Research* 11: 43-56, 1973.
- WILLIAMS, C.H.; DAVID, D.J. 1976. The accumulation in soil of cadmium residues from phosphate fertilizers and their effect on the cadmium content of plants. *Soil Science* 121: 86-93.
- WUA, F.; ZHANG, G.; DOMINY, P. 2003. Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity. *Environmental and Experimental Botany* 50: 63-78.
- ZHARARE, G.E.; ASHER, C.J.; BLAMEY, F.P.C.; DART, P.J. 1993. Pod development of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in solution culture. *Plant Soil* 155/156: 355-358.
- ZHU, Y.L.; PILON-SMITS, A.H.; JOUARIN, L.; TERRY, N. 1999. Overexpression of glutathione synthase in *Indian Mustard* enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiology* 119: 73-80.
- ZUBILLAGA, M.S.; LAVADO, R.S. 2002. Fertilización fosfatada prolongada y contenido de elementos traza en un argiudol típico de la pampa ondulada. *Ciencia del Suelo* 20:2.

## CAPÍTULO 19

### Biorremediación de suelos contaminados con metales pesados

Beatriz Zumalave Rey<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Responsable Área medio Ambiente de la Estación Experimental Agropecuaria, Área Metropolitana de Buenos Aires, INTA.

E-mail: zumalaverrey.beatriz@inta.gob.ar

#### Introducción

En las ciudades y sus periferias viven y se desarrollan gran parte de las actividades de la sociedad en la actualidad. En este sentido, el espacio periférico de las ciudades o periurbano es en donde tiene lugar gran parte de la agricultura urbana y periurbana (en adelante AUPU).

Esta agricultura tan particular y motivo de estudios de varias disciplinas aquí y en otros lugares del mundo es sumamente compleja. Es inseparable de la vida de las ciudades y se define por la dependencia que se establece entre la ciudad y sus cercanías. Dentro de la agricultura urbana y periurbana, la horticultura es considerada por la FAO como una práctica especialmente agroecológica (FAO 2013) que dinamiza procesos altamente estimables para la sociedad misma.

La agricultura agroecológica se ha desarrollado a lo largo de las últimas tres décadas de manera progresiva y tiene infinidad de ventajas. Desde lo productivo, aprovecha la cercanía para abastecer al mercado con productos frescos. Desde el punto de vista social, puede colaborar con los requerimientos alimentarios familiares y es un puente extraordinario para crear lazos de pertenencia y arraigo cultural, aliviando las penas que produce el estar lejos del lugar de origen en aquellos casos donde se conjugan pobreza y migración rural. Sin embargo, el ambiente puede impactar fuertemente sobre ella, especialmente, cuando los suelos no tienen la aptitud suficiente para dichos fines.

El suelo como receptor de las actividades humanas soporta todo tipo de residuos (Gómez Orea, 1999). Entre estos se pueden mencionar los contaminantes orgánicos y dentro de estos, los compuestos orgánicos persistentes (COP's) hasta los inorgánicos como los metales pesados (Giuffré *et al.*, 2008). Entre las diferentes fuentes de contaminación del suelo es preciso resaltar la producida por los metales pesados resultado de la actividad antropogénica. La importancia de su estudio y su consiguiente solución radica principalmente en la silenciosa exposición a la que está sometida la población en particular y en ambiente en general. A lo largo del capítulo se expondrán experiencias e investigaciones que dan cuenta de resultados favorables en el control de este tipo de contaminación.

## Generalidades

### Remediación

El problema generado por la dispersión de contaminantes en el medioambiente se puede corregir a partir de la remediación (Vullo, 2003).

Para definir este término se puede decir que la remediación es un conjunto de actividades tendientes a reducir la presencia de materiales o residuos peligrosos en suelos o sitios contaminados (Lavado y Zubillaga, 2008).

La fitorremediación es la utilización de plantas para eliminar contaminantes del suelo, fue propuesta en 1983, pero recién tuvo aceptación en 1990.

La fitorremediación comprende diversas categorías según el rol que cumplen las plantas utilizadas en el proceso:

- Fitoextracción: uso de plantas para extraer contaminantes del suelo.
- Fitovolatilización: uso de plantas que volatilizan compuestos, por ejemplo Se.
- Rizofiltración: uso de plantas acuáticas o palustres para remover contaminantes de aguas.
- Fitoestabilización: uso de plantas para transformar los metales pesados en formas menos tóxicas o no tóxicas, especialmente para Cr y Pb.

El manejo de las técnicas de fitorremediación puede simplificarse de la siguiente manera: se identifica el área para tratar, se cultiva una especie, se cosecha, generalmente toda su biomasa, y se dispone de esta. La disposición puede ser: incineración, relleno sanitario, o más modernamente, recuperación de los elementos traza que contiene el producto de la cosecha (Lavado y Zubillaga, 2008).

Las especies con alta capacidad de acumulación (Ortega Ortiz *et al.*, 2009) se conocen como: especies hiperacumuladoras. Estos investigadores abordan el estudio de las plantas hiperacumuladoras explicando al respecto:

Las plantas hiperacumuladoras adecuadas para llevar a cabo acciones de fitoextracción deben cumplir algunas características:

- ° como la tolerancia al metal que se desea eliminar,
- ° que la acumulación se produzca fundamentalmente en la parte aérea de la planta, y que presenten un rápido crecimiento,
- ° así como una gran producción de biomasa en la parte aérea (Ortega-Ortiz *et al.*, 2009).

## Metales pesados, riesgo ambiental y salud

Marbán (2008) explica que los metales pesados (MP) son componentes naturales de la corteza terrestre, es decir, que los seres vivos están expuestos permanentemente a ellos. Al mismo tiempo algunos, Cu, Co, Fe, Mn, Mo, Zn, son esenciales para determinados procesos fisiológicos, presentando una participación específica e insustituible como catalizadores biológicos en procesos enzimáticos. En relación con el riesgo ambiental que intrínsecamente puedan tener, Marbán manifiesta:

“El riesgo ambiental de los metales pesados está relacionado con una exposición (contenido) adicional, generalmente elevada y de origen antropogénico. En el ámbito mundial existe una gran preocupación por la contaminación de suelos con metales pesados ya que la misma es considerada irreversible, irrecuperable y con elevado riesgo de fito y zootoxicidad. Su disponibilidad a la cadena trófica está condicionada por las propiedades físicas y químicas de los metales y del suelo y por el resultado de las múltiples interacciones entre los procesos intrínsecos del suelo. Cada metal posee ciertas características como: Toxicidad del metal (especie química), nula degradación ambiental; alta residencia y bioacumulación (Marbán 2008)”.

Entre los metales pesados más comunes se encuentran el plomo, el cromo y el cadmio. Estos elementos son potencialmente cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos, además de presentar en ciertas dosis fenómenos asociados a toxicidad aguda (Ratto, 2010). De allí la relevancia del tema en la gestión ambiental.

En tal sentido, estudiosos de diversas disciplinas como la biología, física y química, entre otras, se han dedicado a estudiar la toxicidad de los metales pesados. Desarrollar tales investigaciones excede la capacidad de este estudio, no obstante ello, se deja abierta la posibilidad de consultar sobre el particular en: Acevedo et al., 2005; ACUMAR, 2011; Auge, 2004; Barsky, 2010; BID, 2012; Cicerone, 2005-2012; Defensor del Pueblo de la Nación, 2007; Di Pace, 2007; Fabricio de Ioro, 2007 y 2008; Giuffré et al., 2008; Kuczynski, 1993; Marbán, 2008; Malpartida, 1999; Morras, 2010; Ratto, 2010; Salibián, 2004; Salibián, 1986-2007 y Vullo, 2003.

Ahora bien, la absorción de metales pesados en las plantas se constituye como el primer paso de su entrada en la cadena alimenticia.

“Las plantas han desarrollado mecanismos altamente específicos para absorber, traslocar y acumular nutrientes, sin embargo algunos metales y metaloides no esenciales para los vegetales son absorbidos, traslocados y acumulados en la planta debido a que presentan un comportamiento electroquímico similar a los elementos nutritivos requeridos”. (Acevedo et al., 2005).

## **Fitorremediación con hortalizas de hojas**

Con la finalidad de ordenar las investigaciones que dan cuenta del uso de especies para remediar los suelos contaminados es que en primer lugar se abordará una experiencia en Hurlingham donde utilizando hortalizas de hoja se logró reducir la concentración de metales pesados en el suelo en una huerta agroecológica. Seguidamente se hará referencia a especies fitorremediadoras arbóreas y arbustivas con idéntica capacidad.

## **Huertas agroecológicas con seguimiento del INTA en sitios con compromiso ambiental**

### **Muestreos**

Desde el INTA, el “Programa nacional de hortalizas, flores y aromáticas” a través del Proyecto integrado “Desarrollo de tecnologías de procesos y gestión para la producción peri urbana de hortalizas” (PNHFA3 in Mitidieri 2006) y el Programa nacional “ProHuerta”; a inicios del año 2007 comenzaron a estudiar el estado de situación de las huertas del Área Metropolitana de Buenos Aires (en adelante AMBA).

En particular la autora de este trabajo participó como investigadora a lo largo de seis años en el proyecto nacional mencionado y como referente territorial del programa ProHuerta. En consecuencia, fue el nexo entre ambas propuestas para aplicar los resultados de la investigación del proyecto nacional en huertas que presentaban suelos contaminados.

En tal orden de ideas se buscó en el radio de influencia de las cuencas de los ríos Matanza-Riachuelo y Reconquista huertas que estuvieran ubicadas en lugares ambientalmente comprometidos para conocer en detalle su situación particular.

Como tarea preliminar, se preparó un taller para capacitar a los técnicos del ProHuerta que estarían alcanzados por el proyecto, de modo tal que se utilizaran los mismos criterios para la toma de muestras en cada huerta. Posteriormente se realizaron en las 27 huertas elegidas los siguientes estudios: análisis de agua (microbiológico, químico, hidrocarburos, metales pesados y nitritos y nitratos) y análisis de suelo (físico-químico, hidrocarburos, residuos de plaguicidas, metales pesados y nematodos). Según las siguientes pautas:

Para extraer muestras de agua de red se debe verificar que no haya pérdidas. Luego se procede, a una limpieza externa con cepillo y se deja correr un poco de agua. Se cierra el grifo y se lo flamea durante algunos minutos con un hisopo de algodón embebido en alcohol y encendido. Se abre nuevamente el grifo y se deja correr agua por varios minutos. Si se trata de conexiones de plástico se desinfecta la boca con alcohol isopropílico o alcohol al 70 % y se deja fluir el agua a chorro por varios minutos. Recoger la muestra con las precauciones de asepsia adecuadas. Si el agua proviene de un pozo, se acciona la bomba de extracción y se deja correr unos minutos antes de recoger la muestra. Si el pozo fuese nuevo o hace un tiempo que no se utiliza debe dejarse

correr el agua durante por lo menos dos horas y verificar la turbidez de esta para no cometer errores en las conclusiones.

Las pautas para el muestreo de suelos físico-químico, hidrocarburos, residuos de plaguicidas y metales: delimitarse áreas homogéneas (rotaciones y tipos de cultivo, años en que estuvo sometido el lote a cultivos). De cada lote seleccionado extraer una muestra compuesta de un mínimo de 40 submuestras extraídas en zigzag. Cantidad de suelo: 2,5 kg, profundidad: 0-20 cm (López. 2006).

En el caso de nemátodos: es recomendable extraer una muestra compuesta (MC) por unidad de superficie, la cual corresponde a la suma de una cantidad determinada de muestras simples (Ms). Las Ms se tomarán al azar o en forma sistemática (zigzag, guarda griega) con un muestreador desde 0 a 20 cm de profundidad (Chaves, 2006).

## **Resultados y discusión**

Los resultados que se obtuvieron en relación con el agua fueron los siguientes:

De las 27 huertas muestreadas, el 60 % la obtiene de pozo (16 huertas), el 40 % restante tiene agua de red (11 huertas). En las huertas donde el abastecimiento del agua es de pozo surgió: el 81 % tenía contaminación microbiológica y en varios casos al mismo tiempo; el 69 % además tenía presencia de nitratos.

Del universo de las huertas que tenían agua de red (el 40 %) se concluyó que: en el 9 % había nitratos; en el 27 % contaminación microbiológica y en el 64 % de los casos el agua era segura (Zumalave Rey, 2015).

Los resultados que se obtuvieron en relación con el suelo fueron los siguientes:

El análisis físico-químico indicó que en casi la totalidad de las huertas tenían el suelo clasificado como normal (96,3 %).

En todas las huertas estudiadas se encontraron nematodos. Si bien estos son altamente dañinos para los cultivos hortícolas (Zelaya *et al.*,2013), en aquellos casos donde hay un gran componente de materia orgánica disminuye la densidad de estos. Quizás sea esta la razón para explicar que en todas las huertas analizadas cosecharon las hortalizas que cultivaron sin que presentaran daños estructurales y con buen valor nutricional.

Otro de los análisis realizados fue sobre metales pesados. Cabe señalar que los valores hallados se encontraron en algunos casos 3 veces por sobre los parámetros guías establecidos en la

legislación argentina. Si se considera la holandesa, supera para algún metal 20 veces el máximo admisible de aquella (ibídem).

A la luz de los resultados obtenidos, la huerta de Hurlingham demostró tener cromo, cadmio y zinc. En la siguiente figura puede verse la muestra bajo la doble denominación A-ME-1/ M106 (ibídem).

Identificación de la Muestra	Cs	Cd(T)	Cr(T)	Cu(T)	Ni(T)	Pb(T)	Zn(T)
	d <sub>2</sub>	A.R. o	A.R. o	A.R. o	A.R. o	A.R. o	A.R. o
	W.Black	HF	HF	HF	HF	HF	HF
		ICP	ICP	ICP	ICP	ICP	ICP
	g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
A-ME-1-M106		5.6 R	2230.0 R	206.5 R	18.6 R	218.6 R	423.0 R

**Figura 1.** Metales pesados hallados en la huerta de Hurlingham.

Fuente: Marbán (2007).

Complementariamente a los exámenes se realizaron entrevistas semiestructuradas a los referentes de cada huerta muestreada con el objetivo de conocer las características ambientales del entorno para saber si era posible vincularlas con el estado de salud de las personas que trabajaban y se alimentaban de esas huertas. Se logró conocer algunas dolencias:

De las 27 huertas respondieron 20 entrevistados (74 %). De este universo, en 11 huertas había algún tipo de afección (55 %), mientras que en el 45 % restante no había problemas de salud conocidos por el referente. Estaban asociadas a la piel 91 %; vías respiratorias 36.3 %; cáncer 9 % y otros 27.2 %; mientras que no conocían afecciones 45 % (ibídem).

Otro tema estudiado y plasmado en aquellas entrevistas semiestructuradas –mencionadas previamente– apuntaban a poder conocer qué prácticas agroecológicas se implementaban en dichas huertas. De los testimonios recabados se obtuvieron los siguientes datos:

En relación con las prácticas agroecológicas, de las 27 entrevistas, 25 respondieron que utilizan abonero (84 %), lombricompost (16 %) o ambos y no usaban nada (16 %). (Ibídem).



Teniendo en cuenta que estos metales se hallaban en altas proporciones con el consiguiente daño potencial que represan para la salud, y para conocer detalladamente los sitios en donde podría haber mayores concentraciones de metales se hizo un nuevo análisis del suelo.

Ese muestreo se hizo en forma de cuadrícula para delimitar las zonas “calientes” con metales pesados para, posteriormente, elegir un lugar apropiado y ensayar allí con lechuga y tomate.

En la siguiente figura puede apreciarse un resumen de los puntos “calientes” y los valores hallados y los valores guía, como valores de referencia, establecidos por la Ley Nacional 24051 y su Decreto Reglamentario 831/93.

**Cuadro 1.** Resumen de las muestras de suelo contaminadas.

Ubicación de las muestras tomadas	Cadmio (Cd) (Valor de ref. 3 ppm)	Cromo (Cr) (Valor de ref. 750 ppm )	Cobre (Cu) (Valor de ref. 150 ppm)	Zinc (Zn) (Valor de ref. 600 ppm)
Punto N.º 5	5,5	1657	136,8	
Punto N.º 6	5,7	1826	148,4	
Punto N.º 7	5,9	1757	160,9	
Punto N.º 8	6,9	1954	147,2	605,3
Punto N.º 9	4,2	1541		
Punto N.º 10	5,9	1828	147,7	
Fuente: elaboración propia con datos de Marbán (2008).				

### Resultados del segundo muestreo y la comunidad

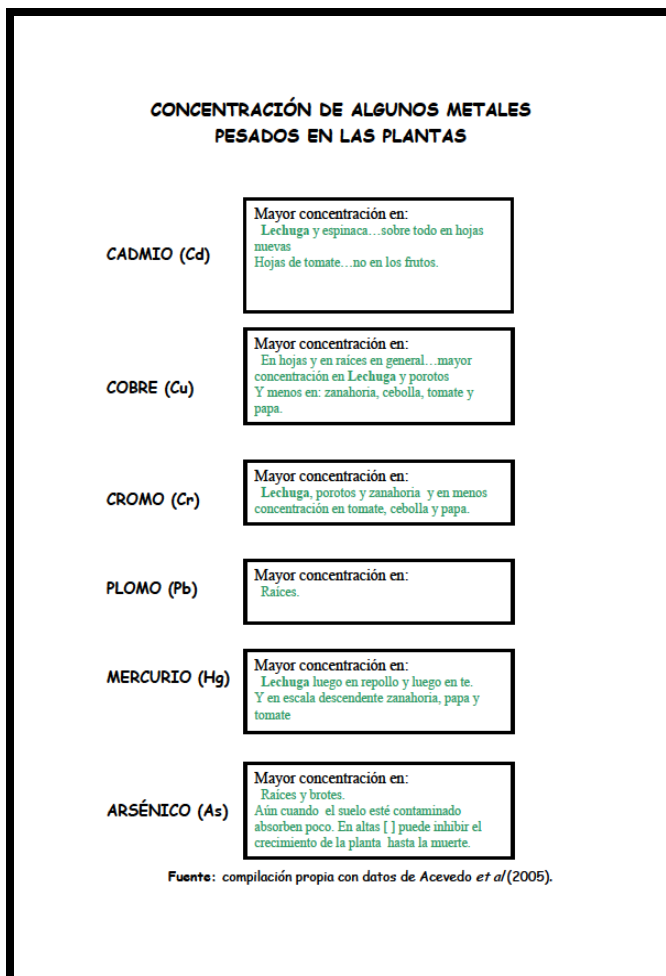
Los resultados del segundo muestreo indicaron con precisión los lugares que ostentaban mayor contaminación. A partir de esto, se decidió generar una reunión con la comunidad para explicarles la situación, ya que muchas familias se alimentaban de aquella huerta.

La referente propuso que la reunión fuese en una escuela cercana. A la cual también asistieron los integrantes de la huerta agroecológica y vecinos que vivían en las inmediaciones.

Se preparó un pequeño informe para cada asistente. En él se explicaba el daño que ocasionaban los metales pesados en el suelo; la vida media de cada uno; las vías de eliminación y las formas de remediación posibles. En forma complementaria se confeccionó un cuadro en el cual figuraban las partes de las hortalizas que tienen más capacidad para acumular metales.

Luego de conversar acerca del daño que podían ocasionar los metales pesados en relación con la salud humana y las consecuencias potenciales, los asistentes estuvieron de acuerdo en que esas hortalizas no podían ser consumidas. A consecuencia de lo ocurrido y con la anuencia de la comunidad se decidió momentáneamente o hasta que se encontrara una solución adecuada

clausurar la huerta. La figura que se observa a continuación es parte del material que se le entregó a cada miembro de la comunidad.



**Figura 2.** Los metales pesados en las plantas. Fuente: compilación propia con datos de Acevedo *et al.*, 2005.

### Con el suelo de Hurlingham a la huerta experimental de FAUBA

Como siguiente paso se llevaron a la huerta experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA) muestras de suelo para realizar diferentes ensayos. Las líneas de investigación estuvieron a cargo de Ernesto Giardina y participaron tesis de esa facultad con la finalidad de estudiar la aptitud agronómica del suelo contaminado.

En una de las investigaciones concluyeron que: el contenido de Cu, Pb y Cr en el sustrato disminuyó a medida que aumentó la proporción de compost en este. Para Ni y Zn sucedió algo similar. La dosis de compost más adecuada según el ensayo para obtener los mayores valores de los parámetros de calidad es de 25 % de compost (Muzlera Klappenbach, 2011).

## **Comienzo de la remediación de la huerta agroecológica de Hurlingham**

En una visita a la huerta, con la finalidad de realizar nuevos muestreos, la referente reveló que la comunidad en su conjunto deseaba “hacer algo para limpiar el suelo”. Por ese motivo estudiaron el material informativo que se les entregó en la última reunión –donde se decidió la clausura de la huerta– que consideraba desde la acumulación de metales pesados en las distintas partes de la planta, vida media, vías de eliminación hasta las formas de remediación posibles y, decidieron vivenciar su propia experiencia.

Resolvieron sembrar, desde el año 2009, aquellas hortalizas que concentraban más contaminantes para luego de finalizado el ciclo cosecharlas y descartarlas y comenzar uno nuevo. Respetaron la rutina de las asociaciones, la rotación, el uso de los abonos, las prácticas culturales y la presencia de flores y aromáticas para el control biológico de plagas, una huerta ideal si no fuera por la salvedad de la peligrosidad que contenían esos cultivos. Adicionalmente hicieron una campaña con los vecinos linderos y todo el barrio en general para ponerlos en conocimiento de que esa tierra estaba siendo “sanada” (término utilizado por los huerteros para identificar el proceso que podrían realizar las hortalizas) y que nada de lo sembrado podía ser consumido. La comunidad se comprometió y allí donde el alimento era escaso, esa actividad tuvo un valor agregado. Desde lo social y lo ambiental esa huerta les dio un motivo, un objetivo y una determinación grupal.

Esa circunstancia propició que se buscara una solución inmediata para los integrantes de esta. Se decidió entonces, implementar como estrategia organoponía.

## **Implementación de alternativas tecnológicas**

Hacia marzo del 2011 se inició una investigación sobre diferentes estrategias y metodologías para aislar la contaminación superficial del suelo de la huerta.

Entre las cuales se estudiaron aquellas usadas específicamente para suelos contaminados con petróleo. A partir de esa investigación surgió la línea de acción que se implementaría en la huerta agroecológica; la utilización de geomembranas.

Este producto nunca se había empleado para la horticultura y no se conocía en el mundo experiencia similar que hubiera sido documentada. Este argumento y el hecho de que podría ser modelo piloto para aislar suelos contaminados y transformarlos en productivos en un futuro cercano fue, sin duda, la llave para seguir adelante con la gestión y aplicar esta tecnología.

Hacia fines de 2011 en una jornada de trabajo comunitario se llevó a cabo la primera etapa de la colocación de la geomembrana comenzando por la zona donde se encontró mayor contaminación. Entre quince personas se removieron las especies cultivadas en el predio para posteriormente disponer –a modo de manto– la geomembrana, y por encima alzar un cantero realizado en

material de siloplástico con el sustrato ensayado por Valenzuela para implantar luego, tomates de la EEA INTA San Pedro y hortalizas que fueron preparadas para tal fin.

Los miembros de la huerta comunitaria participaron activamente tomando nota, preguntando y observando cómo había que colocar la geomembrana, la manera de demarcar la pendiente para evitar encharcamientos y como construir el cantero elevado de siloplástico que albergaría el sustrato organopónico y las diferentes especies vegetales.

En los próximos seis meses se continuó trabajando para completar los 400 metros cuadrados que conformaba el área contaminada de la huerta y de esa manera lograr la sustentabilidad del emprendimiento socio-productivo sin riesgo para la salud humana. En la siguiente secuencia fotográfica puede apreciarse como a mediados de 2012 quedó concluido el proceso de la colocación de la geomembrana y la implantación de cultivos hortícolas en sustratos organopónicos.



**Figura 3.** Vistas del proceso de aislación del suelo contaminado con la geomembrana.

Fuente: trabajo de campo.

### **Resultados e identificación de los hallazgos**

Como resultado, se implementó la siguiente estrategia tecnológica: geomembranas, sustratos organopónicos y canteros elevados de siloplástico en 400 metros cuadrados. De esa manera se logró la sustentabilidad del emprendimiento socio-productivo hortícola sin riesgo para la salud humana.

Simultáneamente, los análisis efectuados al suelo luego de tres años de ser cultivado y cosechado a la finalización del ciclo de las hortalizas de hoja, principalmente con lechuga (*Lactuca sativa*) en forma consecutiva dieron como resultado la disminución en la concentración de metales pesados del suelo de la huerta como puede observarse en la siguiente figura.

LABORATORIO AGROAMBIENTAL		INFORME DE ENSAYOS QUIMICOS ESPECIALES																			
Nombre		INTA-FAUBA HUERTA										N° Informe		29/07/11		Fecha de Analisis		Fósforo Olsen			
Institucion												<input type="radio"/> Final <input type="radio"/> Parcial		<input type="radio"/> LM <input type="radio"/> AB							
Fecha de Recepción de la Muestra		25/07/11										Desde N° de Muestra		43250		Hasta N° de Muestra		43251			
N° de Muestra	Identificación de la Muestra	Cs		Ndd		P		P(IT105.1)		B	Micronutrientes				Contaminantes						
		g/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg		mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg			
43250	INTA-FAUBA HUERTA															4.4	1825	140.5	14.3	221.0	459.6
43251	INTA-FAUBA HUERTA															4.5	1852	144.0	13.9	197.8	493.8

**Figura 4.** Informe de metales pesados para fines de 2011. Fuente: Marbán, 2012.

Cabe señalar que posteriormente, al revisar la bibliografía científica –de habla hispana– se comprobó que una experiencia de similares características se había realizado en la cuenca alta del río Bogotá, Colombia, en donde se utilizó lechuga como especie fitorremediadora dando como resultado la disminución del cadmio y del cromo en el suelo del lugar a partir del cultivo sistemático de ray-grass y lechuga (Lora Silva y Bonilla Gutiérrez, 2010).

A partir de este descubrimiento se podrá transferir la experiencia recogida y aplicarla en extensas áreas del AMBA. Bastará con cultivar lechuga para remediar el suelo, por ser una especie rústica, de fácil cultivo, de bajo mantenimiento, que se adapta a diferentes temperaturas y es proclive a pocas enfermedades en otros sitios que presenten condiciones de contaminación similar al que se estudió en este trabajo.

El siguiente descubrimiento fue el utilizar geomembranas y disponer de un sustrato especial, concebido para la huerta estudiada, y generar así cultivos sin contacto con el suelo contaminado, conocidos como organoponia. Como innovación tecnológica en sí misma, la organoponia responde a la necesidad de la AUPU al cultivar suelos en áreas en las cuales no se cuenta con un suelo fértil o no es posible utilizarlo. Un claro ejemplo de esta estrategia la ostenta la agricultura en La Habana, Cuba, desde hace varios años. En relación con la geomembrana, cabe destacar que nunca se había empleado para la horticultura y no se conocía en el mundo experiencia similar que hubiera sido documentada.

Otro de los descubrimientos es el referido al ensayo que hicieron en la Facultad de Agronomía de Buenos Aires con el suelo de la huerta contaminada adicionando compost para crear un sustrato que pudiese retener los contaminantes encontrados. Como corolario se obtuvo que la dosis de compost más adecuada para obtener los mayores valores de los parámetros de calidad fuera del 25 % de compost.

Las repercusiones que este hallazgo tendrá para la AUPU están íntimamente relacionadas con las prácticas fundacionales del enfoque agroecológico. Con los resultados a la vista, el INTA podrá fomentar, aún más, el uso del abonero porque además de la función de enriquecer los cultivos y fortalecer las defensas inmunológicas de las especies hortícolas, colaborarán en gran medida, utilizando el porcentaje preciso, a contrarrestar los efectos de la contaminación del suelo con metales pesados.

Además, es posible en una parcela, combinar algunos o todos los descubrimientos descriptos, lechuga, geomembrana, 25 % de compost y organoponia para remediar suelos de manera más rápida y producir hortalizas en áreas urbanas y periurbanas de forma segura y transformar, finalmente, en productivos suelos degradados.

En este sentido, a fines de 2014 productores del Valle de Río Negro ya han consultado la viabilidad de aplicar estas tecnologías en su provincia.

Complementariamente se desarrolló un Plan de Gestión con el objeto de fortalecer institucionalmente la AUPU en el marco del desarrollo sustentable, a partir de la experiencia desarrollada en la huerta agroecológica de Hurlingham. Las ideas rectoras, estrategias, líneas de acción y actividades desarrolladas conforman un modelo tecnológico posible.

Entre las estrategias se hallan: promover el ordenamiento territorial en el partido para la utilización de baldíos en las áreas mixtas (industrial y residencial de baja densidad) dentro de industrias abandonadas, sobre basurales consolidados y en la ribera de los cuerpos de agua; crear parques agrarios o cordones productivos para aprovechar suelos disponibles y degradados desarrollando en ellos la AUPU.

Entre las líneas de acción se pueden mencionar: articular entre diferentes dependencias municipales y llevar adelante políticas que favorezcan el acceso a la tierra de la población de bajos ingresos para desarrollar allí parques agrarios o cordones productivos; promover tecnologías apropiadas en los suelos degradados para conseguir espacios de calidad ambiental integrados al territorio y en armonía con el medio natural.

La organización de la propuesta se halla estructurada a partir de programas. Entre los que se hallan: implementación del ordenamiento territorial; generación de cooperativas sociales y oficialización de organizaciones conformadas; creación y desarrollo de parques agrarios o cordones productivos; comercialización de cadenas cortas e implementación de ferias francas y programa de capacitación.

## **Agradecimientos**

A los huerteros que participaron a lo largo de seis años en este proyecto, por la inmensa labor que realizaron silenciosamente cada día con el sol en la espalda: Mónica Tapia, Ana María Choque, Nélide Peralta, Isabel González, Elizabeth Denis, Filomena Flores, Juan Morales, Ezequiel Castillo, Alejandra Cóceres, Alan Paz, Susana Suarez, Josefina Juárez, Miguel Castillo,

Eduardo Cuello, Flores Vilca, Ana Jaime, Nicasio Meljarejo, Claudia Pérez, René Rodríguez Cossio y Yanina Valdez.

## Otras investigaciones

La Universidad de Extremadura al investigar la gestión y la conservación del suelo manifiesta que la presencia de plantas hiperacumuladoras puede permitir su aprovechamiento para la depuración del suelo, eliminándolas sin consumo (Universidad de Extremadura, 2008).

La absorción de los llamados metales pesados por plantas y hongos del suelo difiere de unas especies a otras, marcando un nivel o grado de acumulación en estos, como se aprecia en la siguiente figura.

Tipo	Plantas	Hongos
Muy intensa	Cd	Hg
Intensa	--	Cd, Be, Cu
Media	Zn, Mo, Hg, Cu, Pb, As, Co	Zn
Ligera	Mo, Ni, Cr	As, Mn
Nula	Be, Fe	--

**Figura 5.** Grado de acumulación de metales pesados en diferentes tipos de plantas y hongos. Fuente: Universidad de Extremadura, 2008.

### Capacidad de las plantas frente a los metales pesados

La capacidad de las plantas para bioacumular metales y otros posibles contaminantes varía según la especie vegetal y la naturaleza de los contaminantes. “[...] el comportamiento de la planta frente a los metales pesados depende de cada metal [...]”. (Acevedo *et al.*, 2005). Parte del trabajo que realizó el Ministerio de Agricultura de Chile se presenta a continuación.

#### Cromo:

La toxicidad aguda o crónica por cromo es causada principalmente por los compuestos de CrVI, que es el más biodisponible para las plantas en el suelo. Los cambios en el pH y los exudados radicales pueden influir en los estados de oxidación del cromo aumentando o disminuyendo la biodisponibilidad. Aumenta su solubilidad por debajo de los 5,5 pH y por encima de los 8,5 pH.

Generalmente se observa un mayor contenido de Cr en raíces que en tallos y hojas, y la más baja concentración se halla en granos.

**Cobre:**

Los iones de cobre (Cu) presentan una alta afinidad para formar complejos con la materia orgánica. El rango de mayor biodisponibilidad del Cu oscila desde 4,5 a 7 pH. La movilidad del Cu dependerá del nivel de Cu en el sustrato.

Posee escasa movilidad en la planta permaneciendo mayor concentración en los tejidos de las raíces y hojas y menos en los granos.

**Cadmio:**

Es un metal muy soluble y peligroso debido a su alta movilidad y a que en pequeñas concentraciones tiene efectos nocivos en las plantas. Se ha observado que las plantas de lechuga traslocan más cadmio (Cd) a hojas y tallos que otros cultivos.

Las hojas nuevas de lechuga y espinaca tienen mayor acumulación que en las hojas viejas.

En los frutos se hallan valores no detectables.

El Cd inhibe la absorción del hierro.

**Mercurio:**

La acumulación de mercurio (Hg) en el suelo se encuentra controlada principalmente por la formación de complejos orgánicos y por la precipitación.

La absorción del Hg desde el suelo es baja constituyéndose en una barrera para la traslocación desde las raíces a las partes aéreas de la planta.

Es decir, altas concentraciones en suelo de Hg da como efecto concentraciones moderadas de Hg en hojas.

El Hg aéreo transportado contribuye al contenido de ese metal en los cultivos y por esta razón al consumo humano y animal.

Una parte del Hg atmosférico es absorbido directamente por las hojas de las plantas.

**Plomo:**

La solubilidad del plomo (Pb) varía en los horizontes superficiales. La acidez creciente del suelo puede aumentar la solubilidad del Pb, pero su movilidad es más lenta que su acumulación en las capas del suelo ricas en materia orgánica.

La localización del Pb cerca de la superficie del suelo está en relación con la acumulación superficial de materia orgánica.

En las plantas el Pb se acumula principalmente en las raíces siendo mínima su presencia en las estructuras reproductivas.

En general, se puede establecer que los metales más tóxicos tanto para las plantas superiores como para ciertos microorganismos son: Hg, Cu, Pb, Co, Cd y posiblemente Ag, Be, Sn. (Acevedo et al., 2005).



## Especies hortícolas fitorremediadoras

La Knox Park Foundation ha plantado un huerto de hojas con el fin de extraer el plomo del suelo de un solar abandonado donde antes había un almacén de pinturas. También se plantó *Brassica juncea* (mostaza india); una planta muy efectiva en la absorción de plomo (Assadourian, 2003).

También se conoce un trabajo realizado con *Lactuca sativa* (lechuga) en la cuenca alta del río Bogotá contaminado con los metales pesados cadmio y cromo, como precedente, donde se logró disminuir significativamente la concentración de dichos metales pesados a partir del cultivo sistemático de ray-grass y lechuga (Lora Silva y Bonilla Gutiérrez, 2010).

Asimismo, hay investigaciones que describen la manera en que las plantas a través de mecanismos como la absorción pueden remediar el suelo reteniendo o acumulando metales pesados.

Al respecto Acevedo *et al.* (2005) explican que las plantas son mucho más resistentes a los incrementos en la concentración de metales que una insuficiencia de un elemento esencial dado. En el siguiente cuadro se aprecian las plantas acumuladoras de metales pesados.

Metales	Alta acumulación	Baja acumulación
<b>Cd</b>	Lechuga, espinaca, apio, repollo	Papa, maíz, habas
<b>Cu</b>	Cebada, remolacha	Puerro, repollo, cebolla
<b>Pb</b>	Berro, apio	Cebada, papa, maíz
<b>Zn</b>	Espinaca, remolacha	Papas, puerros, tomate, cebolla,

**Figura 6.** Plantas acumuladoras de metales pesados. Fuente: (modificado de Alloway 1995) en Acevedo *et al.*, 2005.

## Especies potencialmente fitorremediadoras

En las investigaciones de Ortega-Ortiz *et al* (2009) abordan el estudio de las plantas hiperacumuladoras:

algunas especies comunes que se han ensayado con éxito como potenciales fitorremediadoras son la alfalfa, la mostaza, el tomate, la calabaza, el esparto, el sauce y el bambú.

Incluso existen especies vegetales capaces de disminuir la alta salinidad en la capa superficial del suelo, gracias a su capacidad para acumular el cloruro de sodio (Wangensteen, 2002). “[...] La hiperacumulación es un fenómeno raro y su base evolutiva es motivo de discusión desde su descubrimiento. Algunos estudios recientes sugieren que la acumulación inusual de metales confiere a estas plantas la capacidad de limitar el herbivorismo y la patógenesis [...]”. (Ortega-Ortiz *et al.*, 2009).

## Fitoextracción de metales pesados

Diez Lázaro, Kidd y Monterroso estudiaron la capacidad de las especies: *Cistus ladanifer*, *Lavandula stoechas* y *thymus masticina* para remediar suelos con Cr; Cd, Cu, Mn, Ni y Zn y encontraron que pueden ser consideradas para su uso en fitoextracción. Asimismo, también demostraron que cultivos de alta productividad (*Brasita*, *Helianthus*) pueden ser utilizados para fitoextracción de metales, ya que su elevada biomasa puede compensar su menor acumulación metálica (Diez Lázaro *et al.*, 2002).

Bidar *et al.* (2007) estudiaron el comportamiento de *Trifolium repens* y *Lolium perenne* e investigaron las concentraciones de Cd, Pb y Zn en las plantas y su fitotoxicidad.

Los comportamientos de *Trifolium repens* y *Lolium perenne*, que crecen en un campo contaminado con metales pesados, ubicado cerca de una fundición de plomo cerrado.

En estas especies de plantas, los metales se acumulan preferentemente en las raíces que en brotes, de la siguiente manera: Cd > Zn > Pb.

La exposición de las plantas a dichos metales inducida por el estrés oxidativo en los órganos considerados como revelan las variaciones en los niveles de malondialdehído y actividades superóxido dismutasa. Estos cambios oxidativos estaban estrechamente relacionados con los niveles de metales, especies de plantas y órganos.

En consecuencia, *L. perenne* parecía estar más afectado por el estrés oxidativo inducido por metales que *T.repens*. Tomados en conjunto, estos resultados nos permiten concluir que estas especies de plantas podrían ser adecuadas para la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados (Bidar *et al.*, 2007).

## Otras especies hiperacumuladoras

Unterbrunner *et al.* (2007) investigaron la acumulación de Zn y Cd en los tejidos de los árboles adultos y especies herbáceas asociadas recolectados en las zonas contaminadas de Europa central.

Encontraron una considerable acumulación de Cd y Zn en varios sauces, álamos y especies de abedul con un máximo de 116 mg Cd kg<sup>-1</sup> y 4680 mg Zn kg<sup>-1</sup> en hojas de *Salix caprea*.

La variación anual de concentraciones de Cd y Zn en hojas de *Salix caprea* era pequeña, lo que indica que los datos obtenidos en diferentes años se pueden comparar.

Las concentraciones de metales en hojas no estaban relacionados (agua regia o lábil (1 M NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub> concentraciones en suelo extracto)), pero los factores de acumulación (concentración de la hoja: concentración en el suelo) para el Cd y Zn siguieron una función de tipo de registro inverso.

Los resultados indican que los metales pesados entre los tejidos mostró un mínimo en la madera, con el aumento de las concentraciones de Cd y Zn hacia las hojas y las raíces finas (Unterbrunner *et al.*, 2007).

Asimismo, Díez Lázaro *et al.* también demostraron que especies arbóreas como *Salix* y *Populus* de crecimiento rápido pueden ser utilizados para fitoextracción de metales, ya que su elevada biomasa puede compensar su menor acumulación metálica (Díez Lázaro *et al.*, 2002).

## Consideraciones finales

Iniciando este capítulo se explicó que entre las diferentes fuentes de contaminación del suelo se encuentra aquella producida por los metales pesados resultado de la actividad antropogénica.

La importancia de su estudio y su consiguiente solución radica principalmente en la silenciosa exposición a la que está sometida la población en particular y en ambiente en general.

En este sentido, se ha descrito una experiencia a lo largo de seis años de estudios que da cuenta de resultados favorables en el control de este tipo de contaminación, logrando la disminución en la concentración de metales pesados del suelo de una huerta.

La estrategia tecnológica combinando el uso de geomembranas, sustratos organopónicos y canteros elevados de siloplástico han hecho posible la sustentabilidad del emprendimiento socio-productivo hortícola sin riesgo para la salud humana.

A partir de la experiencia en la huerta agroecológica de Hurlingham y las demás investigaciones volcadas en estas páginas será posible la extrapolación de esas prácticas a otros suelos que presenten características similares de contaminación.

Se puede afirmar que existe el sustento teórico y el despliegue de tecnologías apropiadas y disponibles para asegurar que es posible no solo cultivar en suelos contaminados, sino además

colaborar en la gestión de recuperación de suelos degradados a través de la mirada conjunta entre expertos, investigadores, la comunidad en su conjunto y los decisores locales.

## Bibliografía

- ACEVEDO, E., MERA M., SILVA P. Y ROUANET J.; 2005. Informe para los criterios de calidad de suelo agrícola. Santiago de Chile.
- ALTIERI, M. 1999. Agroecología. Bases científicas para una agricultura sustentable. Editorial Nordan-Comunidad, Montevideo.
- ASSADOURIAN, E. Los huertos urbanos. 2014. Washington: World Watch Institute: 30-37. Disponible: [www.worldwatch.org](http://www.worldwatch.org) Visitado el 14 de Agosto de 2016
- AUGE, M. 2004. Hidrogeología Ambiental I. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). Buenos Aires. Disponible: [www.sedici.unlp.edu.ar](http://www.sedici.unlp.edu.ar) 17 de agosto de 2016.
- AUTORIDAD DE CUENCA MATANZA-RIACHUELO & AGUAS Y SANEAMIENTO ARGENTINOS (ACUMAR-AYSA).2008. Estudio de Impacto Ambiental del Plan Director de Saneamiento. ACUMAR, Volumen II. Buenos Aires. Disponible: [www.aysa.com.ar](http://www.aysa.com.ar). Visitado el 19 de agosto de 2016.
- BANCO INTERAMERICANO DE DESARROLLO (BID).2012. Programa de Gestión Urbano Ambiental sostenible de la Cuenca del Río Reconquista. Buenos Aires. Disponible: [www.mosp.gba.gov.ar](http://www.mosp.gba.gov.ar). Visitado el 19 de agosto de 2016.
- BARSKY, A. 2010. Buenos Aires y su organización espacial. Caracterización de las situaciones ambientales asociadas a la dinámica de las cuencas hidrográficas que atraviesan un territorio metropolitano. Buenos Aires. Universidad Nacional de General Sarmiento. Disponible: <http://www.urbared.ungs.edu.ar>. Visitado el 20 de agosto el 2016.
- BIDAR, G.; GARÇON, G.; PRUVOT, C.; DEWAELE, D.; CAZIER, F.; DOUAY, F.; SHIRALI, P. 2007. Contaminación del Aire y Cambio Climático: Una visión global de los Efectos sobre la Vegetación Forestal. Comportamiento de *Trifolium repens* y *Lolium perenne* que crece en un campo contaminado por metales pesados: la concentración de metales en las plantas y fitotoxicidad. Publicación científica Contaminación Ambiental. Volumen 147, Issue 3, ScienceDirect. pp. 546-553. Disponible: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.013>
- CICERONE, D. 2005. Gestión Regional de la Contaminación de Cuerpos de Agua Superficiales Contaminados con Metales Mejorada. Mejora de la gestión de las masas de agua que están contaminadas con metales. Disponible: [www.argentinainvestiga.edu.ar](http://www.argentinainvestiga.edu.ar) . Visitado el 2 de septiembre de 2016.
- DEFENSOR DEL PUEBLO DE LA NACIÓN. 2007. Informe especial cuenca del río Reconquista. Primera parte. Fundación Ambiente y Recursos Naturales. Buenos Aires. Disponible: [www.farn.org.ar](http://www.farn.org.ar). Visitado el 10 de septiembre de 2016.
- DIEZ LÁZARO, J.; KIDD, P.; MONTERROSO, C. 2002. Biodisponibilidad de Metales en Suelos y Acumulación en Plantas en el Área de Trás-Os-Montes (Ne Portugal): Influencia del Material Original. Revista del Departamento de Edafología e Química Agrícola. Volumen 9:313-328. Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela. Disponible: [edafologia.ugr.es/Revista/tomo9c/pag313.pdf](http://edafologia.ugr.es/Revista/tomo9c/pag313.pdf).- 12 de septiembre de 2016.

DI PACE, M. 2007. Anales de la educación común. Educación y ambiente. Situación ambiental y sustentabilidad en el Área Metropolitana de Buenos Aires. Buenos Aires, Publicación de la Dirección General de Cultura y Educación de la Provincia de Buenos Aires. Tercer siglo, año 3, número 8. Disponible: [www.servicios2.abc.gov.ar](http://www.servicios2.abc.gov.ar).- Visitado el 12 de septiembre de 2016.

FABRIZIO DE IORO, A. 2007. Para remediar al Matanza-Riachuelo. Buenos Aires: Agronomía Informa. Disponible: [www.agro.uba.ar](http://www.agro.uba.ar) .- Visitado el 12 de septiembre de 2016..

FABRIZIO DE IORO, A. 2008. Agrosistemas: Impacto Ambiental y Sustentabilidad, Metales pesados en las aguas del Riachuelo. Editorial Lidia Giufré. Buenos Aires. p. 493 .

GIACCIO, G. 2002. La Agroecología y su aporte a la conservación de los recursos naturales. Ediciones INTA. Buenos Aires.

GIUFFRÉ, L.; RATTO, S.; ROMANIUK, R. 2008. Indicadores Ambientales. Agrosistemas: impacto ambiental y sustentabilidad. Buenos Aires. p. 493.

GÓMEZ OREA, D. 1999. Evaluación del Impacto Ambiental. Editorial Agrícola Española, Madrid.

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA (INTA). 2006. Programa Nacional Hortalizas, Flores y Aromáticas. Proyecto Integrado: Desarrollo de tecnologías de procesos y gestión para la producción periurbana de hortalizas (PNHFA3). Disponible:[www.inta.gob.ar](http://www.inta.gob.ar) .- Visitado el 12 de septiembre de 2016.

KUCZYNSKI, D. 1994. Estudio ambiental de un curso de agua urbano altamente deteriorado por acción antropógena. Revista de Ecología Médica y Salud Ambiental, I (4). 1-14. Buenos Aires.

LAVADO, R.; ZUBILLAGA, M. 2008. Efecto Ambiental de la Actividad Industrial, la Vida Urbana y la Producción Agropecuaria. Agrosistemas: impacto ambiental y sustentabilidad. Buenos Aires. p. 493.

LORA SILVA, R.; BONILLA GUTIÉRREZ, H. 2010. Remediación de un suelo de la cuenca alta del Río Bogotá contaminado con metales pesados cadmio y cromo. Revista U.D.C.A: Actualidad & Divulgación Científica, número 13. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Bogotá. pp. 61-70. Disponible: [www.udca.edu.co](http://www.udca.edu.co). Visitado el 19 de septiembre de 2016.

MALPARTIDA, A. 1999. Informes Especiales, La cuenca del Río Matanza-Riachuelo. Universidad Tecnológica Nacional y Multimedia Ambiente Ecológico. Buenos Aires. Disponible: [www.ambiente-ecologico.com](http://www.ambiente-ecologico.com) Visitado el 19 de septiembre de 2016.

MARBÁN, L. 2008. Metales pesados: evaluación dirigida a la exposición urbana. Seminario del Proyecto Integrado: Desarrollo de tecnologías de procesos y gestión para la producción periurbana de hortalizas (PNHFA3) 2006-2012. Una reflexión sobre el periurbano hortícola. Buenos Aires, Argentina.

MITIDIERI, M. 2006. Proyecto Integrado: La agricultura urbana y periurbana. Desarrollo de tecnologías de procesos y gestión para la producción periurbana de hortalizas. Ediciones INTA. Buenos Aires.

MORRAS, H. 2010. Ambiente físico del Área Metropolitana. Buenos Aires. Ediciones INTA. Buenos Aires. Disponible: el [19 de septiembre de 2016](#).

MUZLERA KLAPPENBACH, A. 2011. Absorción de Metales pesados en Lechuga Morada (*Lactuca sativa* L. variedad Morada) cultivada en macetas con diferentes dosis de compost. Tesis de grado para la obtención del título de Ingeniera agrónoma: .

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA (FAO). 2013. Agricultura urbana y periurbana en América Latina y el Caribe: Una realidad. Adaptándose al cambio. Roma: FAO. Disponible: <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/aup> Visitado el [19 de septiembre de 2016](#).

- ORTEGA-ORTIZ, H.; BENAVIDES-MENDOZA, A.; ARTEAGA ALONSO, R.; ZERMEÑO-GONZÁLEZ, A. 2009. Fitorremediación de Suelos Contaminados con Metales Pesados. Temas Modernos de Nutrición Vegetal. Publicación del Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Texcoco, México. pp. 124-147. Disponible: [http://abenmen.com/a/Nutricion\\_Vegetal-4.pdf](http://abenmen.com/a/Nutricion_Vegetal-4.pdf). Visitado el 19 de septiembre de 2016.
- RATTO, S. 2010. Usos del suelo. Contaminación. Atlas Ambiental de Buenos Aires. Buenos Aires. Disponible: [www.atlasdebuenosaires.gov.ar](http://www.atlasdebuenosaires.gov.ar). Visitado el 19 de septiembre de 2016.
- REAL ACADEMIA ESPAÑOLA. 2010. Ortografía de la lengua española. Madrid. Espasa.
- SALIBIÁN, A. 2004. Ecotoxicological assessment of the highly polluted Reconquista River of Argentina. Rev. Environ Contaminación toxicológica 185:35-65.
- SALIBIÁN, A. 2007. Evaluación ecotoxicológica del Río Reconquista. Contribuciones científicas, período 1986-2007. Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de Luján, Luján.
- TITO, G. 2014. Producción de alimentos de forma agroecológica. INTA. Disponible: [www.ms.gba.gov.ar/sitios/alimentos/files/2014/.../6-Dr.-Gustavo-Tito.pdf](http://www.ms.gba.gov.ar/sitios/alimentos/files/2014/.../6-Dr.-Gustavo-Tito.pdf). Visitado el 19 de septiembre de 2016.
- Unterbrunner, R.; Puschenreiter, M.; Sommer, P.; Wieshammer, G.; Tlustoš, P.; Zupan, M.; Wenzel, W. 2007. La acumulación de metales pesados en los árboles que crecen en sitios contaminados en Europa central. Contaminación Ambiental, volumen 148, número 1, pp. 107-114. Disponible: [dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.035](http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2006.10.035)
- VALENZUELA, O. 2005. Los sustratos: aspectos generales. Propiedades físicas y químicas de los materiales más utilizados en la producción de plantas en contenedores de Argentina. Seminario Internacional Preparación y manejo de sustratos en plantas ornamentales y florales. 24 al 26 de noviembre de 2005, Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- VULLO, D. 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. Química Viva, volumen 2, número 3. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). Buenos Aires. Disponible: [www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar) Visitado el 19 de septiembre de 2016.
- ZELAYA, E.; PALACIOS, P.; PERALTA, S. 2013. Nematodos en la huerta familiar. Publicaciones INTA. Disponible: [www.inta.gob.ar](http://www.inta.gob.ar) Visitado el 19 de septiembre de 2016.
- Zumalave Rey, B. 2015. Gestión de la Agricultura Urbana y Periurbana para el Desarrollo Sustentable. Un estudio de caso: Posibilidades de producción urbana de hortalizas en huerta agroecológica de Hurlingham con el suelo contaminado. UNSAM.

## CAPÍTULO 20

### **Rol de la simbiosis micorrízico arbuscular y de las enmiendas orgánicas en la tolerancia a elementos tóxicos: su aporte en la remediación de suelos contaminados**

Catalina Vidal<sup>1</sup>, Sebastián Meier<sup>1</sup>, Susana García<sup>1</sup>, Jorge Medina<sup>1</sup>, Gustavo Curaqueo<sup>1,2</sup>, Lourdes Gil-Cardesa<sup>3</sup>, Paula Aguilera<sup>1</sup>, Fernando Borie<sup>1</sup> y Pablo Cornejo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales, Scientific and Technological Bioresource Nucleus, BIOREN-UFRO. Universidad de La Frontera. Avda. Francisco Salazar 01145, Temuco, Chile.

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales. Universidad de La Frontera. Avda. Francisco Salazar 01145, Temuco, Chile.

<sup>3</sup>Laboratorio de Biodiversidad Vegetal y Microbiana, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, C.C. 14 (S2123ZAA) Zavalla, Santa Fe, Argentina.

E-mail: pablo.cornejo@ufrontera.cl

### **Bases biológicas de la simbiosis micorrízico arbuscular**

La simbiosis micorrízico arbuscular (MA) es una interacción mutualista establecida entre la raíz de una planta y hongos del suelo pertenecientes al phylum Glomeromycota. Esta es la simbiosis terrestre más extendida, existe en aproximadamente el 80 % de las plantas terrestres. Los hongos MA presentan una biotrofia obligada, por lo que dependen completamente de la asociación con la raíz para completar su ciclo de vida, formando propágulos viables (Smith y Read, 2008). El proceso de colonización comienza en las células del córtex, desde donde las hifas generadas por un propágulo del hongo se extienden inter e intracelularmente por la raíz. En el interior de la célula radical las hifas se dividen dicotómicamente y establecen un contacto íntimo con la membrana plasmática de la célula radical, donde ambas forman una matriz interfacial, generando la estructura típica de esta simbiosis, el arbusculo (Barea *et al.*, 2005). Es en el arbusculo donde se produce el intercambio bidireccional de nutrientes y agua desde el hongo a la planta, y de compuestos carbonados en el sentido inverso. Por su parte, las hifas extrarradicales cumplen funciones múltiples, ya que además de absorber nutrientes y transportarlos a las células de la raíz desde lugares inaccesibles a ella, son capaces de conglomerar o agrupar partículas del suelo, favoreciendo la formación de agregados y potenciando así una mayor estabilidad de la estructura edáfica (Curaqueo *et al.*, 2011). Finalmente, los hongos MA generan esporas de resistencia las que, junto con el micelio fúngico activo en el suelo, constituyen los principales propágulos que proseguirán el ciclo de colonización en una nueva raíz (Cornejo, 2006).

Es igualmente destacable el que los hongos MA favorecen el establecimiento de otros microorganismos en el suelo beneficiosos para el crecimiento vegetal, como i) bacterias fijadoras de N<sub>2</sub>, ii) bacterias promotoras del crecimiento vegetal y iii) microorganismos de vida libre solubilizadores de fosfatos, entre otros (Barea *et al.*, 2005). Este aspecto es muy importante, ya que la disminución o desaparición de propágulos *rizosféricos* es un fenómeno que se registra en la totalidad de los suelos degradados y contaminados (Requena *et al.*, 2001; Meier *et al.*, 2012a). Por lo tanto, el contar con los beneficios de la simbiosis MA bajo estas condiciones resulta clave para promover no solo el establecimiento y crecimiento de plantas, sino también de otros grupos microbianos beneficiosos, convirtiéndose así una planta micorrizada en una potencial isla de recursos (Medina *et al.*, 2015a).

### **Micorriza arbuscular y establecimiento vegetal en suelos contaminados**

La remediación de suelos contaminados por metales es a menudo un proceso complejo y costoso. Sin embargo, durante el último tiempo se han desarrollado un amplio número de estrategias entre las que se incluyen procesos físicos, químicos y biológicos (Meier *et al.*, 2012a) con el fin de remediar el daño (pérdida de cobertura vegetal, biomasa, diversidad y carbono, entre otros) causado por la presencia de elementos potencialmente tóxicos (EPT) en diversos ambientes (Ciccu *et al.*, 2003). Dentro de las alternativas disponibles actualmente, existe un gran interés por el uso distintos organismos (biorremediación) como plantas y sus microorganismos asociados con el fin de rehabilitar y recuperar los suelos contaminados. En este sentido, procesos que utilizan plantas y que en forma genérica reciben el nombre de fitorremediación (Pilon-Smits, 2005) se vislumbran como una opción atractiva para estos propósitos.

Un aspecto importante para considerar en los procesos de remediación de ambientes contaminados con EPT es la adecuada comprensión de la interacción planta-microorganismo. En este aspecto, los organismos que establecen simbiosis con las plantas, tales como los hongos MA han recibido especial atención en la búsqueda de optimizar las aplicaciones tecnológicas que puedan promover un mayor beneficio de la simbiosis (Cornejo *et al.*, 2008; Meier *et al.*, 2011; 2012a 2012b). De forma más específica, es bien conocido que los hongos MA contribuyen al establecimiento y crecimiento vegetal, especialmente bajo condiciones restrictivas de agua y fertilidad (Barea *et al.*, 2011), ayudando a la adquisición de nutrientes para la planta, especialmente fósforo (Javot *et al.*, 2007), nitrógeno (López-Pedrosa *et al.*, 2006), calcio (Vögel-Mikus *et al.*, 2006), potasio (Andrade *et al.*, 2010) y zinc (Audet y Charest, 2006), y contribuyen a mejorar la estructura y agregación del suelo a través de la producción de glomalina (Wright y Upadhyaya, 1998; Cornejo *et al.*, 2008). Estos aspectos nutricionales finalmente generan que las plantas creciendo en suelos contaminados con EPT sean capaces de aminorar el estrés oxidativo,



además presentando diferentes grados de tolerancia en la planta hospedera (Del Val *et al.*, 1999; Gaur y Adholeya, 2004; Hildebrandt *et al.*, 2007), los que serán detallados más adelante.

## **La simbiosis MA en suelos contaminados con EPT: casos en Chile y Argentina**

Los EPT generados por el manejo inadecuado de residuos generan fuertes disminuciones en la actividad, diversidad y densidad de las poblaciones bióticas de los sistemas afectados, incluyendo mesofauna, plantas y microorganismos (Meier *et al.*, 2012b). Estos EPT pueden depositarse y permanecer por prolongados períodos en un lugar determinado, o movilizarse a otros lugares por acción del viento o el agua, extendiendo el problema de contaminación a otros ecosistemas (contaminación difusa). Las principales actividades antrópicas que generan estos desechos son las industriales; la minería es la principal en Chile, especialmente en la zona norte y centro del país, donde se han registrado altos niveles de EPT, coexistiendo con varios centenares de sitios con relaves y cierres de faenas (MMA, 2011). En este sentido, Chile es el principal productor de cobre (Cu) del mundo, contribuyendo con el 40 % de las exportaciones nacionales, lo que se traduce en más de un tercio del total de Cu producido anualmente a nivel mundial (COCHILCO, 2010). Sin embargo, la intensidad con que se realiza esta actividad ha producido un impacto negativo en los ecosistemas, principalmente debido a producción y acumulación de residuos con altas cantidades de EPT, tanto en labores de extracción como en el procesamiento industrial para la obtención de Cu (Ginocchio *et al.*, 2004; Meier *et al.*, 2012).

Los EPT presentes en los residuos mineros, tales como Cu, Zn, Pb, entre otros (Adriano, 2001), poseen un riesgo potencial tanto para la población humana como para el medioambiente debido a que altas concentraciones de estos elementos producen toxicidad a organismos superiores y microorganismos, por lo que su manejo ambiental debe ser una prioridad asociada a la actividad minera (Sarabia *et al.*, 2003). En Chile la situación no es distinta, lo que resulta todavía más preocupante considerando que los estudios científicos relativos al tema son escasos, situación que no se corresponde con la magnitud de la actividad minera. En este contexto, estudios realizados por Ginocchio *et al.* (2004) y González *et al.* (2008) han descrito la drástica pérdida de diversidad en las comunidades vegetales en ecosistemas afectados por el depósito de material particulado enriquecido con metales provenientes de las actividades mineras. Concretamente, esta actividad ha generado la pérdida de vastas extensiones de terrenos destinados a actividades agrícolas, efecto que se hace evidente en la reducción de cobertura vegetal y aumento en la erosión del suelo dentro del ecosistema mediterráneo en el valle de Puchuncaví, Chile central (Ginocchio, 2000).

De Gregori *et al.* (2003) realizaron estudios que describen los niveles de Cu, Sb y As en suelos agrícolas de tres regiones de Chile, presentando en algunos casos niveles preocupantemente altos.

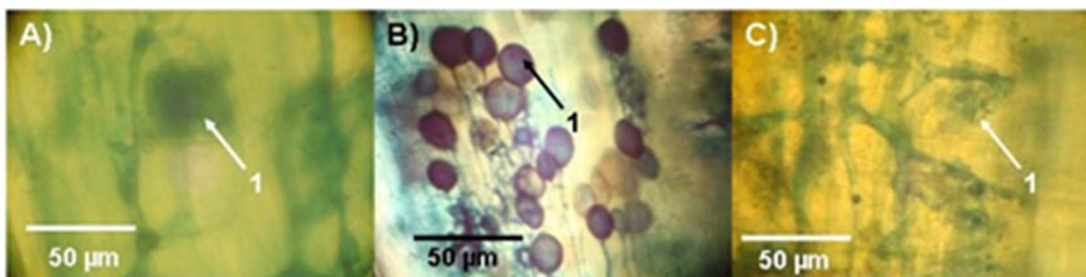
Ginocchio (2000) y González *et al.* (2008) realizaron caracterizaciones de especies vegetales presentes en el valle de Puchuncaví (región de Valparaíso), fuertemente impactado por la actividad de la refinera de Cu de Ventanas. En estos estudios se describió un total de 22 especies de plantas (pseudo)metalofitas, a las cuales también se les analizó su acumulación de Cu (González *et al.*, 2008). Sumado a esto, como grupo de investigación comenzamos el estudio del rol de las comunidades de hongos MA en suelos contaminados, así como los mecanismos que presentan estos hongos para promover el establecimiento de metalofitas endémicas, usando como modelo de referencia el ecosistema Mediterráneo del valle de Puchuncaví (Cornejo *et al.*, 2008a). Entre otros resultados destacables, se encontró que los hongos MA adaptados a altas concentraciones de Cu permitieron la supervivencia de las plantas a niveles fitotóxicos de Cu, posiblemente a través de mecanismos de exclusión que favorecen la disminución del estrés oxidativo producido por este metal. Además, se evidenció una compatibilidad específica entre la planta huésped y los hongos MA, lo que determinaba marcadas diferencias en las comunidades de hongos MA asociados a distintas especies vegetales, así como debido a los niveles de contaminación con Cu (Meier *et al.*, 2011; 2012a; 2015).

Aunque la presencia de EPT ha determinado una notable pérdida de cobertura y diversidad vegetal (Ginocchio, 2000; González *et al.*, 2008), se han encontrado comunidades de hongos MA efectivas en promover el establecimiento y crecimiento de plantas a altos niveles de contaminación (Cornejo *et al.*, 2008b; Gil-Cardesa *et al.* 2014, Meier *et al.*, 2011; 2012b; 2015). Destacan dentro de estas la asociación entre la planta *Oenothera picensis*, la que muestra un alto grado de especificidad con un ecotipo de *Acaulospora lacunosa* (Cornejo *et al.*, 2008b), así como *Baccharis linearis* e *Imperata condensata*, que cuentan con comunidades complejas de hongos MA, encontrándose hasta 8 ecotipos pertenecientes principalmente a los géneros *Acaulospora*, *Gigaspora* y *Scutellospora* (Cornejo *et al.*, en preparación). Cabe destacar que *I. condensata* presenta niveles de exudación de citrato extremadamente altos y relacionados con los niveles crecientes de Cu (hasta 150 mol citrato g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), lo que la convierte en una especie muy efectiva excluyendo el Cu para hacer frente a estas condiciones tóxicas (Meier *et al.*, 2012a). Sin embargo, mayor cantidad de estudios se requieren para caracterizar de forma más completa la diversidad de hongos MA en suelos contaminados, que permitan contar con una amplia base de recursos genéticos para ser utilizados en un futuro en programas de biorremediación. En el intertanto, se continúa avanzando en el estudio de las bases biológicas que presentan estos hongos para hacer frente a la presencia de altos niveles de EPT en el suelo.

Por su parte, en Argentina las principales industrias contaminantes son las siderúrgicas, curtiembres, frigoríficos, petroquímicas y celulósicas. Aportan, predominantemente contaminantes como cadmio, cromo, plomo, cobre, hierro, mercurio, aluminio, arsénico y selenio. El cromo (Cr) es utilizado en varios procesos industriales entre los que se encuentra el curtido de cueros. Existe en el suelo en dos estados de oxidación: Cr(III) y Cr(VI) (James, 1995; 1996). El Cr(III) es beneficioso para la

nutrición humana y tiene baja biodisponibilidad pues precipita en el suelo, mientras que el Cr(VI) es un carcinogénico de clase A, altamente soluble, móvil y por lo tanto biodisponible (James, 1996; Khan, 2001). El Cr(VI) se encuentra principalmente como anión cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) o, en menor proporción, como sales de cromato (ej.  $\text{CaCrO}_4$ ,  $\text{BaCrO}_4$ ,  $\text{PbCrO}_4$ ) en suelos neutros a alcalinos (Dhala et al., 2013; James, 1996). Los desechos de la industria curtiente contienen gran cantidad de Cr(III), aproximadamente el 40 % del Cr(III) utilizado es desechado y cuando es depositado en el suelo hasta un 15% puede oxidarse a Cr(VI) (James, 1996).

Con el fin de estudiar el posible efecto biorremediador de los hongos MA adaptados a suelos contaminados con Cr se muestreó suelo rizosférico de las especies vegetales más abundantes, *Ricinus communis* y *Conium maculatum*, así como suelo desnudo (sin cobertura vegetal en al menos 2 m a la redonda) de una zona lindante al arroyo Morón, provincia de Buenos Aires, que recibe descargas industriales principalmente de curtiembres. Las concentraciones de Cr total y Cr(VI) en todos los suelos fue igual o mayor a los límites permitidos por la legislación nacional ( $250 \mu\text{g Cr g}^{-1}$  de suelo y  $8 \mu\text{g Cr(VI) g}^{-1}$ , Ley 24051). Como principales resultados, se pudo destacar que las menores concentraciones de Cr total y Cr(VI) en suelo se encontraron en las rizósferas de *R. communis*. Además, la concentración de Cr fue mayor en las raíces que en los tejidos aéreos en ambas especies vegetales. Sin embargo, resultó altamente destacable que la concentración de Cr en la fracción enriquecida en glomalina fue mayor en los suelos sin vegetación que en los suelos con vegetación. Por una parte, este resultado sugiere que el posible efecto estabilizador de la glomalina se mantendría aun en ausencia de especies vegetales. Por otra parte, se encontraron estructuras de hongos MA en las raíces de ambas especies vegetales; el porcentaje de micorrización es mayor en las raíces de *R. communis* en comparación con las raíces de *C. maculatum*. En las raíces de *R. communis* se observaron vesículas y arbuscúlos mientras que en las raíces de *C. maculatum* solo arbuscúlos (Gil-Cardeza et al., 2014, Fig. 1).



**Figura 1.** A) Hongos micorrícicos arbusculares en raíces de *Conium maculatum* y *Ricinus communis* aislados de suelos contaminados con Cr. y B) *R. communis* A1: arbuscúlo, B1: vesícula; C) *C. maculatum* 1: arbuscúlo. Fotos obtenidas bajo microscopio óptico de raíces teñidas con azul de metilo (Fotos: L. Gil-Cardeza).

La existencia de hongos MA en suelos contaminados con Cr, la presencia de Cr en la fracción de suelo enriquecida en glomalina, sumado a que la concentración de Cr total fue menor en la rizósfera de *R. communis* sirvieron de base para continuar con el estudio de las comunidades de hongos MA de las rizósferas de *R. communis*. Para ello se están utilizando caracteres morfológicos y moleculares de las esporas y evaluando el posible rol biorremediador. Preliminarmente, se ha podido observar que la mayor cantidad de ecotipos de hongos MA aislados de rizósferas de *R. communis* del sitio contaminado con Cr pertenecieron a la familia Glomeraceae y se encontraron algunos ejemplares de la familia Gigasporaceae. En suelos rizosféricos de *R. communis* no contaminados se observaron ecotipos de hongos MA de las familias Acaulosporaceae y Gigasporaceae (datos no publicados). Estos resultados están en concordancia con diversos estudios que han encontrado que la familia Glomeraceae es la más tolerante a elevadas concentraciones de EPT (Gaur y Adholeya, 2004). En cuanto al posible rol de los hongos MA adaptados al sitio contaminado con Cr, nuestros estudios sugieren que favorecería la micorrizo-estabilización por sobre la fitoextracción, y que además estos hongos serían más eficaces en disminuir la concentración de Cr(VI) que otros hongos MA de sitios no contaminados con Cr (datos no publicados).

## **Mecanismos presentes en la interacción planta-hongo MA para tolerar EPT**

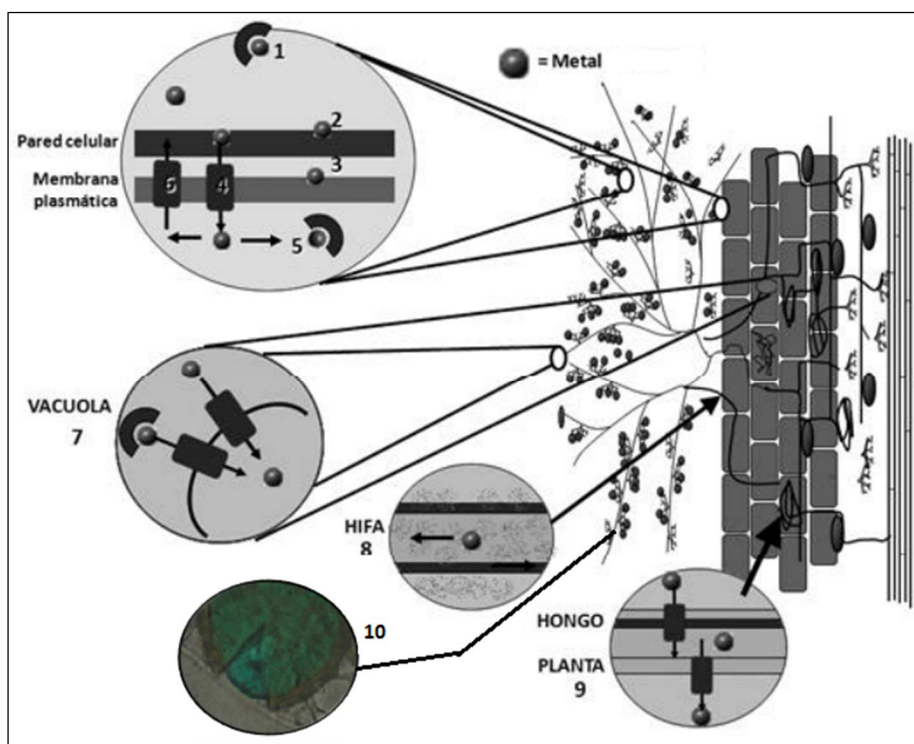
Para mantener la homeostasis celular los organismos han desarrollado complejas rutas de captación, quelación, transporte y almacenaje (Festa y Thiele, 2011). En este sentido, los metales no esenciales y cantidades excesivas de micronutrientes como Cu, pueden ser detoxificados por diversos mecanismos incluyendo la secreción, compartimentalización o quelación del metal por ligandos (Hall, 2002). Si bien en la simbiosis MA ambos organismos trabajan en conjunto para minimizar los efectos dañinos que los EPT pueden originar, cada simbionte posee sus propios mecanismos para hacer frente a la toxicidad. En el caso de las plantas, los mecanismos más conocidos incluyen la exudación de ácidos orgánicos de cadena corta (AOCC), la producción de proteínas transportadoras de metales, metalotioneínas y fitoquelatinas.

En detalle, los AOCC son compuestos exudados por las raíces de las plantas, conocidos por su capacidad de estimular el crecimiento microbiano y movilizar nutrientes de baja solubilidad desde el suelo (Jones y Darrah, 1994; Neumann y Romheld, 1999; Dakora y Phillips, 2002). Sin embargo, en los últimos años se han estudiado por su respuesta a una serie de estreses ambientales (Jones, 1998), reduciendo la biodisponibilidad de diversos EPT en el suelo (Nigam *et al.*, 2001) y generando así una disminución de la toxicidad. Varios reportes han demostrado que las raíces de plantas expuestas a altos niveles de Cu pueden exudar diversos AOCC, incluyendo ácido cítrico, oxálico y succínico, que juegan un rol importante en el alivio de la toxicidad por Cu (Quartacci *et al.*, 2009). En particular, estudios de Meier *et al.* (2012b) demostraron que el ácido cítrico es un mecanismo de

exclusión de Cu altamente efectivo presente en algunas plantas metalofitas, debido a la fuerte afinidad que este compuesto muestra al formar complejos extracelulares estables (Nigam *et al.*, 2001).

Muchos organismos han desarrollado redes homeostáticas complejas para asegurar la disponibilidad del metal, controlar la absorción, distribución, utilización y evitar sus efectos tóxicos (Pilon, 2011). En este sentido, las proteínas transportadoras de metal son la primera línea de defensa a las perturbaciones de la homeostasis celular y subcelular, resultando un componente clave en estas rutas. Por ejemplo, en plantas la absorción de Cu de alta afinidad está mediada por una familia de transportadores denominados COPT (Kampfhenkel *et al.*, 1995; Puig, 2014). No obstante lo anterior, el efecto que la simbiosis AM tiene sobre la expresión y actividad de este tipo de proteínas sobre sus hospederos es aún bastante desconocido. Por su parte, las fitoquelatinas (PC) son proteínas implicadas principalmente en la homeostasis celular y el tráfico de nutrientes metálicos esenciales, en particular Cu y Zn (Klapheck *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997). Sin embargo, los niveles de exposición de Cu y Zn mínimamente necesarios para inducir la síntesis de PCs en concentraciones considerables para células vegetales son a menudo muy superiores a las necesidades nutricionales, incluso encontrándose cercanas a los límites de toxicidad (Schat *et al.*, 2000). Las metalotioneinas (MT) por su parte, constituyen una familia extensa de proteínas de bajo peso molecular (Hamer, 1986; Coyle *et al.*, 2002). Estos polipéptidos poseen residuos de cisteína dispuestos en motivos de unión a metal, que proporcionan ligandos sulfhidrilos para la coordinación de iones metálicos bivalentes (Cobbett y Goldsbrough, 2002) jugando un papel importante en el secuestro intracelular de diversos EPT. Se ha demostrado que el Cu induce la expresión de genes que codifican para algunas MTs de unión a este metal. Además, diversos reportes en un grupo de ecotipos de *Arabidopsis* correlacionaron estrechamente el nivel de expresión de un gen de MT con la tolerancia a Cu (Murphy y Taiz, 1995).

En el caso de los hongos MA también se han descrito numerosas vías por las cuales logran captar, extraer o aislar distintos EPT (Figura 2), destacándose principalmente el rol de la glomalina liberada por el hongo hacia el suelo, la cual posee la capacidad de secuestrar extracelularmente diversos EPT (Cu, Pb, Al, entre otros) incluso en condiciones de acidez extrema (Cornejo *et al.*, 2008a; Aguilera *et al.*, 2011; Seguel *et al.*, 2015). Estudios moleculares sobre esta glicoproteína han revelado una secuencia de 17 aminoácidos que mostró similitud con una proteína de choque térmico 60 (hsp 60) (Gadkar y Rillig, 2006). Los roles funcionales putativos de esta proteína incluyen la agregación de sustrato (Wright y Upadhyaya, 1998) y la unión a hierro (Rillig *et al.*, 2001). Considerando que la glomalina se encuentra principalmente en el micelio de los hongos MA (80 %) en lugar de ser secretada hacia el medio (Driver *et al.*, 2005), se postula que la glomalina cumple una función primaria en las hifas, por lo que probablemente los efectos observados en el suelo sean una consecuencia secundaria (Gadkar y Rillig, 2006).



**Figura 2.** Mecanismos presentes en la simbiosis MA frente a contaminación con EPT. 1) Quelación extracelular por glomalina; 2) Adsorción a la pared celular del hongo; 3) Utilización de la membrana plasmática como barrera; 4) Importación por transportadores; 5) Quelación intracelular con metaloproteínas; 6) Exportación por transportadores; 7) Confinamiento en la vacuola; 8) Transporte por hifas cenocíticas; 9) Transferencia a la matriz interfacial en la célula radical; 10) Acumulación de precipitados por esporas (Modificado de Meier *et al.*, 2012b).

Adicionalmente, para el caso de los hongos MA se han descrito transportadores de membranas y MT capaces de controlar a nivel citoplasmático la concentración de EPT en la célula, generalmente produciendo su acumulación final en vacuolas (González-Guerrero *et al.*, 2007; 2008). González-Guerrero *et al.* (2010) identificaron desde micelio extrarradical del hongo micorrícico *Glomus intrarradices*, una secuencia de cDNA putativa (GintABC1) que codifica para un transportador del tipo ABC, que es regulado por Cd y Cu, lo que sugiere que puede estar involucrado en su detoxificación. Más recientemente, Tamayo *et al.* (2014) realizaron un análisis del genoma del hongo *Rhizophagus irregularis* para transportadores de Cu, Fe y Zn. Este estudio permitió la identificación de 30 marcos de lectura abierta en el genoma de este hongo, potencialmente codificantes para transportadores de metales. Para el caso de las MT el estudio molecular en hongos MA ha demostrado que estas juegan un rol importante en la tolerancia a distintos metales. Tal es el caso del gen GintMT1, que codifica una MT presente en el micelio extrarradical de *Glomus intrarradices*, el primer gen reportado para el género *Glomus*. El análisis funcional de este gen en *Saccharomyces cerevisiae*, sensible a Cu, reveló que la expresión génica de estos transcritos fueron elevados en micelios tratados con 5 uM de Cu, pero inhibidos en micelios tratados con 50 uM de Cu o 450 uM de Cd (González-Guerrero *et al.*,

2007). Esta elevada expresión de GintMT1 en los tratamientos con Cu, junto con su capacidad para proporcionar tolerancia a una levadura sensible a Cu, sugiere que GintMT1 podría ofrecer protección al menos contra Cu.

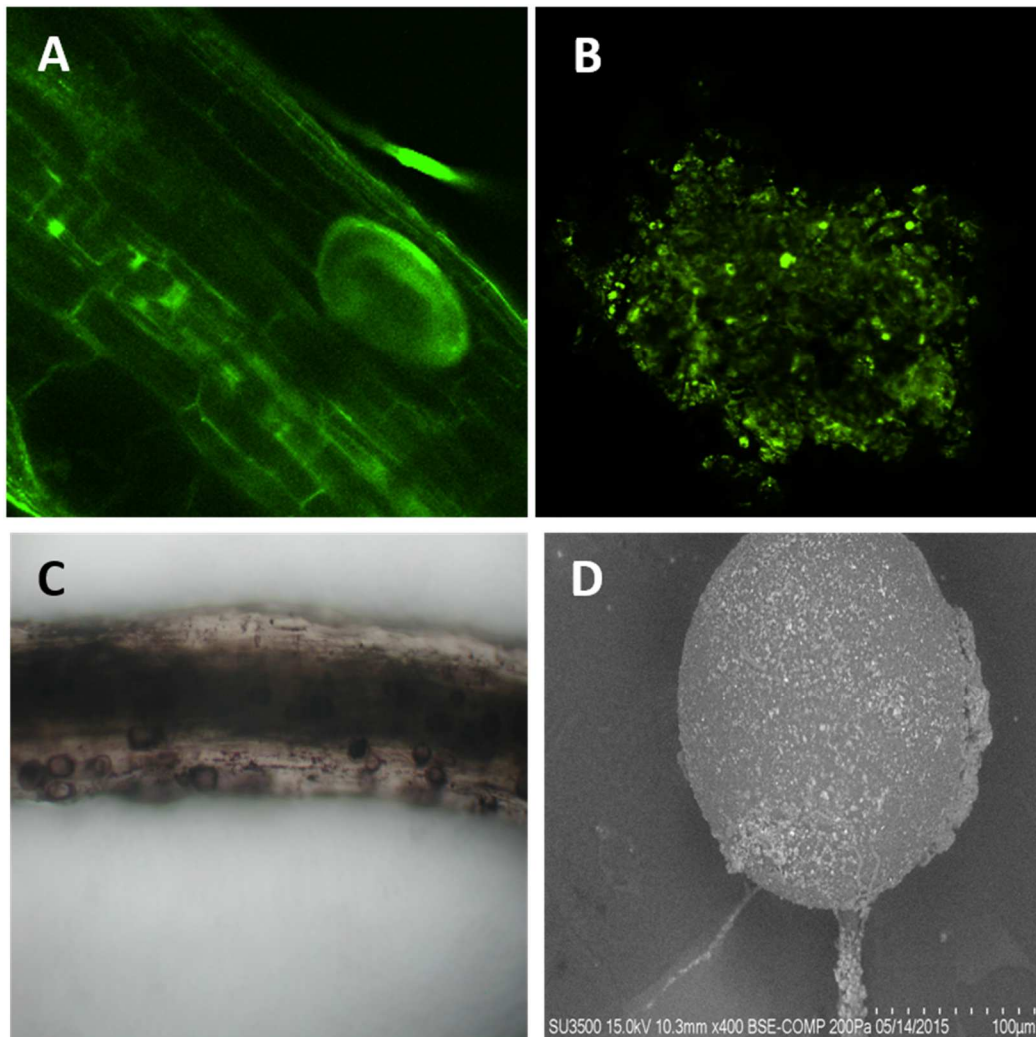
En cuanto al rol que juegan las estructuras de los HMA, Cornejo *et al.* (2013) observaron que esporas de *G. intraradices* que crecen en cultivos monoxénicos y de *G. claroideum* en suelos contaminados con Cu, poseían la capacidad de desplazar la totalidad de su contenido citoplasmático para acumular altos niveles de Cu como precipitados. Si bien este comportamiento genera la pérdida de la viabilidad de la espora, permite que otras esporas en la colonia conserven su vitalidad y puedan generar nuevas colonizaciones. Adicionalmente, a nivel extracelular las hifas pueden adsorber diversos EPT a la pared celular (González-Chávez *et al.*, 2002), presumiblemente por la quitina o la glomalina en su superficie. Esta capacidad de secuestro e inmovilización de determinados EPT también ha sido descrita para las estructuras del hongo (esporas, hifas), tanto extra como intrarradicales (micelio interno, vesículas), como en el caso del Al fitotóxico, que está en altos niveles en suelos ricos en alofán y con valores bajos de pH (Aguilera *et al.*, 2011; Figura 3). Como se puede observar, son variados los mecanismos por los cuales la interacción hongo MA-planta puede hacer frente a la toxicidad por EPT; sin embargo, aún quedan interrogantes sobre su regulación, especialmente a nivel genético, ya que al ser el hongo un biotrofo obligado, los estudios a este nivel son muy dificultosos.

## **Utilización de enmiendas orgánicas para la remediación de suelos contaminados**

### **Compost obtenidos de residuos orgánicos**

Los residuos orgánicos producidos anualmente por distintas actividades como la agricultura pueden ser utilizados como enmiendas para la mejora de ciertas propiedades del suelo (ej.: contenido de materia orgánica, nutrientes, estructura) (Fisher y Glaser, 2012; Grandy *et al.*, 2002). En este sentido, el uso de compost ha ganado especial atención. La aplicación de compost es considerada una herramienta biotecnológica importante porque permite reciclar nutrientes y materia orgánica (MO) de distintos materiales, como los residuos de cosecha, disminuyendo así la necesidad o requerimientos de fertilizantes y pesticidas artificiales (Cogger, 2005; Favoino y Hogg, 2008). La MO estabilizada y compostada también incrementa y acelera el crecimiento de plantas, aumentando la captación de CO<sub>2</sub> y el almacenaje de C en la planta y el suelo (Mondini *et al.*, 2007; Favoino y Hogg, 2008; Arriagada *et al.*, 2014), contribuyendo además a las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos enmendados (Cooperband, 2002; Valarini *et al.*, 2009; Medina *et al.*, 2015). Por las características antes mencionadas, las enmiendas orgánicas de suelo han sido ampliamente

utilizadas en restauración ecológica y remediación de suelos contaminados con EPT (Azcón *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2012; Curaqueo *et al.*, 2014a).



**Figura 3.** Adsorción de Al a estructuras de hongos MA y secuestro en glomalina extraída de suelos ácidos. A) Detección de Al en vesículas intrarradicales de hongos MA mediante microscopía confocal láser (MCL). B) Detección de Al secuestrado en glomalina mediante MCL. C) Detección de Al en raíces de trigo obtenidas de un Andisol con alta saturación de Al mediante tinción histológica con hematoxilina. D) Ultralocalización de Al en superficie de esporas de hongos MA obtenidas de suelos ácidos mediante microscopía electrónica de barrido acoplada a difracción de rayos X (Fotos: P. Aguilera).

En la actualidad existe un importante número de sistemas de remediación de suelos contaminados por metales a través de tratamientos físicos, químicos y biológicos (Meier *et al.*, 2012), destacándose entre otras, las técnicas de inmovilización. Estas técnicas se concentran principalmente en la disminución de la disponibilidad y actividad de los EPT sin remover el contaminante desde el suelo (Adriano *et al.*, 2004; Houben *et al.*, 2012; Medina *et al.*, 2015). En este sentido, el principal objetivo de estas técnicas es acelerar y promover los procesos naturales de inmovilización del contaminante



a través de reacciones de sorción, complejación y precipitación por efecto del uso de distintos tipos de enmiendas (Bolan *et al.*, 2003). Existen enmiendas inorgánicas (ej.: óxidos de hierro, fosfato y calcio) y orgánicas como el compost, que han sido utilizadas para promover la estabilización e inmovilización de metales y metaloides en el suelo (Castaldi *et al.*, 2005; Derome, 2009; Nielsen *et al.*, 2011). Autores como González *et al.* (2012) han reportado que la combinación de materiales inorgánicos y orgánicos ha resultado efectiva en la inmovilización de algunos metales y metaloides tales como Cd, Cu, Pb y Zn en suelos contaminados con residuos de la minería.

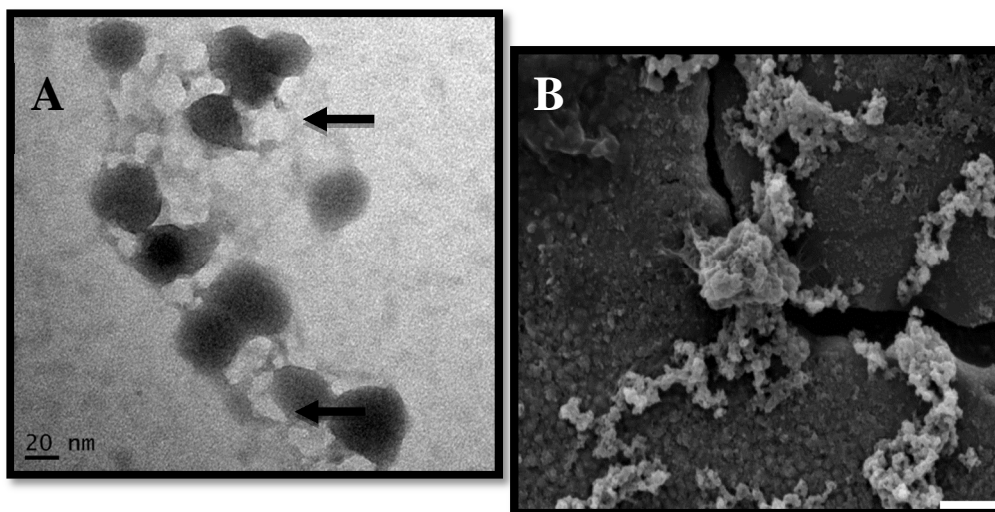
En el caso de algunos metales como Cu y Zn la aplicación de enmiendas orgánicas estabilizadas promueve la inmovilización de estos metales en el suelo a través de la formación de complejos (Figura 4). La aplicación de compost en cambio promueve la reducción de Cr (VI) a Cr (III) y su subsecuente formación a hidróxido crómico (Park *et al.*, 2011) que lo lleva a precipitar en una forma no disponible para plantas y microorganismos. De la misma forma, las reacciones redox son las más importantes para los metaloides de origen biótico o abiótico como As y Se (Bolan *et al.*, 2003; Chiu *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2009). Adicionalmente, la aplicación de enmiendas orgánicas estables generalmente tiene un efecto en las propiedades físicas del suelo tales como la distribución del tamaño de partícula, el patrón de agrietamiento y la porosidad, limitando así la dispersión de las partículas contaminadas con el metal a través de la formación de agregados estables al agua (Park *et al.*, 2011).

Cabe señalar que la aplicación de enmiendas orgánicas no afecta de la misma forma al comportamiento de metales y metaloides. Por ejemplo, bajo condiciones anaeróbicas, un aumento en el contenido de MO puede promover la reducción biótica de As(VI) a As(III), incrementando su movilidad, disponibilidad y toxicidad en el suelo (Wakao *et al.*, 1988). En general, la aplicación de enmiendas orgánicas aumenta el contenido de carbono orgánico disuelto que sirve de fuente de energía para los microorganismos reductores (Chiu *et al.*, 2009) teniendo un impacto positivo en la remediación de ciertos metales en suelos contaminados. Sin embargo, la formación de complejos órgano-metálicos con los compuestos orgánicos solubles podría también aumentar la movilidad del metal (Neal y Sposito, 1986). Por esta razón resulta esencial la estabilización química de las enmiendas antes de su aplicación a suelos contaminados.

Otro efecto importante de las enmiendas orgánicas en suelos contaminados por EPT es la modificación del ambiente rizosférico. Como consecuencia de los cambios en el pH, en la concentración de ácidos orgánicos, y en la composición de la solución del suelo y de la actividad microbiana, la química del contaminante puede modificarse y promover así su transformación, movilidad y disponibilidad (Akhtar y Malik, 2000; Caravaca *et al.*, 2005; Pérez-de-Mora *et al.*, 2006; Srinivasan *et al.*, 2012). Como ejemplo de lo anterior, el Hg altera su estado de oxidación y disponibilidad en presencia de MO. Este elemento reducido en presencia de MO a Hg(II) sería

susceptible a la formación de complejos estables a través de la formación de fuertes enlaces con las sustancias húmicas (Park *et al.*, 2011; Medina *et al.*, 2015).

Existen diversos estudios que sugieren que el uso de enmiendas orgánicas tiene un efecto positivo en la actividad de los microorganismos y el crecimiento vegetal. En este contexto, Alguacil *et al.* (2011) reportaron que la aplicación de residuos de remolacha azucarera es una estrategia eficiente en la remediación de suelos contaminados por actividades mineras ya que registró un aumento considerable en la actividad microbiana y un consecuente crecimiento sostenido de las especies vegetales estudiadas. Del mismo modo, Bashan *et al.* (2012) reportaron importantes modificaciones de las condiciones rizosféricas y en la actividad de los microorganismos de la rizosfera, los cuales tuvieron un efecto importante en la disponibilidad de los metales estudiados. Por su parte, Curaqueo *et al.* (2014a) reportaron que el uso combinado de compost de alperujo de olivo sumado a la inoculación de plantas de *Tetraclinis articulata* con hongos MA incrementó la producción de biomasa de esta especie a la vez que mejoró la fertilidad del suelo y su actividad biológica. Asimismo se reportó una disminución en los contenidos de Cr, Ni, y Pb en la parte aérea, así como también un descenso en los contenidos de Cr y As en raíces. Otros estudios realizados por Meier *et al.* (2011, 2015) reportaron que el uso de residuos de remolacha azucarera biotransformada tuvo un efecto positivo en el crecimiento de las comunidades de hongos MA, una disminución en la disponibilidad y movilidad de Cu y una modificación de los indicadores de estrés oxidativo en plantas de *Oenothera picensis*. No obstante, a pesar de que tiene un efecto positivo en la remediación de suelos contaminados, las enmiendas orgánicas como el compost en algunos casos podrían presentar una limitada permanencia en el suelo después de ser incorporados, por lo que promover el uso de métodos de compostaje más eficientes y producir un material estable y perdurable sigue siendo materia de estudio. Ante esto, el uso de materiales altamente recalcitrantes como el carbón y biocarbón ha ganado considerable interés por su reactividad y estabilidad.



**Figura 4.** Análisis morfológico de complejos a nanoescala entre sustancias húmicas y hierro mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido. A) Nanopartículas globulares formadas por la interacción de hierro y la matriz orgánica correspondiente a ácidos húmicos extraídos de compost de residuos de cosecha. B) Ácidos húmicos de compost de residuos de cosecha formando agregados a pH 4,0 en presencia de hierro, estableciendo estructuras dendríticas (Fotos: J. Medina).

### **Biocarbón y sus efectos en suelos contaminados**

El biocarbón es un material derivado de la descomposición térmica de biomasa en ausencia parcial o total de oxígeno a temperaturas bajas (<600 °C), proceso denominado pirólisis (Sohi *et al.*, 2010). Diversos autores señalan que el biocarbón actúa como acondicionador y mejorador del suelo potenciando el crecimiento de las plantas a través de varios mecanismos tales como el suministro y retención de nutrientes en su estructura, previniendo procesos de lixiviación; el incremento de la capacidad de intercambio catiónico del suelo; el aumento de la capacidad de retención de agua; la neutralización de la acidez del suelo (efecto tampón) y la generación de mejores condiciones para el desarrollo de los microorganismos. Lo anterior justifica los estudios de uso de biocarbón aplicado como enmienda en suelos contaminados, ya que por las características antes mencionadas este material reduciría la disponibilidad de EPT, disminuyendo así su fitotoxicidad y potenciando procesos de fitorremediación (Lehmann, 2007; Park *et al.*, 2011). En este sentido, estudios realizados por Meier *et al.* (2015) señalan que el uso de biocarbón produce un efecto positivo en la abundancia de hongos MA, lo cual se debería a las características porosas del biocarbón, que proveen un microhábitat protector al hongo, previniendo además la desecación (Thies y Rillig, 2009; Warnock *et al.*, 2007). A lo anterior se suma el efecto positivo del biocarbón sobre las propiedades físico-químicas del suelo (Curaqueo *et al.*, 2014b), el cual promueve una acción sinérgica entre ambos componentes potenciando la biorremediación de suelos contaminados (Warnock *et al.*, 2007).

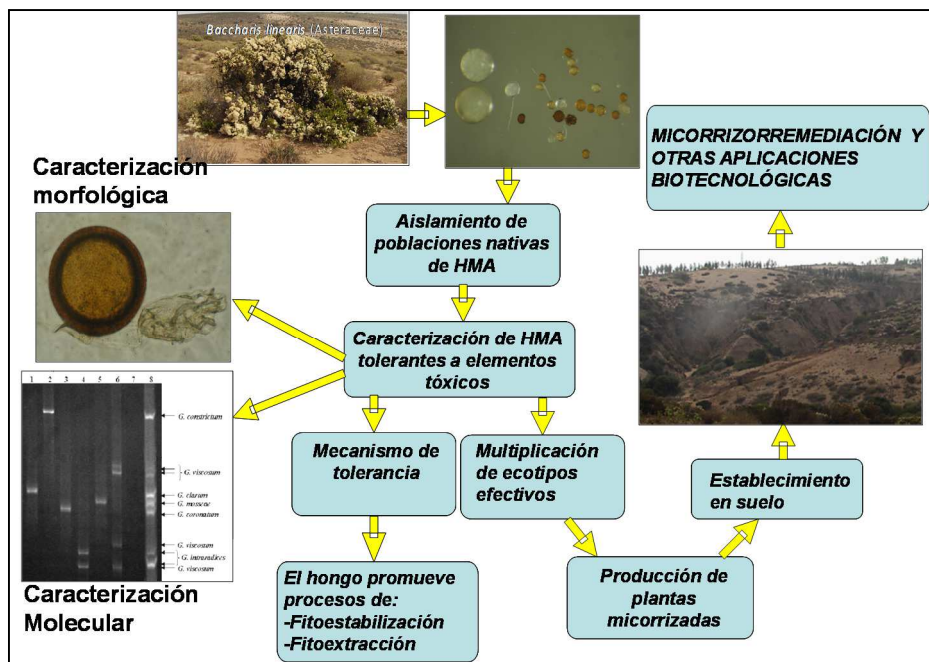
En Chile, nuestro grupo de investigación está realizando algunas iniciativas que contemplan el uso de biocarbón y hongos MA (Curaqueo *et al.*, 2014b; Meier *et al.*, 2015a, b), en particular en suelos contaminados con Cu. En este sentido, el biocarbón afecta el comportamiento de Cu en las plantas mediante la alteración de su solubilidad, biodisponibilidad y distribución espacial, incluso en altas concentraciones de este metal. De la misma forma, se ha observado que el biocarbón reduce la disponibilidad de Cu en el suelo mediante la reducción de su fracción intercambiable y aumentando el Cu ligado a la MO y a las fracciones residuales. Finalmente, las actividades microbianas y enzimáticas igualmente se ven incrementadas por la aplicación biocarbón, lo que mejora el crecimiento vegetal mediante el aumento de nutrientes y facilitando la supervivencia de las plantas en suelos con altos niveles de concentración de Cu (Meier *et al.*, 2015a).

### **Micorrizorremediación, una estrategia avanzada de biorremediación**

A la biorremediación dirigida, utilizando plantas con una rizosfera optimizada con hongos MA eficientes en el control del efecto deletéreo de EPT, se la denomina micorrizorremediación. En este sentido es necesario destacar que los hongos MA, debido a sus múltiples acciones y beneficios en la planta hospedera y en el suelo, deben ser considerados de forma principal dentro de los planes de remediación de suelos contaminados cuando las plantas seleccionadas sean factibles de desarrollar la simbiosis MA. Lo anterior es especialmente importante si se considera que en muchos casos es la simbiosis MA funcional la que confiere a las plantas la capacidad de tolerar altos niveles de EPT, en particular disminuyendo el estrés oxidativo asociado a la alta presencia de EPT en el citoplasma de la célula vegetal (Meier *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2015). Esta disminución del estrés oxidativo va asociado a los menores niveles de EPT que logran cruzar las barreras fúngicas y efectivamente llegar a las células vegetales. Por lo mismo, considerando que las distintas estructuras de los hongos MA y de la glomalina pueden adsorber y secuestrar los EPT evitando su paso a la raíz, se puede afirmar que en general el uso de plantas micorrizadas favorecerá sobre todo procesos orientados a la fitoestabilización de EPT (Meier *et al.*, 2012b).

Por lo anterior, aspectos que debieran tenerse en cuenta para la implementación de procesos de micorrizorremediación debieran considerar actividades clave como (Figura 5): i) obtención, multiplicación, aislamiento y caracterización de las comunidades de hongo MA naturalmente presentes en suelos con altos niveles de EPT y presumiblemente adaptadas a esas condiciones; ii) selección de plantas tolerantes (metalofitas) a los EPT presentes en el suelo contaminado, idealmente entre la flora endémica; iii) corroboración de la compatibilidad funcional entre los aislados de hongos MA obtenidos y la planta hospedera; iv) análisis de los efectos producidos por la MA sobre la actividad y biodisponibilidad del EPT en el suelo y su presencia en la planta (comprobar si se

promueve fitoextracción o bien fitoestabilización de EPT); v) multiplicación de aislados efectivos para incorporación en matrices para formulación de bioinoculantes; vi) producción de plántulas con rizosfera optimizada mediante micorrización en condiciones de vivero; y finalmente vii) trasplante a campo. Adicionalmente, otras tecnologías que potencien el resultado final debieran ser incorporadas dentro de este sistema, como por el ejemplo la aplicación de enmiendas orgánicas y biocarbón, como se profundizó anteriormente (Medina *et al.* 2015b).



**Figura 5.** Representación de las etapas para considerar dentro de un proceso de micorrorremediación en el cual se incorporen hongos MA eficientes en incrementar la tolerancia de metalofitas a elementos potencialmente tóxicos presentes en suelo.

## Conclusiones y perspectivas

Sobre la base de lo expuesto, es claro que los hongos MA proveen a las plantas con las que se asocian, y al suelo que las circunda una serie de beneficios que resultan mucho más complejos al bien conocido rol nutricional. Es por esto que considerando las posibilidades de su utilización dirigida, las herramientas que incluyan este tipo de hongo pueden representar una oportunidad cierta para la mejora de la calidad de los suelos degradados o contaminados, además del uso común que se les está otorgando como inoculante en sistemas agrícolas, potenciando entonces en gran medida diversos programas de biorremediación (micorrorremediación) de ambientes contaminados. Si bien es cierto que se reconoce la importancia de estos hongos particulares, aún resta mucho por avanzar en la descripción de las especies, así como conocer los ecotipos de hongos MA idóneos para cada tipo de utilización biotecnológica, asociado igualmente al progreso de las técnicas para su cultivo y mantención. Mucho de este avance tecnológico puede venir aparejado al desarrollo de técnicas moleculares que permitan fehacientemente la identificación de cada especie, tomando en cuenta que cada ecotipo puede presentar un mecanismo distinto para participar en procesos de fitoestabilización, o bien fitoextracción. Un aspecto que igualmente debe ser considerado es la

selección de plantas para ser utilizada, y si la inoculación con determinado ecotipo resulta en una asociación efectiva, que potencie en terreno el establecimiento vegetal, y que pueda mantener a *posteriori* un proceso de reclutamiento espontáneo de nuevos individuos de la misma u otra especie, que puede resultar interesante sobre todo en programas de fitoestabilización. Finalmente, el uso de múltiples tecnologías con el objetivo de optimizar los programas de biorremediación son altamente recomendables, en particular si se considera que otras alternativas como la aplicación de enmiendas orgánicas (compost, biocarbón), interacciona positivamente con el crecimiento vegetal y el desarrollo de la simbiosis MA, estudios que actualmente se encuentran en curso y que representan una oportunidad cierta de desarrollo de estrategias de mitigación del daño ocasionado por numerosas actividades industriales contaminantes.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al programa FONDECYT-CONICYT (Chile) que ha financiado el desarrollo de esta línea de investigación desde el año 2007 a través de los proyectos 3070052, 3120213, 3130390, 11080131, 11140508, 11150480 y 1120890. L. Gil-Cardeza agradece a PICT 2013 N°100, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, CONICET, Argentina.

## Bibliografía

- ADRIANO, D.C. 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risk of Metals, Springer-Verlag, Nueva York.
- ADRIANO, D.C.; WENZEL, W.W.; VANGRONVELD, J.; BOLAN, N.S. 2004. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* 122:121-142.
- AGUILERA, P.; BORIE, F.; SEGUEL, A.; CORNEJO, P. 2011. Fluorescence detection of aluminum in arbuscular mycorrhizal fungal structures and glomalin by using laser scanning confocal microscopy. *Soil Biol. Biochem.* 43: 2427-2431.
- AKHTAR, M.; MALIK, A. 2000. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. *Bioresour. Technol.* 74: 35-47.
- ALGUACIL, M.M.; TORRECILLAS, E.; CARAVACA, F.; FERNANDEZ, D.A.; AZCÓN, R.; ROLDAN, A. 2011. The application of an organic amendment modifies the arbuscular mycorrhizal fungal communities colonizing native seedlings grown in a heavy metal- polluted soil. *Soil Biol. Biochem.* 43: 1498-1508.
- ANDRADE, S.A.L.; SILVEIRA, A.P.D.; MAZZAFERA, P. 2010. Arbuscular mycorrhiza alters metal uptake and the physiological response of *Coffea Arabica* to increasing Zn and Cu concentrations in soil. *Sci. Total Environ.* 408: 5381-5391.

- ARRIAGADA, C.; ALMONACID, L.; CORNEJO, P.; GARCIA-ROMERA, I.; OCAMPO, J. 2014. Influence of an organic amendment comprising saprophytic and mycorrhizal fungi on soil quality and growth of *Eucalyptus globulus* in the presence of sewage sludge contaminated with aluminium. Arch. Agron. Soil Sci. 60: 1229-1248.
- AUDET, P.; CHAREST, C. 2006. Effects of AM colonization on 'wild tobacco' plants grown in zinc-contaminated soil. Mycorrhiza 16: 277-283.
- AZCÓN, R.; MEDINA, A.; ROLDÁN, A.; BIRÓ, B.; VIVAS, A. 2009. Significance of treated agrowaste residue and autochthonous inoculates (arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus cereus*) on bacterial community structure and phytoextraction to remediate soil contaminated with heavy metals. Chemosphere 75:327-334.
- BAREA, JM.; PALENZUELA, J.; CORNEJO, P.; SÁNCHEZ-CASTRO, I.; NAVARRO-FERNÁNDEZ, C.; LÓPEZ-GARCÍA, A.; ESTRADA, B.; AZCÓN, R.; FERROL, N.; AZCÓN-AGUILAR, C. 2011. Ecological and functional roles of mycorrhizas in semi-arid ecosystems of Southeast Spain. J. Arid Environ. 75:1292-1301.
- BAREA, J.M.; POZO, M.J.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. 2005. Microbial co-operation in the rizosphere. J. Exper. Bot. 56: 1761: 1778.
- BASHAN, Y.; SALAZAR, B.G.; MORENO, M.; LOPEZ, B.R.; LINDERMAN, R.G. 2012. Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. J. Environ. Manage. 102: 26-36.
- BOLAN, N.S.; ADRIANO, D.C.; MANI, A.P.; DURAISAMY, A. 2003. Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils. II. Effect of lime compost. Plant Soil 251: 187-198.
- CARAVACA, F.; ALGUACIL, M.M.; AZCON, R.; PARLADE, J.; TORRES, P.; ROLDAN, A.; 2005. Establishment of two ectomycorrhizal shrub species in a semiarid site after in situ amendment with sugar beet, rock phosphate, and *Aspergillus niger*. Microb. Ecol. 49: 73-82.
- CASTALDI, P.; SANTONA, L.; MELIS, P. 2005. Heavy metal immobilization by chemical amendments in a polluted soil and influence on white lupin growth. Chemosphere 60: 365-371.
- CHEN, J.J.; ZHOU, J.M.; GOLDSBROUGH, P.B. 1997. Characterization of phytochelatin synthase from tomato. Physiologia Plantarum 101:165-172.
- CHIU, C.C.; CHENG, C.J.; LIN, T.H.; JUANG, K.W.; LEE, D.Y. 2009. The effectiveness of four organic matter amendments for decreasing resin-extractable Cr (VI) in Cr (VI)-contaminated soils. J. Hazard. Mater. 161: 1239-1244.
- CICCU, R.; GHIANI, M.; SERCI, A.; FADDA, S.; PERETTI, R.; ZUCCA, A. 2003. Heavy metal immobilization in the mining-contaminated soils using various industrial wastes. Miner. Eng. 16:187-192.
- COBBETT, C.S.; GOLDSBROUGH, P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 53:159-182.
- COGGER, C.G. 2005. Potential compost benefits for restoration of soils disturbed by urban development. Compost Sci. Utiliz. 13 (4): 243-251.
- COYLE, P.; PHILCOX, J.C.; CAREY, L.C.; ROFE, A.M. 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. Cell. Mol. Life Sci. 59: 627-647.
- COMISIÓN CHILENA DEL COBRE (COCHILCO). 2010. Recopilación de estudios 2010: Mercados e Insumos Estratégicos para la minería en Chile. COCHILCO, Chile, p. 238.
- COOPERBAND, L. 2002. Building soil organic matter with organic amendments. Center for Integrated Agricultural Systems. University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin.

- CORNEJO, P. 2006. Influencia de la cobertura vegetal sobre la diversidad y estructura de las comunidades de hongos micorrízicos y sus efectos en la estabilización de suelos degradados. Editorial Universidad de Granada. Disertación de tesis doctoral, Universidad de Granada, Facultad de ciencias.
- CORNEJO, P.; MEIER, S.; BORIE, G.; RILLIG, M.; BORIE, F. 2008a. Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. *Sci. Total Environ.* 406:154-160.
- CORNEJO, P.; PÉREZ-TIENDA, J.; MEIER, S.; VALDERAS, A.; BORIE, F.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. 2013. Copper compartmentalization in spores as a survival strategy of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Soil Biol. Biochem.* 57: 925-928.
- CORNEJO, P.; SIEVERDING, E.; BORIE, F. 2008b. Arbuscular mycorrhizal communities associated to four metallophytes in a mediterranean ecosystem affected by cooper mining. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 8:215-216.
- CURAQUEO, G.; BAREA, JM.; ACEVEDO, E.; RUBIO, R.; CORNEJO, P.; BORIE, F. 2011. Effects of different tillage system on arbuscular mycorrhizal fungal propagules and physical properties in a Mediterranean agroecosystem in central Chile. *Soil Till. Res.* 113: 11-18.
- CURAQUEO, G.; MEIER, S.; KHAN, N.; CEA, M.; NAVIA, R. 2014a. Use of biochar on two volcanic soils: effects on soil properties and barley yield. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 14:911-924.
- CURAQUEO, G.; SCHOEBITZ, M.; BORIE, F.; CARAVACA, F.; ROLDÁN, A. 2014b. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and addition of composted olive-mill waste enhance plant establishment and soil properties in the regeneration of a heavy metal-polluted environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21:7403-7412.
- DAKORA, F.D.; PHILLIPS, D.A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* 245:35-47.
- DHALA, B.; THATOIB, H.N.; DASC, N.N.; PANDEYA, B.D. 2013. Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: a review. *J. Hazard. Mater.* 250-251:272-291.
- DEL VAL, C.; BAREA, JM.; AZCÓN-AGUILAR, C. 1999. Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. *Appl. Soil Ecol.* 11:261-269.
- DE GREGORI, I.; FUENTES, E.; ROJAS, M.; PINOCHET, H.; POTIN-GAUTIER, M. 2003. Monitoring of cooper, arsenic and antimony levels in agricultural soils impacted and non-impacted by mining activities, from three regions in Chile. *J. Environ. Monitor.* 5:287-295.
- DEROME, J. 2009. Detoxification and amelioration of heavy metal contaminated forest soils by means of liming and fertilization. *Environ. Pollut.* 107: 79-88.
- DRIVER, J.D.; HOLBEN, W.E.; RILLIG, M.C. 2005. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil. Biol. Biochem.* 37: 101-106.
- FAVOINO, E.; HOGG, D. 2008. The potential role of compost in reducing greenhouse gases. *Waste Manage. Res.* 26: 61-69.
- FERNÁNDEZ, D.A.; ROLDÁN, A.; AZCÓN, R.; CARAVACA, F.; BÄÄTH, E. 2012. Effects of water stress, organic amendment and mycorrhizal inoculation on soil microbial community structure and activity during the establishment of two heavy metal-tolerant native plant species. *Microbial Ecol.* 63:794-803.
- FERREIRA, P.; CERETTA, C.; HILDEBRANDT, H.; TIECHER, T.; SOARES, C.; ROSSATO, L.; NICOLOSO, F.; BRUNETTO, G.; PARANHOS, J.; CORNEJO, P. 2015. *Rhizophagus clarus* and phosphate alter the physiological responses of *Crotalaria juncea* cultivated in soil with a high Cu level. *Appl. Soil Ecol.* 91: 37-47.
- FESTA, R.A.; THIELE, D.J. 2011. Copper: an essential metal in biology. *Curr. Biol.* 8: R877-83.



- FISHER, D.S.; GLASER, B. 2012. Synergisms between compost and biochar for sustainable soil amelioration. En: Kumar, S. (ed.). Management of organic waste. InTech, Rijeka, Croacia. pp. 167-198.
- GADKAR, V.; RILLIG, M.C. 2006. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. *FEMS Microbiol. Lett.* 263:93-101.
- GAUR, A.; ADHOLEYA, A. 2004. Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Curr. Sci.* 86: 528-534.
- GIL-CARDEZA, M.L.; FERRI, A.; CORNEJO, P.; GOMEZ, E. 2014. Distribution of chromium species in a Cr-polluted soil: Presence of Cr(III) in glomalin related protein fraction. *Science of the Total Environment* 493:828-833.
- GINOCCHIO, R. 2000. Effects of a copper smelter on a grassland community in the Puchuncaví Valley, Chile. *Chemosphere* 41: 15-23.
- GINOCCHIO, R.; BAKER, A. 2004. Metalófitas en América Latina: Un recurso biológico y genético único poco conocido y estudiado en la región. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 77: 185-194.
- GONZÁLEZ, I.; CISTERNAS, M.; NEAMAN, A. 2008. Acumulación de cobre en una comunidad vegetal afectada por contaminación minera en el valle de Puchuncaví, Chile Central. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 81:279-291.
- GONZALEZ, V.; GARCIA, I.; DEL MORAL, F.; SIMON, M. 2012. Effectiveness of amendments on the spread and phytotoxicity of contaminants in metal-arsenic polluted soil. *J. Hazard. Mater.* 205-206:72-80.
- GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M.C.; D'HAEN, J.; VANGROSVELD, J.; DODD, J. 2002. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of three arbuscular mycorrhizal fungi isolated from the same polluted soil. *Plant Soil* 240: 287-297.
- GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; BENABDELLAH, K.; VALDERAS, A.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. 2010. GintABC1 encodes a putative ABC transporter of the MRP subfamily induced by Cu, Cd, and oxidative stress in *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* 20:137-146.
- GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; CANO, C.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. 2007. Gint MT1 encodes a functional metallothionein in *Glomus intraradices* that responds to oxidative stress. *Mycorrhiza* 17: 327-335.
- GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; MELVILLE, L.; FERROL, N.; LOTT, J.; AZCÓN-AGUILAR, C.; PETERSON, R. 2008. Ultrastructural localization of heavy metals in the extraradical mycelium and spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Can. J. Microbiol.* 54: 103-110.
- GRANDY, A.S.; PORTER, G.A.; ERICH, M.S. 2002. Organic Amendment and Rotation Crop Effects on the Recovery of Soil Organic Matter and Aggregation in Potato Cropping Systems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 66:1311-1319.
- HALL, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53:1-11.
- HAMER, D.H. 1986. Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 913-951.
- HILDEBRANDT, U.; REGVAR, M.; BOTHE, H. 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 68:139-146.
- HOUBEN, D.; PIRCAR, J.; SONNET, P. 2012. Heavy metal immobilization by cost-effective amendments in a contaminated soil: effects on metal leaching and phytoavailability. *J. Geochem. Explor.* 123:87-94.
- HSU, N.H.; WANG, S.L.; LIN, Y.C.; SHENG, G.D.; LEE, J.F. 2009. Reduction of Cr(VI) by crop-residue-derived black carbon. *Environ. Sci. Technol.* 43: 8801-8806.
- JAMES, B.R. 1996. The complex chemistry of chromium compounds presents unique measurement and regulatory challenges. *Environ. Sci. Technol.* 30:248A-251A.
- JAVOT, H.; PUMPLIN, N.; HARRISON, J. 2007. Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport

properties and regulatory roles. *Plant Cell Environ.* 30: 310-322.

JONES, D.L. 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil* 205:25-44.

JONES, D.L.; DARRAH, P.R. 1994. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant Soil* 166:247-257.

KAMPFENKEL, K.; KUSHNIR, S.; BABIYCHUK, E.; INZE, D.; VAN, M.M. 1995. Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J. Biol. Chem.* 270: 28479-28486.

KHAN, A.G. 2001. Relationships between chromium biomagnification ratio, accumulation factor, and mycorrhizae in plants growing on tannery effluent-polluted soil. *Environment International.* 26:417-423.

LEHMANN, J. 2007. Bio-energy in the black. *Front. Ecol. Environ.* 5: 381-387.

LÓPEZ-PEDROSA, A.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; VALDERAS, A.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. 2006. *GintAMT1* encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genet. Biol.* 43: 102-110.

MEDINA, J.; MEIER, S.; RUBIO, R.; CURAQUEO, G.; BORIE, F.; AGUILERA, P.; OEHL, F.; CORNEJO, P. 2015a. Arbuscular mycorrhizal status of pioneer plants from the mouth of lake Budi, Araucanía Region, Chile. *J. Soil Sc. Plant Nutr.* 15:147-157.

MEDINA, J.; MONREAL, C.; BAREA, J.M.; ARRIAGADA, C.; BORIE, F.; CORNEJO, P. 2015b. Crop Residue Stabilization and Applications to Agricultural and Degraded Soils: A review. *Waste Manage.* 42:41-54.

MEIER, S.; AZCÓN, R.; CARTES, P.; BORIE, F.; CORNEJO, P. 2011. Alleviation of Cu toxicity in *Oenothera picensis* by copper adapted arbuscular mycorrhizal fungi and treated agrowaste residue. *Appl. Soil Ecol.* 48(2):117-124.

MEIER, S.; BORIE, F.; BOLAN, N.; CORNEJO, P. 2012a. Phytoremediation of metal polluted soils by arbuscular mycorrhizal fungi. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 42: 741-775.

MEIER, S.; BORIE, F.; CURAQUEO, G.; BOLAN, N.; CORNEJO, P. 2012b. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on metallophyte agricultural plants growing at increasing copper levels. *Appl. Soil Ecol.* 61:280-287.

MEIER, S.; CORNEJO, P.; CARTES, P.; BORIE, F.; MEDINA, J.; AZCÓN, R. 2015. Interactive effect between Cu-adapted arbuscular mycorrhizal fungi and biotreated agrowaste residue to improve the nutritional status of *Oenothera picensis* growing in Cu-polluted soils. *J Plant Nutr. Soil Sci.* 178: 126-135.

MEIER, S.; CURAQUEO, G.; KHAN, N.; BOLAN, N.; CEA, M.; GONZÁLEZ, M.E.; CORNEJO, P.; OK, Y.; BORIE, F. 2015a. Chicken manure-derived biochar reduce the bioavailability of copper in a contaminated soil. *J. Soil Sediment.* In press. DOI: 10.1007/s11368-015-1256-6

MEIER, S.; CURAQUEO, G.; KHAN, N.; BOLAN, N.; RILLING, J.; VIDAL, C.; FERNÁNDEZ, N.; ACUÑA, J.; GONZÁLEZ, M.E.; CORNEJO, P.; BORIE, F. 2015b. Effects of biochar on copper immobilization and soil microbial communities in a metal-contaminated soil. *J Soil Sediment.* In press. DOI 10.1007/s11368-015-1224-1

MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE (MMA). 2011. Informe del estado del medio ambiente. Gobierno de Chile. p. 511.

MONDINI, C.; CAYUELA, M.L.; SINICCO, T.; CORDARO, F.; ROIG, A.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M.A. 2007. Greenhouse gas emissions and carbon sink capacity of amended soils evaluated under laboratory conditions. *Soil Biol. Biochem.* 39: 1366-1374.

MURPHY, A.; TAIZ, L. 1995. Comparison of metallothionein gene expression and non protein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. *Plant Physiol.* 109:945-54.

- NEAL, R.H.; SPOSITO, G. 1986. Effects of soluble organic matter and sewage sludge amendments on cadmium sorption by soils at low cadmium concentrations. *Soil Sci.* 142: 164-172.
- NEUMANN, G.; ROEMHELD, V. 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil* 211:121-130.
- NIELSEN, S.S.; PETERSEN, L.R.; KJELDEN, P.; JAKOBSEN, R. 2011. Amendment of arsenic and chromium polluted soil from wood preservation by iron residues from water treatment. *Chemosphere* 84: 383-389.
- NIGAM, R.; SRIVASTAVA, S.; PRAKASH, S.; SRIVASTAVA, M.M. 2001. Cadmium mobilisation and plant availability – the impact of organic acids commonly exuded from roots. *Plant and Soil* 230:107-113.
- PARK, J.H.; LAMB, D.; PANEERSELVAM, P.; CHOPPALA, G.; BOLAN, N.; CHUNG, J.W. 2011. Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. *J. Hazard. Mater.* 185: 549-574.
- PARK, J.H.; CHOPPALA, G.K.; BOLAN, N.S.; CHUNG, J.W.; CHUASAVATHI, T. 2011. Biochar reduces the bioavailability and phytotoxicity of heavy metals. *Plant Soil* 348: 439-451.
- PÉREZ-DE-MORA, A.; BURGOS, P.; MADEJON, E.; CABRERA, F.; JAECKEL, P.; SCHLOTTER, M. 2006. Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments. *Soil Biol. Biochem.* 38: 327-341.
- PILON, M. 2011. Moving copper in plants. *New Phytol.* 192:2.
- PILON-SMITS, E. 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 15-39.
- QUARTACCI, M.; IRTELLI, B.; GONELLI, C.; GABBRIELLI, R.; NAVARI-IZOO, F. 2009. Naturally-assisted phytoextraction by *Brassica carinata*: Role of root exudates. *Environmental Pollution* 157:2697-2703.
- REQUENA, N.; PÉREZ-SOLIS, E.; AZCÓN-AGUILAR, C.; JEFFRIES, P.; BAREA, J.M. 2001. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:495-498.
- RILLIG, M.C.; WRIGHT, S.F.; NICHOLS, K.A.; SCHMIDT, W.F.; TORN, M.S. 2001. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant Soil* 233: 167-177.
- SARABIA, R.; DEL RAMO, J.; DÍAZ-MAYANS, J.; TORREBLANCA, A. 2003. Developmental and reproductive effects of low cadmium concentration on *Artemia parthenogenetica*. *J. Environ. Sci. Health. Part A.* 6: 1065-1071.
- SCHAT, H.; VAN HOOFF, N.A.; TERVAHOUTA, A.; HAKVOORT, H.W.J.; CHARDONNENS, A.N.; KOEVOETS, P.L.M.; VERKLEIJ, J.A.C.; ERNST, W.H.O. 2000. Evolutionary responses to zinc and copper stress in Bladder Campion, *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. En: Cherry, J.H.; Locy, R.D.; Richter, A. (ed.). *Plant tolerance to abiotic stresses: role of genetic engineering*. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers, Países Bajos. pp. 343-360.
- SEGUEL, A.; BAREA, J.M.; CORNEJO, P.; BORIE, F. 2015. Role of arbuscular mycorrhizal propagules and glomalin related soil protein in Al tolerance of two barley cultivars growing in acid soils with high Al levels. *Crop Pasture Sci.* 66:696-705.
- SMITH, S.E.; READ, D.J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press. San Diego. 787.
- SOHI, S.P.; KRULL, E.; LOPEZ-CAPEL, E.; BOL, R. 2010. A Review of Biochar and Its Use and Function in Soil. *Adv. Agron.* 105: 47-82.
- SRINIVASAN, V.; MAHESWARAPPA, H.P.; LAL, R. 2012. Long term effects of topsoil depth and amendments on particulate and non particulate carbon fractions in a Miamian soil of Central Ohio. *Soil Till. Res.* 121: 10-17.

- TAMAYO, E.; GÓMEZ-GALLEGO, T.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. 2014. Genome-wide analysis of copper, iron and zinc transporters in the Arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Plant Sci.* 5: 1-13.
- THIES, J.; RILLIG, M.C. 2009. Characteristics of biochar: biological properties. En: Lehmann and Joseph (Eds.), *Biochar for environmental management*. Earthscan. Londres.
- VALARINI, P.J.; CURAQUEO, G.; SEGUEL, A.; MANZANO, K.; RUBIO, R.; CORNEJO, P.; BORIE, F. 2009. Effect of compost application on some properties of a volcanic soil from Central South Chile. *Chil. J. Agric. Res.* 69:416-425.
- VÖGEL-MIKUS, K.; PONGRAC, P.; KUMP, P.; NECEMER, M.; REGVAR, M. 2006. Colonization of a Zn, Cd and Pb hyper accumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. *Environ. Pollut.* 139: 362-371.
- WARNOCK, D.; LEHMANN, J.; KUYPER, T.W.; RILLIG, M. 2007. Mycorrhizal responses to biochar in soil-concepts and mechanisms. *Plant Soil* 300: 9-20.
- WAKAO, N.; KOYATSU, H.; KOMAI, Y.; SHIMOKAWARA, H.; SAKURAI, Y.; SHIOTA, H.; 1988. Microbial oxidation of arsenite and occurrence of arsenite-oxidizing bacteria in acid mine water from a sulfur-pyrite mine. *Geomicrobiol. J.* 6: 11-24.
- WRIGHT, S.F.; UPADHYAYA, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 198: 97-107.

## CAPÍTULO 21

### Ecología microbiana del proceso de compostaje de suelo contaminado con petróleo

Luciana Paula Di Salvo<sup>1</sup>, Jhovana Silvia Escobar Ortega<sup>1</sup>, Inés Eugenia García de Salamone<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Av. San Martín 4453, Buenos Aires 1417, Argentina

E-mail : [igarcia@agro.uba.ar](mailto:igarcia@agro.uba.ar)

#### Introducción

En la actualidad, la principal fuente de energía proviene de la quema de combustibles fósiles. Las actividades relacionadas con la exploración, la extracción y el transporte del petróleo y sus derivados generan eventos de contaminación de suelos (Margesin *et al.*, 2007). El petróleo, tal como existe en la naturaleza, es un conjunto heterogéneo de diferentes compuestos mayoritariamente carbonados, sustancias azufradas y nitrogenadas, por lo que su composición varía entre los diferentes yacimientos (Rosenberg y Ron, 1998). Los compuestos carbonados presentan diferente peso molecular y complejidad de sus enlaces; los de más alta complejidad, como resinas y asfaltenos, son considerados resistentes a la degradación (Leahy y Colwell, 1990), mientras que el resto de los compuestos, que presentan distinta capacidad de biodegradación, se los clasifica bajo el nombre de hidrocarburos totales del petróleo (HTP).

Un suelo contaminado con hidrocarburos presenta alteración de su estructura, retención hídrica y saturación de bases, lo que determina la modificación sus propiedades biológicas y fertilidad (Pérez Vargas *et al.*, 2002). El principal mecanismo de recuperación de suelo contaminados es la degradación biológica (Dean *et al.*, 2001). Esto es posible dado que en todos los ecosistemas existen microorganismos capaces de degradar sustancias altamente complejas (Ércoli *et al.*, 2000; Madigan *et al.*, 2006). Los microorganismos, en su mayoría heterótrofos, utilizan los hidrocarburos como fuente de carbono y energía produciendo dióxido de carbono, agua, biomasa microbiana y otros compuestos con diferente grado de oxidación (Davis, 1967). La tasa a la cual las sustancias más complejas son biodegradadas depende de la capacidad de los microorganismos de adaptarse a la nueva condición ambiental, luego de ocurrido un evento de contaminación (Zucchi *et al.*, 2003). En algunos ambientes, y bajo determinadas condiciones, los tiempos necesarios para la biodegradación pueden ser excesivos, por lo cual se vuelve necesario promover la actividad microbiana, utilizando alguna técnica de biorremediación (Medaura *et al.*, 2007).

La remediación de suelos contaminados resulta una temática de estudio de gran importancia (Abbassi y Shquirat, 2008). Actualmente se prefieren los métodos de descontaminación biológica frente a los métodos convencionales debido a que estos últimos producen generalmente intermediarios tóxicos (Dua, 2002) y son menos efectivos y más costosos (Paul *et al.*, 2005). La biorremediación ha probado ser la más efectiva para solucionar los problemas asociados a los suelos contaminados (Bonaventura y Johnson, 1996; Crawford y Crawford, 2005). Entre las numerosas estrategias de biorremediación de suelos contaminados se encuentra la técnica de compostaje. Esta se basa en estimular la actividad de los microorganismos aerobios termófilos mediante la formación de pilas de material, también llamadas biopilas, resultado de la mezcla del suelo contaminado con residuos de plantas o animales, periódicamente humedecidas y aireadas (Barker y Bryson, 2002). Algunos autores encontraron resultados satisfactorios utilizando esta estrategia para la formación de complejos metales-materia orgánica (Kandeler *et al.*, 2000) y para la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Loick *et al.*, 2009).

La biorremediación de los contaminantes en el proceso de compostaje constituye un proceso complejo, llevado a cabo por el crecimiento de grupos microbianos que actúan en forma sucesiva y complementaria. La evaluación de diferentes variables microbiológicas indicadoras durante dicho proceso constituye la herramienta que permite evaluar cómo se produce la degradación del contaminante en el suelo y el proceso de humificación. Ciertas variables fisicoquímicas, que facilitan los procesos microbiológicos, también pueden ser evaluadas en relación con estos (Rutigliano *et al.*, 2004). El objetivo de este trabajo ha sido contribuir al conocimiento de la microbiología asociada al proceso de compostaje de suelos contaminados con petróleo mediante la evaluación de la eficiencia de diferentes tratamientos de compostaje para reducir la concentración de HTP y el estudio de la dinámica de las principales comunidades microbianas durante dicho proceso.

## **Metodología**

Se realizaron dos ensayos con diferentes objetivos en cada uno de ellos. Ambos fueron llevados a cabo en distintos yacimientos de extracción de petróleo diferentes, ubicados en Malargüe, provincia de Mendoza. La instalación de las biopilas correspondientes así como su mantenimiento y muestreo estuvieron a cargo de personal de los yacimientos. Para el armado de las biopilas se utilizó suelo contaminado durante las actividades de extracción en cada yacimiento, a los fines de evitar el transporte del suelo contaminado. Este suelo había sido almacenado en repositorios. Ambos ensayos se realizaron sobre plataformas de cemento con pendiente y canalización para que los posibles efluentes generados durante el proceso de compostaje no infiltren en el perfil de suelo.

El primero de los ensayos tuvo por objetivo la evaluación de la eficiencia de diferentes mezclas para el compostaje del suelo contaminado. Se realizó en el yacimiento Pampa Palauco. La

primera mezcla, desde ahora tratamiento PP1, consistió en suelo contaminado con agregado de guano caprino en proporción 70:30. La segunda mezcla, desde ahora tratamiento PP2, consistió en suelo contaminado con agregado de guano caprino y aserrín en proporción 66:25:9, y con agregado de 60 kg de azufre. La tercera y última mezcla, desde ahora tratamiento PP3, fue el suelo contaminado sin agregados, a modo de control. Cada tratamiento contó con dos biopilas independientes. El volumen de material de cada biopila fue de 15 m<sup>3</sup>. La aireación de cada una de ellas se realizó mediante la inyección de aire en forma mecánica a través de una bomba central y de cañerías que estaban ubicadas debajo de cada una de las biopilas.

El segundo de los ensayos tuvo por objetivo el aumento de la escala de trabajo y el monitoreo de la eficiencia de biorremediación en esta. Se realizó en el yacimiento Los Cavaos. El aumento en la escala de trabajo tuvo por objetivo obtener resultados simulando las condiciones necesarias para que la industria pueda remediar la contaminación que genera en el yacimiento. Para este ensayo se utilizó una mezcla de suelo contaminado con agregado de guano caprino en proporción 90:10. Se realizó el monitoreo del proceso de compostaje bajo diferentes mecanismos de aireación y la evaluación de la dinámica de las comunidades microbianas bajo estas condiciones. Uno de los mecanismos de aireación utilizados fue el sistema estático de aireación utilizado en el primer ensayo. A la biopila aireada mediante este mecanismo se la denominará desde ahora biopila BA. El segundo mecanismo evaluado fue el volteo del material con pala mecánica, desde ahora biopila BV. Otro mecanismo evaluado constituyó un tratamiento testigo sin remoción mecánica ni aireación forzada, desde ahora biopila BM. Finalmente, la biopila control de suelo contaminado estuvo compuesta por el suelo contaminado únicamente, sin adición de material para el compostaje, desde ahora biopila BS. El volumen de material de la biopila BS fue de 15 m<sup>3</sup>, mientras que el volumen de las biopilas BA, BV y BM fue de 200 m<sup>3</sup>. Debido a los tratamientos dados, a la cantidad de material, y de manera tal de monitorear el proceso de compostaje en toda la profundidad de la biopila, las muestras de los tratamientos BA, BV y BM fueron obtenidas de tres profundidades diferentes: superficial, media y profunda. En el caso de la biopila BS, como el volumen de material fue menor, se realizó un muestreo compuesto del total de la biopila.

En ambos los ensayos se realizaron muestreos programados durante el proceso de compostaje. En el ensayo de eficiencia de mezclas para compostaje se tomaron las muestras al día de inicio del proceso de compostaje y a los 15, 30, 93 y 159 días de iniciado (DDI) el proceso, fueron cinco muestreos en total. En el ensayo escala y monitoreo de eficiencia se tomaron las muestras al día de inicio del proceso de compostaje y a los 30, 50, 85, 106, 169 DDI el proceso, fueron seis muestreos en total. Cada una de las muestras de cada biopila constituyó una muestra compuesta del total de la biopila o de la profundidad a muestrear, según correspondiese. Las muestras fueron trasladadas refrigeradas al laboratorio y mantenidas en cámara fría a 4 °C hasta el día de comienzo de su procesamiento, no más allá de los 30 días de arribada la muestra al laboratorio. Cada una de las muestras compuestas recibidas se homogeneizó y se fraccionó en tres

submuestras para realizar las determinaciones por triplicado. Además de las muestras también fue analizado el guano utilizado para el armado de las biopilas.

La determinación del contenido de HTP se realizó siguiendo la norma de la Environmental Protection Agency (EPA) 418,1 modificada para suelos. La humedad se determinó con el detector de humedad MP406 (ICT International Ltd., Armidale, Australia). El pH se determinó según protocolo 9045C de la EPA. Se determinó el contenido de ácidos húmicos, huminas y ácidos fúlvicos según describen Paul y Clark (1996). El nitrógeno total se determinó de acuerdo al método descrito por el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (SMEWW, 1999), modificado para suelos. Además, se determinó fósforo disponible de acuerdo con Bray y Kurtz mediante el método descrito por Jackson (1976), y concentraciones de carbono oxidable, nitrato (N-NO<sub>3</sub>) y amonio (N-NH<sub>4</sub>) según Alef y Nannipieri (1998).

Para realizar las determinaciones microbiológicas se realizaron diluciones decimales (Madigan *et al.*, 2006) a partir de cada una de las muestras. Con estas diluciones se realizaron recuentos de bacterias totales, hongos y actinomicetes en placas de Petri con medios adecuados para cada uno ellos, según metodología de recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) descrita en Alef y Nannipieri (1998). Para el recuento de bacterias totales se utilizó medio Agar Triptona de Soja (TSA) marca Oxoid® (Hampshire, Reino Unido). Por su parte, para el recuento de hongos y actinomicetes se utilizó el medio Agar Extracto de Malta marca Oxoid® (Hampshire, Reino Unido), con agregado del colorante rosa de Bengala. Las diluciones utilizadas para el recuento de bacterias totales fueron calentadas a 80 °C durante 10 minutos para conservar viables únicamente los microorganismos esporulados. Luego de dejar enfriar a temperatura ambiente, las diluciones fueron sembradas en medio TSA para el recuento de *Bacillus* sp. A partir de las placas de bacterias totales y mediante el uso de un replicador de metálico estéril, se sembraron placas de Petri conteniendo medio *Pseudomonas* Agar F marca Merck® (Nueva Jersey, EUA) con agregado de glicerina (10 ml L<sup>-1</sup>). Finalmente, se realizaron recuentos de microorganismos degradadores de hidrocarburos mediante la siembra en medio mínimo con agregado de kerosene como única fuente de carbono (D'Auria, 2012). Las placas de todos los recuentos se incubaron a 28 °C durante cuatro días, período luego del cual se realizó el recuento de colonias (Alef y Nannipieri, 1998).

Las mismas diluciones decimales se utilizaron para el recuento de microorganismos nitrificadores, celulolíticos y coliformes, según la metodología del Número Más Probable (NMP) descrita en Alef y Nannipieri (1998). Para el recuento de microorganismos nitrificadores se utilizaron microplacas de 96 celdas con 200 µl del medio mineral para nitrificadores (Alef y Nannipieri, 1998) en cada celda, adaptando la metodología descrita por Rorig *et al.* (2004). Para el caso del recuento de microorganismos celulolíticos se utilizaron tubos de ensayo que contenían 9 ml de medio mineral para celulolíticos, con tiras de papel de filtro estériles como única fuente carbonada (Alef y Nannipieri, 1998). Para el caso del recuento de microorganismos coliformes se utilizaron tubos de ensayo que contenían 9 ml de caldo MacConkey marca Oxoid® (Hampshire, Reino Unido) con



campanitas Durham (Alef y Nannipieri, 1998). Las microplacas se incubaron en estufa a 28 °C, durante quince días. Los tubos de recuentos de microorganismos coliformes y celulolíticos se incubaron en estufa a 28 °C durante siete y treinta días, respectivamente. Luego del período de incubación, para determinar el número característico que requiere la metodología del NMP (Lorch *et al.*, 1998), cada uno de los tubos o celdas se comparó con un blanco que contenía el mismo medio de cultivo, pero estéril. En el caso de los microorganismos nitrificadores, la determinación del contenido de nitritos y nitratos de las celdas sembradas y blanco se realizó mediante bandeletas indicadoras (Quantofix<sup>®</sup>, Macherey-Nagel, Alemania). En el caso de los microorganismos celulolíticos, se utilizó una escala colorimétrica para describir la degradación del papel de filtro. Finalmente, para el caso de los microorganismos coliformes, se determinaron los tubos positivos mediante presencia de turbidez, viraje del colorante indicador de pH y presencia de gas en la campanita Durham. Todos los recuentos se expresaron como el logaritmo de las UFC o NMP, según corresponda por gramo de materia seca (MS).

La diversidad funcional potencial se determinó mediante los perfiles de utilización de fuentes carbonadas (CLPP, por *Community-Level Physiological Profiles*), en microplacas de 96 celdas según metodología descrita por Di Salvo y García de Salamone (2012). La incubación se realizó en estufa a 30 °C y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro Multiskan EX<sup>®</sup> (Labsystems, Finlandia) en cuatro oportunidades, a las 24, 48, 72 y 96 horas. Los datos obtenidos en los recuentos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANVA), y comparación de medias mediante test de Tukey ( $P < 0,05$ ). Aquellas variables que no cumplieron con los supuestos del ANVA, fueron analizadas teniendo en cuenta sus desvíos estándar. Los CLPP de cada muestra se obtuvieron mediante análisis discriminante a partir de los valores de absorbancia de cada una de las celdas. Para los análisis mencionados se utilizó el programa estadístico INFOSTAT/Profesional<sup>®</sup> (Di Rienzo *et al.*, 2011).

## **Resultados y discusión del ensayo de eficiencia de mezclas para compostaje**

Durante el proceso de compostaje ocurrido en este ensayo se observó una disminución del contenido de humedad durante el inicio y una estabilización alrededor del 10 % hacia los últimos meses del proceso (Tabla 1). Además, las diferencias entre tratamientos observadas en las biopilas al inicio del proceso no se observaron al finalizar este. La temperatura, por su parte, presentó un comportamiento bastante similar al del contenido de humedad; las diferencias iniciales fueron aún más acentuadas entre las biopilas PP1 y PP2 con respecto a las biopilas PP3 (Tabla 1).

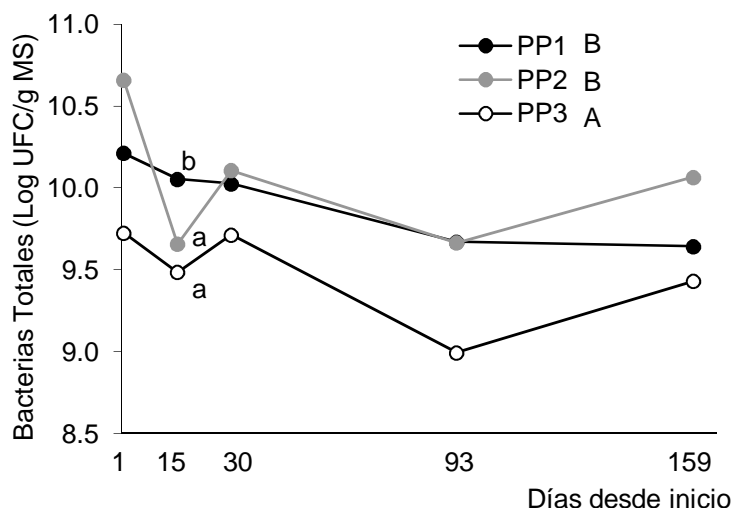
**Tabla 1.** Evolución del contenido de humedad y temperatura durante el proceso de compostaje en el ensayo de eficiencia de mezclas para compostaje.

DDI	Biopila	Humedad (%)	Temperatura (°C)
1	PP1	16,99±0,73	37,5±0,0
	PP2	19,97±0,19	37,5±0,0
	PP3	13,28±0,16	17,5±0,0
15	PP1	14,17±3,06	37,7±0,4
	PP2	15,33±0,00	37,2±0,3
	PP3	12,93±0,04	27,2±4,0
30	PP1	13,87±2,81	23,9±8,6
	PP2	14,25±1,06	25,0±7,1
	PP3	11,52±0,57	17,7±1,0
93	PP1	7,41±0,77	19,1±0,1
	PP2	8,75±1,01	15,8±1,1
	PP3	9,26±0,86	15,0±0,2
159	PP1	10,26±3,68	14,9±0,0
	PP2	8,59±1,73	13,8±1,2
	PP3	8,82±0,36	11,8±0,5

DDI: Días desde inicio del proceso de compostaje.

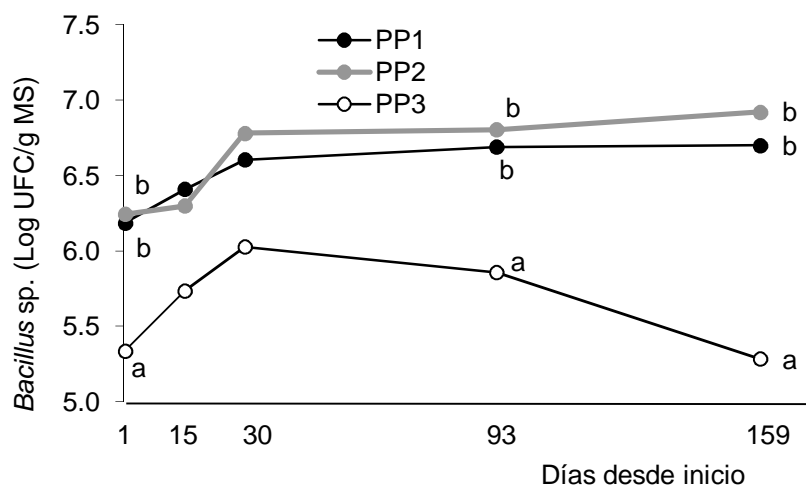
Valores medios ± desvío estándar.

Durante todo el proceso, las biopilas PP1 y PP2, las cuales recibieron enmiendas para compostar, presentaron mayor número de bacterias totales que las biopilas PP3, a las que no se les había adicionado materiales para compostar, pero recibieron aireación (Figura 1). Se observaron diferencias significativas en el segundo muestreo (Figura 1), que estaría coincidiendo con la fase termofílica del compost (Tabla 1). En el compostaje esta fase se alcanza cuando las temperaturas superan los 35 °C, producto de la intensa actividad microbiana. El aumento de la temperatura favorece la proliferación de microorganismos termofílicos, como el género *Bacillus*, y posibilita la eliminación de microorganismos potencialmente patógenos, tales como los microorganismos coliformes. Si bien el aumento de la temperatura no fue mayor a 40 °C tal como resultaba esperable, las mayores temperaturas se registraron únicamente en las biopilas PP1 y PP2, y no en las biopilas PP3 (Tabla 1). Estos datos muestran el efecto de la adición de materiales para compostar sobre el recuento de las bacterias totales durante el proceso. Las diferencias en este recuento, sumadas a las diferencias observadas en el recuento de células viables del género *Bacillus* (Figura 2), coinciden con la ausencia de temperaturas acordes a la fase termofílica en las biopilas PP3.



**Figura 1.** Evolución del número de bacterias totales durante el proceso de compostaje en el ensayo de eficiencia de mezclas para compostaje. Letras distintas indican diferencias significativas, según test de Tukey ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas indican diferencias entre tratamientos para cada muestreo y letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos considerando todos los muestreos del proceso de compostaje.

Tal como es sabido, la cantidad de bacterias presentes en una muestra de compost varía a lo largo del proceso, pero los diversos tipos presentes pueden variar con tendencias opuestas. Kaplan y Kitts (2004) observaron que el aumento en el recuento de bacterias en placas coincidía con el aumento en la degradación del petróleo y con la variación en la diversidad estructural de las bacterias presentes. Zucchi *et al.* (2003) también observaron que el aumento en el recuento de bacterias totales coincidía con el aumento en el recuento de degradadores y el aumento en la diversidad estructural de las bacterias. En este ensayo, en todas las biopilas se produjo una disminución del contenido de HTP (Figura 3) durante las etapas iniciales del proceso de compostaje. En todos los muestreos, así como también durante todo el proceso, las biopilas PP1 y PP2 presentaron significativamente menor cantidad de HTP que las biopilas PP3 (Figura 3). Al finalizar el proceso de compostaje los valores de degradación de HTP respecto a los valores al inicio del proceso fueron de 49 %, 55 % y 17 % menores para las biopilas PP1, PP2 y PP3, respectivamente.

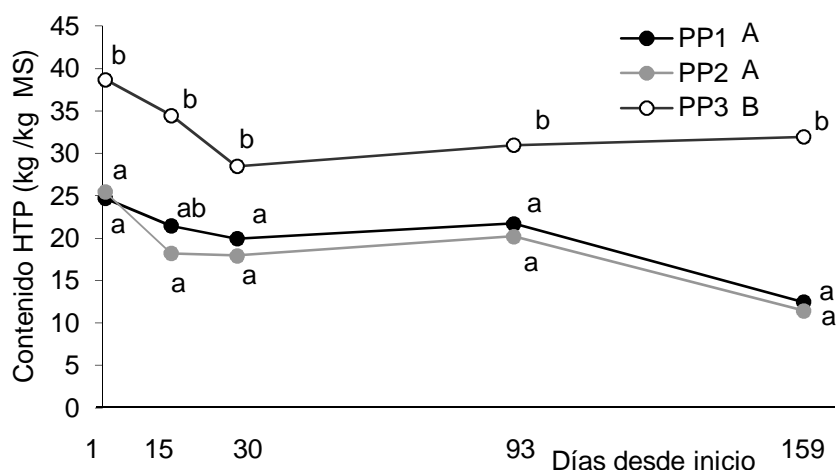


**Figura 2.** Evolución del número de *Bacillus* sp. durante el proceso de compostaje en el ensayo de eficiencia de mezclas para compostaje. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada muestreo, según test de Tukey ( $P < 0,05$ ).

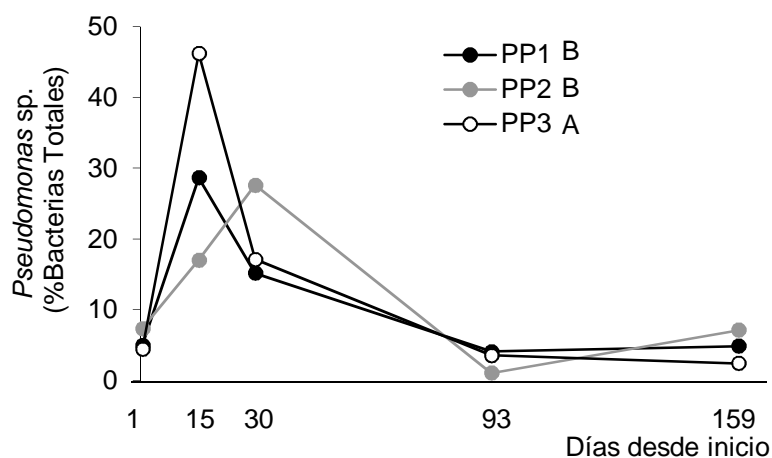
Las biopilas PP1 y PP2 además de presentar en general mayor cantidad de bacterias totales (Figura 1) y menor contenido de HTP (Figura 3) presentaron mayor cantidad de *Bacillus* sp., con evoluciones diferentes entre las distintas biopilas (Figura 2). En la etapa inicial del proceso, se produjo un aumento en el número de UFC de *Bacillus* sp. en las biopilas PP1 y PP2 que se mantuvo en los muestreos sucesivos. Por el contrario, en las biopilas PP3 también se produjo un incremento en el número durante la etapa inicial, pero que disminuyó en los muestreos sucesivos. Otro grupo particular de bacterias, el género *Pseudomonas*, presentó un marcado aumento durante la etapa inicial del proceso de compostaje y una disminución en las etapas finales de este, sin diferencias entre biopilas (Figura 4).

Similares resultados se observaron en el recuento de hongos (Figura 5) y actinomicetes (Figura 6). Las biopilas PP2 presentaron mayor número de UFC de hongos y actinomicetes que las biopilas PP3, a lo largo de casi todo el proceso. Además, las muestras correspondientes a las biopilas PP2 presentaron, también un alto número de microorganismos celulolíticos (Figura 7). Los hongos y actinomicetes son los microorganismos celulolíticos del suelo que inician el proceso de degradación microbiana de macromoléculas, facilitando la intervención de otros microorganismos. Es importante recordar que las biopilas PP2 fueron armadas mediante la mezcla de materiales, como guano caprino y aserrín, a diferencia de las biopilas PP3. Los datos obtenidos en este trabajo muestran la relevancia de los hongos y actinomicetes en la actividad celulolítica. Analizando los coeficientes de correlación de Pearson de los recuentos de hongos y actinomicetes con el recuento de microorganismos celulolíticos se obtuvieron valores de 0,24 y 0,11, respectivamente, con valores de regresión positivos y muy bajos (6 y 1 %, respectivamente). Estos resultados pueden ser explicados, por un lado, debido a que las metodologías de recuento son diferentes en ambos casos ya que en el caso de hongos y actinomicetes fue UFC mientras

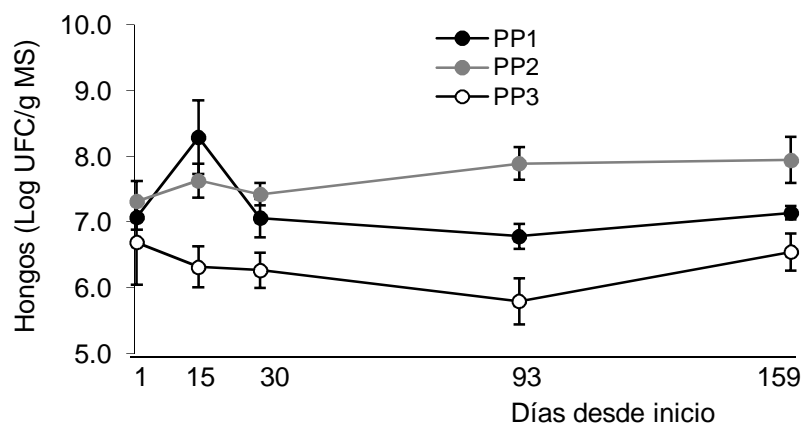
que en el caso de celulolíticos se estimó el NMP. Por otro lado, no todos los hongos y actinomicetes evaluados en el recuento de UFC poseen necesariamente capacidad de celulolisis. Se observó que las variables que presentaron mayor coeficiente de correlación de Pearson con el contenido de HTP fueron los recuentos de hongos (-0,67), de *Bacillus* (-0,89) y de microorganismos celulolíticos (-0,67). El aumento en el recuento de estos microorganismos explicó la reducción del contenido de HTP con un ajuste del 45 %, 79 % y 46 %, respectivamente. Esto, sumado a que se observaron diferencias significativas en los recuentos de bacterias totales y *Bacillus* sp., en el recuento de microorganismos degradadores, y los resultados obtenidos en la evaluación del contenido de HTP (Figura 3) indican que el proceso de compostaje incrementó la cantidad de estos microorganismos y favoreció la degradación de HTP.



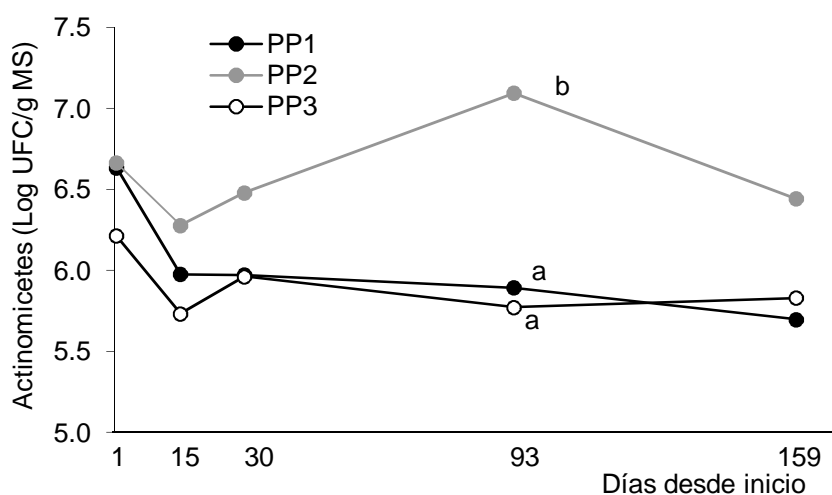
**Figura 3.** Evolución del contenido de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) durante el proceso de compostaje en el ensayo de eficiencia de mezclas para compostaje. Letras distintas indican diferencias significativas, según test de Tukey ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas indican diferencias entre tratamientos para cada muestreo y letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos considerando todos los muestreos del proceso de compostaje.



**Figura 4.** Evolución del porcentaje de *Pseudomonas* sp. durante el proceso de compostaje en el ensayo de eficiencia de mezclas para compostaje.



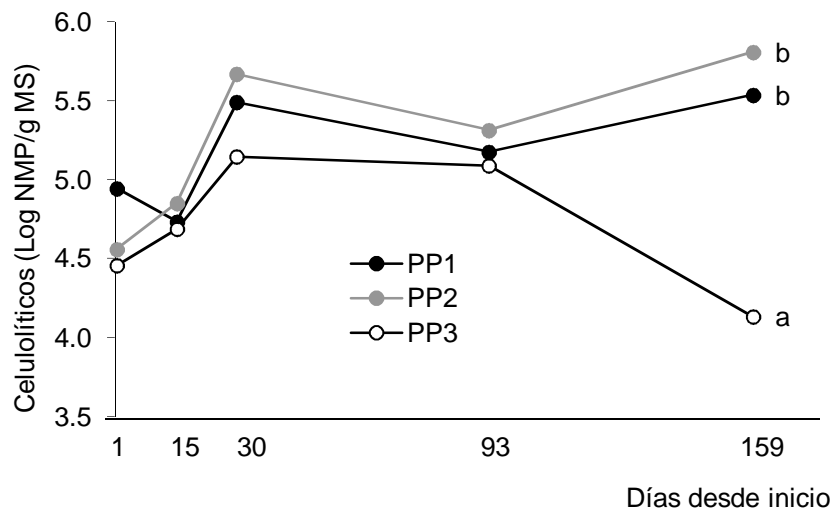
**Figura 5.** Evolución del número de hongos durante el proceso de compostaje en el ensayo de eficiencia de mezclas para compostaje. Las barras indican los desvíos estándar.



**Figura 6.** Evolución del número de actinomicetes durante el proceso de compostaje en el ensayo de eficiencia de mezclas para compostaje. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada muestreo, según test de Tukey ( $P < 0,05$ ).

En este ensayo, el contenido de C oxidable, N total, N-NO<sub>3</sub>, N-NH<sub>4</sub> y P disponible fue diferente entre las distintas biopilas durante todo el proceso de compostaje (Tabla 2). Las variables C oxidable, N-NO<sub>3</sub> y N-NH<sub>4</sub> mostraron diferencias entre las biopilas únicamente durante los primeros muestreos, mientras que las variables N total y P disponible presentaron diferencias entre las biopilas en varios momentos del proceso de compostaje (Tabla 2). Estas diferencias están asociadas al aporte de los materiales que fueron agregados a las biopilas como tratamiento de compostaje. Si bien la degradación de los HTP fue mayor en las biopilas PP1 y PP2, respecto a las biopilas PP3 (Figura 3), el aumento en la producción de sustancias húmicas, en particular huminas y ácidos húmicos, se produjo en forma similar en todas las biopilas (Tabla 2). La

degradación de sustratos y de la materia orgánica del suelo tiene como resultado la producción de sustancias húmicas. Este es el principal resultado esperable de todo proceso de compostaje.



**Figura 7.** Evolución del número de microorganismos celulolíticos durante el proceso de compostaje en el ensayo de eficiencia de mezclas para compostaje. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada muestreo, según test de Tukey ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 2.** Evolución del contenido de carbono oxidable (Cox), nitrógeno total (Nt), nitratos, amonio, fósforo disponible (Pd), huminas, ácidos húmicos y fúlvicos (como % de materia orgánica-MO) durante el proceso de compostaje en el ensayo de eficiencia de mezclas para compostaje.

DDI	Biopila	Cox (%)	Nt (%)	N-NO <sub>3</sub> (ppm)	N-NH <sub>4</sub> (ppm)	Pd (ppm)	Huminas (%MO)	Ác. húmicos (%MO)	Ác. fúlvicos (%MO)
1	PP1	3,8 b	0,3 b	93,1 b	23,7 b	48,1 b	2,2	0,7	0,8
	PP2	4,7 c	0,4 c	230,4 c	29,5 c	80,7 c	3,0	1,0	0,8
	PP3	2,3 a	0,2 a	53,1 a	9,9 a	4,5 a	1,5	0,2	0,5
15	PP1	2,9	0,3 b	65,6 a	14,9 b	49,2 b	2,0	0,4	0,6
	PP2	3,2	0,3 c	75,2 b	12,8 a	46,1 b	2,0	0,5	0,7
	PP3	2,2	0,2 a	61,5 a	13,4 ab	5,6 a	1,6	0,3	0,5
30	PP1	3,7	0,3 b	106,6 ab	20,1 b	49,8 b	2,5	0,7	0,4
	PP2	3,9	0,3 b	161,9 b	23,5 b	73,3 c	3,1	0,8	0,5
	PP3	2,4	0,2 a	60,1 a	11,3 a	4,6 a	1,6	0,2	0,5
93	PP1	4,1	0,3	84,8	15,2	36,3 b	3,2	0,8	0,5
	PP2	4,2	0,3	79,4	15,3	58,9 c	3,5	0,8	0,6
	PP3	3,1	0,3	75,8	12,2	4,4 a	2,6	0,4	0,5
159	PP1	2,6	0,3 a	67,8	11,2	34,4 b	3,7	0,8	0,6
	PP2	3,5	0,3 b	77,8	16,9	52,1 c	3,9	0,9	0,6
	PP3	2,5	0,2 a	66,7	9,5	4,2 a	3,1	0,6	0,5
VMP	PP1	3,4 B	0,29 B	83,6 AB	17,0 B	34,7 B	2,7	0,6 B	0,6 AB
	PP2	3,9 B	0,32 B	125,0 B	19,6 B	53,9 C	3,1	0,8 B	0,6 B
	PP3	2,5 A	0,22 A	63,4 A	11,2 A	4,7 A	2,1	0,3 A	0,5 A

DDI: Días desde inicio del proceso de compostaje.

Para cada variable, letras minúsculas indican diferencias entre tratamientos para cada muestreo, según test de Tukey ( $P<0,05$ ).

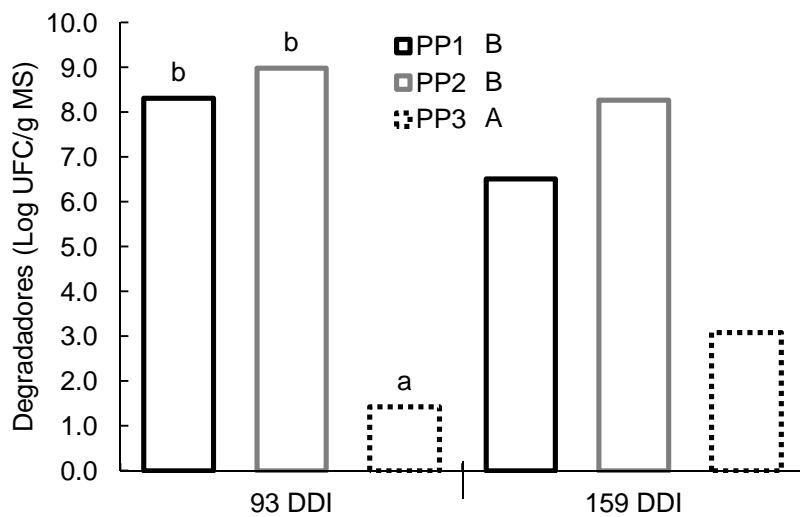
En los valores medios del proceso (VMP), letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos considerando todos los muestreos del proceso de compostaje, según test de Tukey ( $P<0,05$ ).

Como se mencionó anteriormente, la relación entre el número de microorganismos celulolíticos y el contenido de HTP fue negativa y significativa. Por su parte, se observó que las variables contenido de C oxidable y P disponible presentaron valores de coeficiente de correlación de Pearson iguales a -0,46 y -0,67, respectivamente. La mayor disponibilidad de estos nutrientes explicó la reducción del contenido de HTP con un ajuste del 21 % y 45 %, respectivamente. Estos resultados reflejan que la aplicación del compostaje, observado en las biopilas PP1 y PP2, activó la comunidad microbiana del suelo en forma significativa respecto a las biopilas PP3. Esto provocó la degradación de HTP y alteraciones en las variables microbiológicas. En este sentido, se observaron diferencias significativas en el número de microorganismos degradadores de kerosene entre biopilas en el cuarto muestreo, que desaparecieron hacia el final del proceso de compostaje (Figura 8). Considerando los dos muestreos analizados, las biopilas PP1 y PP2 presentaron mayor número de microorganismos degradadores de kerosene. Sin embargo, teniendo en cuenta

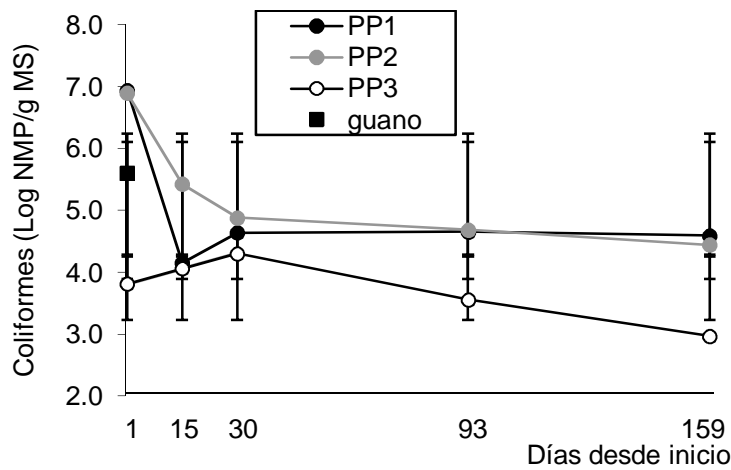


los resultados antes mencionados en relación con la producción de sustancias húmicas (Tabla 2), posiblemente haya sido necesario interrumpir el proceso antes del cuarto muestreo (93 DDI) con la finalidad de adicionar más material para compostar y reiniciar el proceso. Esto favorecería la formación de sustancias húmicas y la degradación de HTP en forma más marcada.

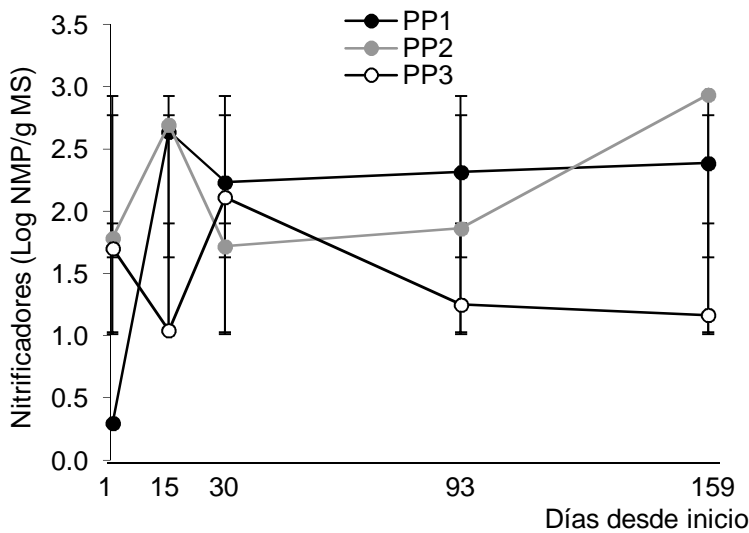
El número de microorganismos coliformes del guano utilizado para el armado de las biopilas fue de 5,61 log NMP/g de materia seca. La adición de este al suelo para compostar generó la proliferación de los microorganismos coliformes en las biopilas PP1 y PP2. La fase termofílica debería haber reducido el número de este grupo microbiano a los fines de eliminar los microorganismos potencialmente patógenos de las biopilas. Si bien se evidenció un descenso en el recuento, al finalizar el proceso de compostaje el número de estos microorganismos en las biopilas PP1 y PP2 continuó siendo mayor al observado en las biopilas PP3 (Figura 9), aunque no mucho más alto a los valores de recuento comúnmente observado en los suelos. El número de microorganismos nitrificadores (Figura 10) obtenidos en este primer ensayo fue similar a los determinados en compost analizado por otros autores (Kowalchuk *et al.*, 1999). Esto permite considerar que el mecanismo de aireación aplicado en este ensayo fue efectivo, y que la presencia de oxígeno no fue un factor limitante del proceso de nitrificación. Así, resulta evidente que la comunidad nitrificadora, con el agregado de sustratos descomponibles, puede jugar un rol fundamental en el proceso biológico de degradación de los hidrocarburos presentes. En este sentido, Kowalchuk *et al.* (1999) determinaron que el ciclado del nitrógeno durante el proceso de compostaje es regulado por los microorganismos nitrificadores presentes.



**Figura 8.** Recuento de microorganismos degradadores en el ensayo de eficiencia de mezclas para compostaje. Letras distintas indican diferencias significativas, según test de Tukey ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas indican diferencias entre tratamientos para cada muestreo y letras mayúsculas indican diferencias entre tratamientos considerando todos los muestreos del proceso de compostaje. DDI: Días desde inicio del proceso de compostaje.



**Figura 9.** Evolución del número de microorganismos coliformes durante el proceso de compostaje en el ensayo de eficiencia de mezclas para compostaje. Las barras indican los desvíos estándar.



**Figura 10.** Evolución del número de microorganismos nitrificadores durante el proceso de compostaje en el ensayo de eficiencia de mezclas para compostaje. Las barras indican los desvíos estándar.

## Resultados y discusión del ensayo de escala y monitoreo de eficiencia

En este segundo ensayo, la mayoría de las variables microbiológicas analizadas mostraron modificaciones a través del proceso de compostaje. Sin embargo, los resultados obtenidos para cada una de las variables fueron bastante similares entre los diferentes mecanismos de aireación. Esto lleva al análisis de las condiciones fisicoquímicas de humedad y temperatura (Tabla 3) que imperaron durante el proceso, las cuales se determinaron durante los primeros dos meses del proceso de compostaje. En este período se observó que la temperatura presentó un aumento de aproximadamente 10 °C y 7 °C para las biopilas BV y BM, respectivamente, mientras que el aumento para la biopila BS fue de aproximadamente 6 °C. La biopila BA, por el contrario, no presentó incrementos de temperatura hacia el final del período considerado (Tabla 3). El

contenido de humedad, por su parte, se mantuvo estable en alrededor del 25 % para las biopilas BA, BV y BM. La biopila BS también presentó un contenido de humedad relativamente constante durante todo el proceso en alrededor del 15 % (Tabla 3). Durante los dos primeros meses se debería haber producido la fase termofílica del proceso de compostaje. Sin embargo, las temperaturas registradas en las pilas durante ese período estarían indicando que las biopilas no alcanzaron esa fase (Tabla 3). Esto podría estar asociado al menor aporte de guano respecto al ensayo anterior y por consiguiente menor aporte de materia orgánica, microorganismos y nutrientes para activar el proceso de degradación. Los valores promedio obtenidos durante la determinación del contenido de HTP y de los recuentos microbiológicos del suelo contaminado, del guano utilizado en el armado de las biopilas y de la mezcla final, al inicio del ensayo antes de la instalación de las biopilas se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 3.** Evolución del contenido de humedad y temperatura durante el proceso de compostaje en el ensayo de escala y monitoreo de eficiencia.

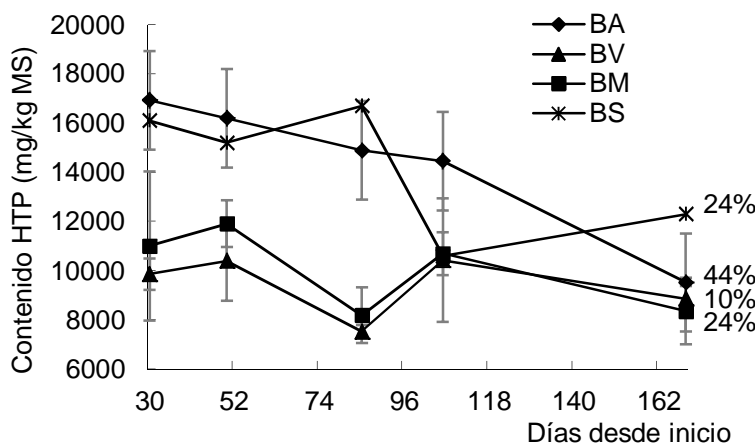
DDI	Biopila	Humedad (%)	Temperatura (°C)
7	BA	25,6±4,2	26,7±2,1
	BV	26,5±3,5	26,4±2,0
	BM	27,6±4,4	26,4±2,8
	BS	15,4±4,4	22,8±1,1
14	BA	26,5±2,3	15,8±4,9
	BV	27,1±3,1	19,7±3,4
	BM	25,9±3,2	15,3±3,6
	BS	15,3±4,3	27,8±2,4
21	BA	27,0±3,4	33,6±6,1
	BV	28,3±2,2	29,3±2,1
	BM	26,7±2,4	30,4±3,7
	BS	14,6±3,4	24,6±2,2
28	BA	23,2±4,2	30,5±5,7
	BV	23,1±2,3	30,3±2,5
	BM	24,7±1,8	31,5±3,3
	BS	14,2±2,8	25,7±2,5
51	BA	24,0±2,9	26,0±2,9
	BV	20,8±3,7	37,0±2,3
	BM	22,7±2,8	33,4±4,0
	BS	13,6±3,9	28,8±2,0

DDI: Días desde inicio del proceso de compostaje.

Valores medios ± desvío estándar entre las doce determinaciones por pila.

Al analizar la degradación de HTP se observó una disminución en el contenido de estos en todas las biopilas a lo largo del proceso de compostaje (Figura 11). Esta disminución fue variable en función de la profundidad de la biopila, siendo mayor siempre en la superficie de las biopilas. En el

caso de la biopila BA, la degradación de HTP en la zona más superficial fue del 52 %, mientras que en las profundidades media y profunda fue del 49 % y 29 %, respectivamente. En el caso de la biopila BV, únicamente en la zona superficial se produjo una reducción del 22 % en el contenido de HTP, mientras que en el resto de las profundidades la degradación fue menor al 5 %. Finalmente, en el caso de la biopila BM, se produjo una disminución del contenido de HTP del 37 % y 25 %, en las zonas superficial y profunda, respectivamente. Para el caso de la atenuación natural, que fue evaluada en la biopila BS, la degradación de HTP fue del 24 % (Figura 11). Los parámetros de contenido de carbono oxidable (Cox), nitrógeno total (Nt), nitratos, amonio, fósforo disponible (Pd), huminas, ácidos húmicos y fúlvicos mostraron una amplia variación en función de la profundidad evaluada. Los valores promedio se presentan en la Tabla 5. Únicamente se observó un aumento significativo en el contenido de P disponible y ácidos húmicos en todas las biopilas durante el proceso de compostaje (Tabla 5).



**Figura 11.** Evolución del contenido de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) durante el proceso de compostaje en el ensayo de escala y monitoreo de eficiencia. Las barras indican los desvíos estándar debido a las distintas profundidades analizadas en las biopilas BA, BV y BM. Los valores en porcentaje indican la degradación de HTP ocurrida respecto a la cantidad presente en el segundo muestreo.

**Tabla 4.** Determinaciones iniciales realizadas al momento de la instalación de las biopilas.

	Suelo contaminado	Guano	Mezcla
Contenido HTP <sup>a</sup>	13700	270	10200
Bacterias totales <sup>b</sup>	10,25	9,79	10,11
Hongos <sup>b</sup>	6,41	6,01	6,66
Actinomicetes <sup>b</sup>	6,04	4,31	5,59
Celulolíticos <sup>c</sup>	5,07	4,76	4,47
Coliformes <sup>c</sup>	4,06	4,97	4,87
Nitratores <sup>c</sup>	4,06	6,28	4,85
Nitritadores <sup>c</sup>	4,06	6,28	4,85
<i>Bacillus</i> sp. <sup>d</sup>	4,82	nd	5,14
<i>Pseudomonas</i> sp. <sup>d</sup>	1,04	4,61	7,75

<sup>a</sup> mg/kg de MS    <sup>b</sup> Log UFC/ g MS    <sup>c</sup> Log NMP/g MS    <sup>d</sup> porcentaje respecto a bacterias totales

nd: no determinado.

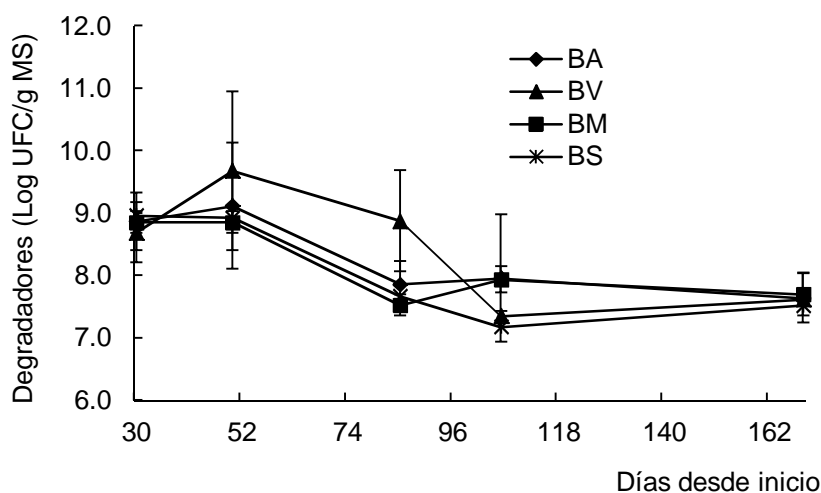
Los recuentos de microorganismos degradadores de kerosene en las biopilas BA, BV y BM fueron elevados, aunque similares a las biopilas BS. Estos se encontraron en el rango de 7,0 y 11,0 Log UFC/g de MS. Además, si bien existieron variaciones en el número de UFC de microorganismos degradadores, relacionadas con las profundidades analizadas, se observó una disminución en todas las biopilas a lo largo de todo el proceso de compostaje (Figura 12). La evolución de este grupo funcional indica cambios asociados con la reducción de los HTP (Figura 11). Los consorcios bacterianos responsables de la degradación de hidrocarburos encontrados en un suelo contaminado con petróleo están integrados principalmente por bacterias aeróbicas y hongos (Boonchan *et al.*, 2000). Entre los géneros de bacterias degradadoras de hidrocarburos se encuentran *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp., entre otros (Bento *et al.*, 2005; Sheng y Gong, 2006; Abioye *et al.*, 2010; Grace Liu *et al.*, 2011). Las bacterias del género *Pseudomonas* se destacan por su gran adaptabilidad a situaciones extremas manteniendo funciones poco específicas. El género *Bacillus* está presente en las fases termofílicas del compost debido a su capacidad de esporular para resistir las altas temperaturas alcanzadas. En este ensayo, la evolución del recuento de ambos géneros durante el proceso de compostaje mostró que tienen dinámicas diferentes (Figuras 13 y 14, respectivamente), aunque el recuento de ambos géneros fue mayor en comparación

**Tabla 5.** Evolución del contenido de carbono oxidable (Cox), nitrógeno total (Nt), nitratos, amonio, fósforo disponible (Pd), huminas, ácidos húmicos y fúlvicos durante el proceso de compostaje en el ensayo de escala y monitoreo de eficiencia.

DDI	Biopila	Cox (%)	Nt (%)	N-NO <sub>3</sub> (ppm)	N-NH <sub>4</sub> (ppm)	Pd (ppm)	Huminas (%)	Ac. húmicos (%)	Ac. fúlvicos (%)
30	BA	2,7±0,2	0,24	80,6±6,1	8,2±0,3	5,2±0,4	1,8±0,1	0,7±0,0	0,1±0,0
	BV	2,3±0,1	0,24	68,4±1,9	9,0±0,3	8,0±1,6	1,8±0,0	0,7±0,1	0,1±0,0
	BM	2,3±0,3	0,25	73,4±1,6	8,3±0,3	7,4±1,8	1,9±0,0	0,7±0,1	0,1±0,0
	BS	2,0	0,24	64,1	8,4	5,2	1,7	0,6	0,1
50	BA	2,4±0,1	0,25	68,3±2,6	9,9±0,5	9,9±1,2	1,7±0,1	0,8±0,0	0,2±0,0
	BV	2,2±0,0	0,23	64,2±1,5	10,1±1,1	12,4±2,0	1,7±0,0	0,7±0,0	0,1±0,1
	BM	2,1±0,2	0,23	67,4±4,5	10,3±1,1	12,5±1,9	1,7±0,0	0,7±0,0	0,2±0,0
	BS	1,9	0,22	66,6	9,1	7,8	1,7	0,9	0,1
85	BA	2,5±0,1	0,25	65,3±4,4	9,1±0,2	9,2±0,9	1,7±0,1	0,7±0,0	0,2±0,0
	BV	2,1±0,1	0,24	65,2±2,0	9,3±0,4	9,6±0,7	1,8±0,1	0,7±0,1	0,2±0,0
	BM	2,2±0,2	0,24	66,8±1,5	8,8±1,6	12,3±1,0	1,7±0,0	0,9±0,1	0,2±0,0
	BS	2,0	0,24	66,2	9,8	8,9	1,7	0,7	0,2
106	BA	2,2±0,4	0,24	67,7±1,3	9,7±1,3	11,3±2,2	1,7±0,0	0,9±0,1	0,1±0,0
	BV	2,3±0,4	0,24	64,3±1,8	11,0±1,3	10,9±1,9	1,7±0,1	0,8±0,1	0,1±0,0
	BM	2,4±0,2	0,24	68,7±3,4	9,7±1,2	10,9±1,4	1,7±0,1	0,9±0,2	0,1±0,0
	BS	2,0	0,24	64,0	11,6	14,6	1,7	1,0	0,1
169	BA	2,3±0,2	0,24	67,7±7,8	10,1±0,2	12,6±4,5	1,8±0,0	1,0±0,1	0,2±0,0
	BV	2,4±0,4	0,24	71,1±2,1	10,7±1,1	15,1±1,5	1,9±0,2	1,0±0,2	0,2±0,0
	BM	2,4±0,1	0,26	66,9±2,4	10,8±1,9	13,3±1,3	1,9±0,1	1,1±0,1	0,2±0,0
	BS	1,9	0,23	65,9	10,8	10,8	1,7	1,1	0,1

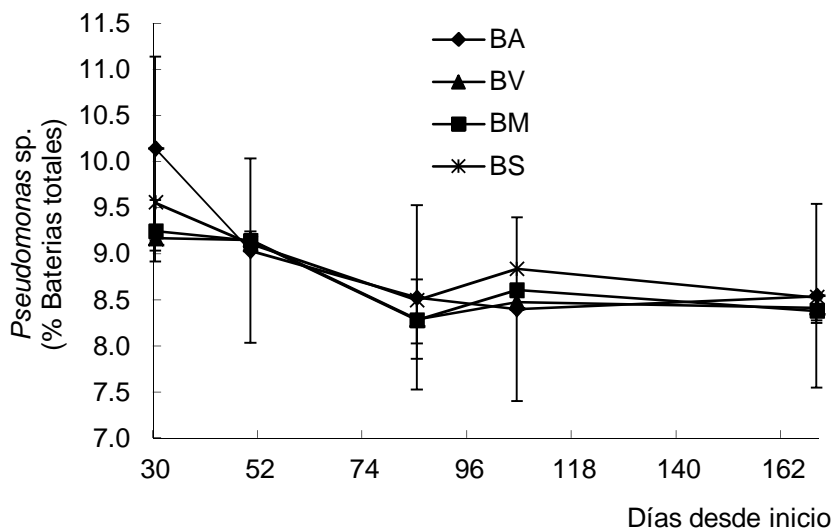
DDI: Días desde inicio del proceso de compostaje.

Valores promedio ± desvío estándar entre profundidades.

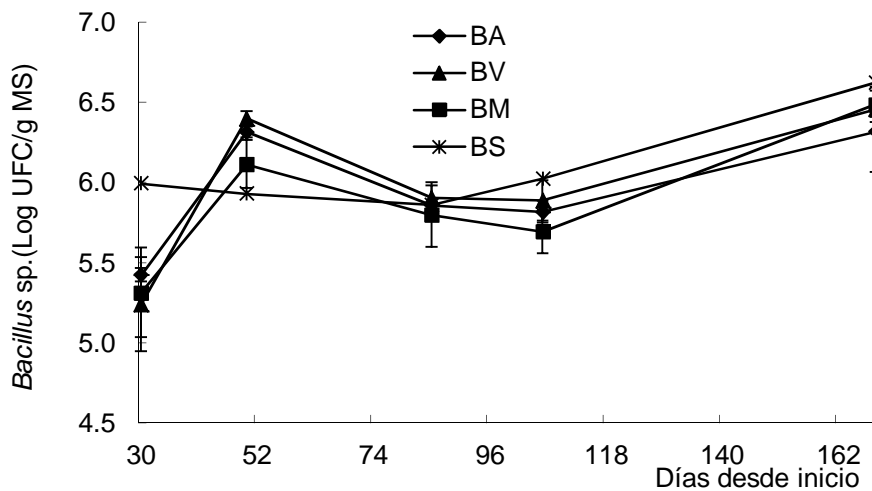


**Figura 12.** Evolución del número de microorganismos degradadores durante el proceso de compostaje en el ensayo de escala y monitoreo de eficiencia. Las barras indican los desvíos estándar debido a las distintas profundidades analizadas.

al recuento inicial antes del proceso (Tabla 4), debido al proceso de compostaje. Se observó un descenso en el número de UFC de bacterias totales (Figura 15) y en el porcentaje de *Pseudomonas* sp. (Figura 13) a lo largo del proceso de compostaje en todas las biopilas. Por el contrario, se observó un aumento en el número de UFC del género *Bacillus* (Figura 14) y en el número de UFC de hongos (Figura 16) en las biopilas BA, BV y BM, mientras que las biopilas BS el número permaneció estable. Tampoco se observaron variaciones en el número de UFC de actinomicetes de las diferentes biopilas durante el proceso de compostaje (Figura 17). En todos los recuentos se observaron variaciones debidas a las diferentes profundidades analizadas.

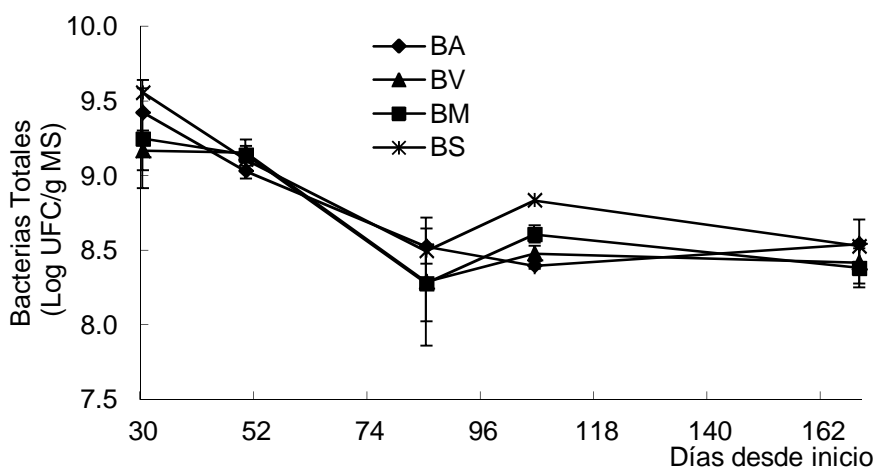


**Figura 13.** Evolución del porcentaje de *Pseudomonas* sp. durante el proceso de compostaje en el ensayo de escala y monitoreo de eficiencia. Las barras indican los desvíos estándar debido a las distintas profundidades analizadas en las biopilas BA, BV y BM.



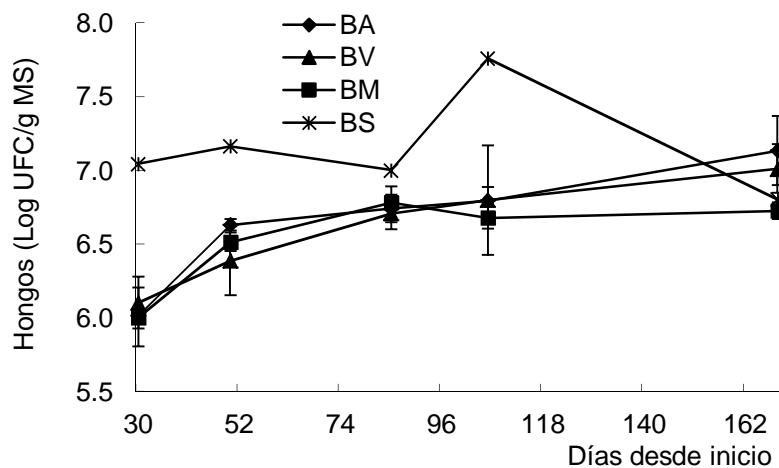
**Figura 14.** Evolución del número de *Bacillus* sp. durante el proceso de compostaje en el ensayo de escala y monitoreo de eficiencia. Las barras indican los desvíos estándar debido a las distintas profundidades analizadas en las biopilas BA, BV y BM.

Ante la ausencia de fase termofílica en las etapas tempranas del proceso, la degradación de HTP (Figura 11) podría haber estado limitada por el bajo desarrollo de comunidades degradadoras termofílicas, como las del género *Bacillus* (Figura 14). En este sentido, Ma *et al.* (2003) han observado que el agregado de compost a un suelo contaminado con antraceno aumentó la eficiencia de degradación de este e incrementó las cantidades de bacterias y actinomicetes termofílicos en sucesión a las bacterias mesófilas. Estos autores observaron, además, que la diversidad microbiana se incrementó cuando la temperatura se elevó de 35 a 56 °C, coincidiendo con el aumento en el porcentaje de degradación (Ma *et al.*, 2003). Si bien la contaminación con un único contaminante es probablemente más simple que la contaminación directa con petróleo (Sugiura *et al.*, 1997), es relevante considerar que el éxito del proceso de compostaje debe alinearse con el objetivo de alcanzar temperaturas adecuadas.

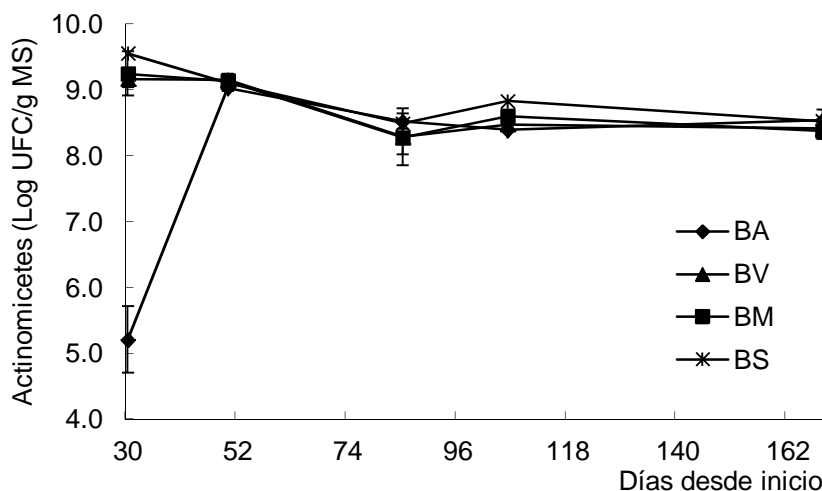


**Figura 15.** Evolución del número de bacterias totales durante el proceso de compostaje en el ensayo de escala y monitoreo de eficiencia. Las barras indican los desvíos estándar debido a las distintas profundidades analizadas en las biopilas BA, BV y BM.





**Figura 16.** Evolución del número de hongos durante el proceso de compostaje en el ensayo de escala y monitoreo de eficiencia. Las barras indican los desvíos estándar debido a las distintas profundidades analizadas en las biopilas BA, BV y BM.

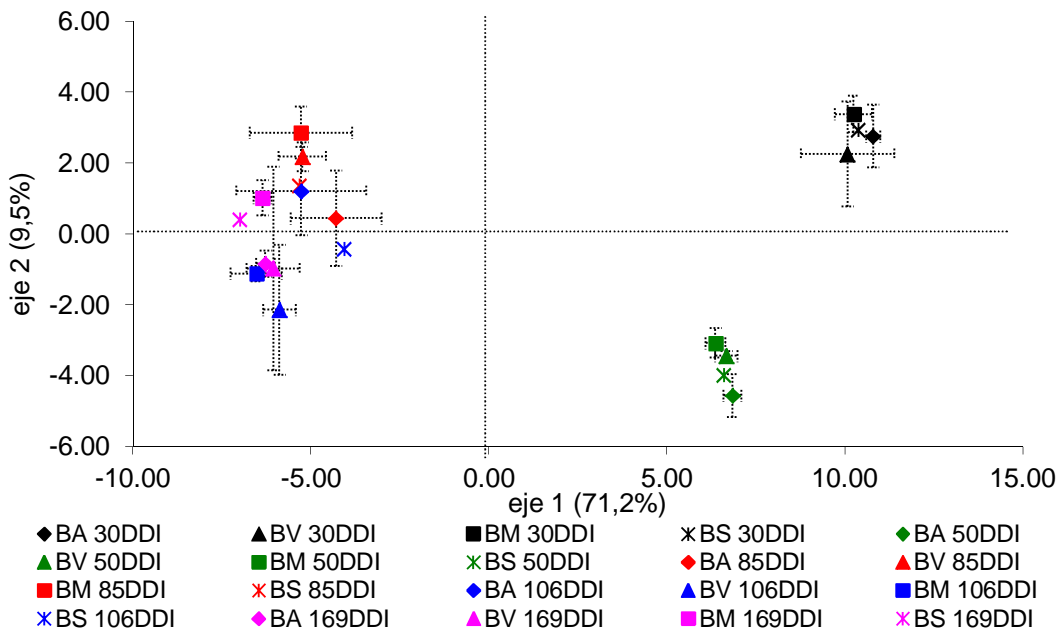


**Figura 17.** Evolución del número de actinomicetes durante el proceso de compostaje en el ensayo de escala y monitoreo de eficiencia. Las barras indican los desvíos estándar debido a las distintas profundidades analizadas en las biopilas BA, BV y BM.

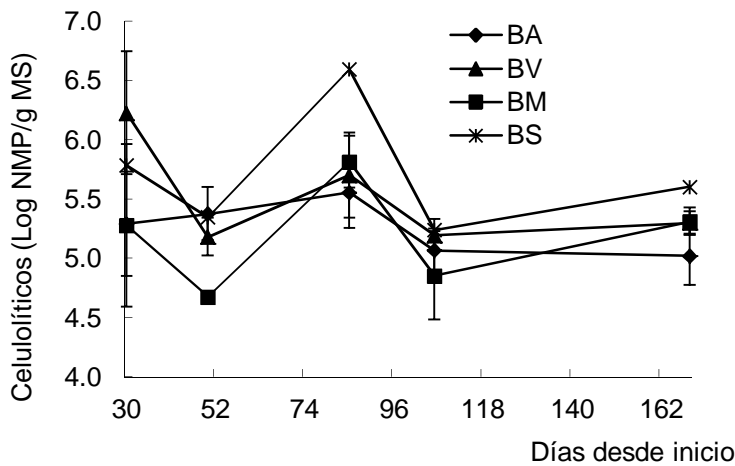
Variables tales como el contenido de HTP (Figura 11) y el recuento de microorganismos degradadores (Figura 12) indicaron que la ubicación en la matriz del compost, en volúmenes de material como los manejados durante este ensayo, influye en la dinámica de dichas variables, independientemente del mecanismo de aireación aplicado. Así, el proceso de compostaje y la degradación de los HTP presentaron distintas dinámicas de acuerdo a la profundidad dentro de la biopila. En oposición a otras variables microbiológicas, un análisis más detallado de la funcionalidad de las comunidades microbianas a través de los CLPP permitió observar que la diversidad funcional microbiana sufrió modificaciones durante todo del proceso de compostaje. No se observaron diferencias en la fisiología de las comunidades microbianas debidas a los distintos procesos de aireación o profundidades dentro de la pila. De esta manera, la fisiología de las comunidades microbianas correspondientes al segundo y el tercer muestreo fueron diferentes

entre sí y con respecto a la fisiología de las comunidades microbianas correspondientes al cuarto, quinto y sexto muestreo (Figura 18).

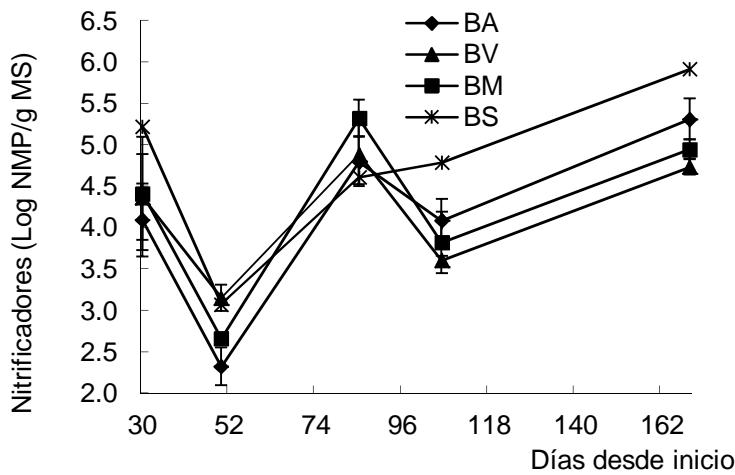
Asociado a lo que se observó en el análisis de los CLPP, los recuentos de microorganismos celulolíticos y nitrificadores presentaron también variaciones temporales a lo largo del proceso de compostaje (Figuras 19 y 20, respectivamente). El proceso de compostaje generó un aumento en el recuento de microorganismos celulolíticos (Figura 19), en comparación con la cantidad obtenida en el recuento inicial antes del proceso (Tabla 4). Las variaciones temporales observadas en el contenido de  $N-NH_4$ , asociadas a las variaciones temporales en el número de microorganismos nitrificadores (Tabla 5) estarían indicando que el suelo está atravesando el proceso de inmovilización del amonio debido a la degradación del C presente por un aumento general de la actividad microbiana (Paul y Clark, 1996), observable en la alta cantidad de UFC de bacterias totales en los primeros muestreos (Figura 15) y en la cantidad de UFC de hongos que aumentan en los siguientes muestreos (Figura 16). El NMP de microorganismos.



**Figura 18.** Análisis discriminante de los perfiles fisiológicos de utilización de fuentes carbonadas de las muestras provenientes de todas las biopilas del ensayo de escala y monitoreo de eficiencia. Diferentes símbolos indican las biopilas y diferentes colores indican los muestreos. Entre paréntesis se indican los porcentajes de varianza total explicada por cada uno de los ejes. Las barras indican los desvíos estándar debido a las distintas profundidades analizadas en las biopilas BA, BV y BM.



**Figura 19.** Evolución del número de microorganismos celulolíticos durante el proceso de compostaje en el ensayo a escala y monitoreo de eficiencia. Las barras indican los desvíos estándar debido a las distintas profundidades analizadas en las biopilas BA, BV y BM.

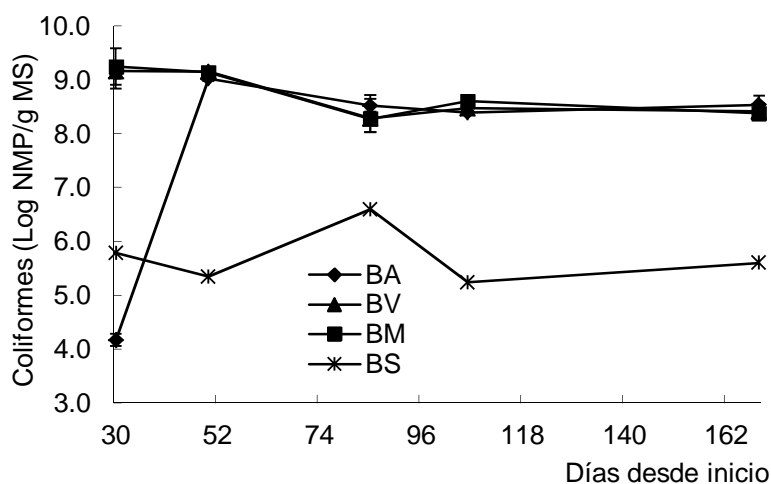


**Figura 20.** Evolución del número de microorganismos nitrificadores durante el proceso de compostaje en el ensayo a escala y monitoreo de eficiencia. Las barras indican los desvíos estándar debido a las distintas profundidades analizadas en las biopilas BA, BV y BM.

coliformes de las biopilas BA, BV y BM fue mayor al NMP observado en las biopilas BS y similares entre sí a lo largo de todo el proceso de compostaje (Figura 21). En este recuento no se observaron variaciones debidas a las diferentes profundidades analizadas.

Los métodos basados en el cultivo de los microorganismos son cuestionados por su acción selectiva, dado que la proporción de microorganismos que pueden ser cultivables a partir de una muestra cualquiera representa un rango variable que va del 1 al 14 % (Madigan *et al.*, 2006). A pesar de ello, las técnicas cultivables han sido útiles, y lo son aún, para determinar impactos dados por la actividad antropogénica sobre la salud del suelo (Bakken, 1997; Ellis *et al.*, 2003), tal como se demostró también en este trabajo. Además, los resultados de ambos ensayos confirman que en el suelo existen microorganismos capaces de degradar sustancias complejas y recalcitrantes (Leahy y Colwell, 1990; Sugiura *et al.*, 1997; Ércoli *et al.*, 2000; Ruberto *et al.*, 2006). Las diferentes fases del proceso de compostaje generan cambios en la comunidad microbiana

presente. Las únicas biopilas que presentaron fase termofílica fueron las biopilas del ensayo de eficiencia de mezclas para compostaje que habían recibido mezcla de materiales (PP1 y PP2). En ellas se observaron diferencias en el recuento de bacterias totales, en el recuento del género *Bacillus*, importante para el proceso de biorremediación, y en el contenido de HTP. El recuento de microorganismos nitrificadores también mostró diferencias. En ambos ensayos la presencia de oxígeno no fue un factor limitante del proceso de nitrificación. También se observaron diferencias en los recuentos de microorganismos celulolíticos, de hongos y de actinomicetes, mostrando la relevancia de los hongos y actinomicetes en la actividad celulolítica y en la biorremediación.



**Figura 21.** Evolución del número de microorganismos coliformes durante el proceso de compostaje en el ensayo escala y monitoreo de eficiencia. Las barras indican los desvíos estándar debido a las distintas profundidades analizadas en las biopilas BA, BV y BM.

En relación con las técnicas cultivables, la metodología aplicada en este trabajo para la evaluación de las comunidades microbianas con capacidad de degradación de hidrocarburos constituye una técnica de relativamente fácil manipulación, que permite evaluar la cantidad de microorganismos con capacidad de utilizar un derivado de petróleo. Es, por un lado, una herramienta de comparación entre tratamientos para analizar el estado de la comunidad degradadora (D'Auria, 2012) y, por otro lado, constituye el comienzo de cualquier programa de selección. La potencialidad de la comunidad microbiana con capacidad degradadora puede ser analizada con el objetivo de mejorar la eficiencia del proceso de compostaje mediante la inoculación, ya sea por una reducción de los plazos del proceso o por una disminución más acentuada de los valores de HTP. Si bien cualquier microorganismo degradador puede ser inoculado a un ecosistema determinado (Grace Liu *et al.*, 2011), la eficiencia de la inoculación con microorganismos nativos para la degradación ha sido comprobada (Bento *et al.*, 2005; Sheng y Gong, 2006). En este sentido, en nuestro laboratorio fueron obtenidos aislamientos de microorganismos con capacidad de crecer con kerosene como única fuente de carbono y algunos han sido probados como

inoculantes para estimular la fitorremediación (D'Auria, 2012). La aplicación de aislamientos microbianos para mejorar la eficiencia de la fitorremediación como estrategia de remediación ha sido aplicada por varios autores con buenos resultados (Tesar *et al.*, 2002; Reardon *et al.*, 2002; Sheng y Gong 2006; Rivera-Cruz *et al.*, 2006; Abbassi y Shquirat, 2008; Dias *et al.*, 2012).

El éxito o fracaso de una estrategia de compostaje para la biorremediación depende de numerosos factores, las principales limitantes son la biodisponibilidad y la biodegradabilidad del contaminante (Amellal *et al.*, 2001; Semple *et al.*, 2001). Esto podría ser resuelto mediante el agregado de surfactantes que facilitan el contacto entre microorganismos y los contaminantes (Van Hamme, 2003). La utilización de biosurfactantes en biorremediación de suelos contaminados con petróleo facilitó la degradación de n-alcanos y PAHs favoreciendo la separación de varios derivados de petróleo de los complejos húmico-arcillosos siempre presentes en el suelo (Ron y Rosenberg 2002; García-Junco *et al.*, 2003; Mulligan, 2005). El proceso de compostaje disminuyó la afinidad de absorción de los PAHs fenantreno y pireno por la fracción de los ácidos húmicos e incrementó la heterogeneidad de los sitios de absorción en los ácidos húmicos (Plaza *et al.*, 2009). Los cambios producidos por esta fracción de las sustancias húmicas durante el proceso de compostaje podría contribuir a aumentar el acceso microbiano a los PAHs. Otros autores, han observado también que el mezclado de un suelo contaminado con compost maduro mejoraba la eficiencia del compostaje del suelo contaminado (Namkoong *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2003; Grace Liu *et al.*, 2011).

La aplicación de fitorremediación y la inoculación de bacterias con capacidad degradadora comprobada, discutido previamente, podría ser otra de las herramientas para mejorar los contenidos de HTP alcanzados en estos ensayos. En futuras biopilas dentro del yacimiento, la utilización de compost maduro para el armado de estas, podría ser considerada como alternativa para mejorar los resultados obtenidos en este trabajo, con la necesidad de continuar monitoreando las variables fisicoquímicas y microbiológicas.

En ambos ensayos de este trabajo, se observó una reducción en el contenido de HTP asociada a los procesos de compostaje llevados a cabo. El nivel de HTP debe ser comparado con la normativa vigente a los fines de determinarse el grado de biorremediación alcanzado. En nuestro país, se encuentran determinados niveles guía para suelos. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el resultado final del proceso de compostaje es compost y no suelo, y que este puede llegar a ser destinado a otros usos diferentes a los usos del suelo. Por ello, es necesario ser más exigente con los valores máximos de HTP que puede contener el compost, en caso que este quiera ser destinado para la producción hortícola, florícola y forestal intensiva, con los consecuentes riesgos de manipulación, liberación al ambiente y traslocación de contaminantes a órganos vegetales destinados a la alimentación. De todas formas, el objetivo de aplicar la técnica de compostaje en este trabajo fue recuperar el suelo contaminado para poder reutilizarlo en el sitio de extracción del petróleo y reducir su acumulación.

Respecto a la comparación con la normativa vigente, la legislación argentina en el anexo II del Decreto Reglamentario 831/93 de la Ley 24.051 sobre desechos peligrosos establece niveles guía de calidad de suelos para diferentes usos del suelo (SAyDS, 2013). Estos niveles están detallados por compuestos, encontrándose niveles guía para antraceno y pireno, entre otros, pero no se incluyen niveles guías para HTP. Los niveles guía para este tipo de compuestos están reglamentados por legislaciones provinciales únicamente en las provincias de Chubut (Ley N° 5439), Santa Cruz (Ley N° 2567) y La Pampa (Ley N° 1914). El límite establecido por la provincia de Chubut es 10000 mg/kg y el límite para las provincias de Santa Cruz y La Pampa es 20000 mg/kg de suelo seco, en todos los casos determinado por el método EPA 418,1. El valor más bajo de contenido de HTP obtenido en el ensayo de eficiencia de mezclas para compostaje (11500 mg/kg MS) se encuentra en medio de los niveles guía establecidos por las provincias mencionadas, mientras que el valor más bajo de contenido de HTP obtenidos en el ensayo de escala y monitoreo de eficiencia (6500 mg/kg MS) se encuentra por debajo del nivel guía más exigente.

## Conclusiones

- La adición de materiales a la mezcla final para compostar mejoró el proceso de compostaje en general y la eficiencia de degradación de HTP.
- El compostaje redujo el nivel de contaminación con HTP por debajo de los niveles iniciales y por debajo de los niveles guías reglamentados por leyes provinciales para suelo.
- La evaluación del número de microorganismos degradadores contribuyó a la comprensión del proceso biológico de compostaje, presentando estrecha relación con la variable contenido de HTP. Asimismo, constituye el punto de partida para la obtención de aislamientos para su aplicación biotecnológica en biorremediación.
- La evaluación de las variables microbiológicas brindó información detallada del proceso de compostaje que las variables fisicoquímicas por sí solas no mostraron. Debido a ello, la dinámica del proceso de compostaje debe ser analizada con un enfoque biológico, mediante el seguimiento de las variables microbiológicas estudiadas, en conjunto con las variables físico-químicas consideradas.
- El aumento de la complejidad del proceso debido al aumento en la escala de trabajo similar a la de un yacimiento:
  - a) sugiere aumentar la eficiencia del proceso de compostaje mediante estrategias tales como la aplicación de suelo previamente compostado al suelo contaminado o la inoculación de este con microorganismos con capacidad degradadora;

b) requiere un mayor conocimiento de las variables microbiológicas relacionadas con la dinámica de la degradación de hidrocarburos y de los cambios en la comunidad microbiana que se producen a lo largo del proceso de compostaje de forma tal de aumentar la eficiencia del proceso.

## Bibliografía

- ABBASSI, B.E.; SHQUIRAT, W.D. 2008. Kinetics of indigenous isolated bacteria used for *ex-situ* bioremediation of petroleum contaminated soil. *Water Air and Soil Pollution*, 192:221-226.
- ABIOYE, P.O.; ABDUL AZIZ, A.; AGAMUTHU, P. 2010. Enhanced biodegradation of used engine oil in soil amended with organic wastes. *Water Air and Soil Pollution*, 209:173-179.
- ALEF, K.; NANPIERI, P. 1998. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press, Londres, pp. 420-421.
- AMELLAL, N.; PORTAL, J.M.; VOGEL, T.; BERTHELIN, J. 2001. Distribution and location of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-degrading bacteria within polluted soil aggregates. *Biodegradation*, 12:49-57.
- BAKKEN, L.R. 1997. Culturable and nonculturable bacteria in soil. En: Elsas, J.D.; Trevors, J.T.; Wellington, E.M.H. (ed.). *Modern Soil Microbiology*, Marcel Dekker. Nueva York, Estados Unidos de América.
- BARKER, A.V.; BRYSON, G.M. 2002. Bioremediation of heavy metals and organic toxicants by composting. *The Scientific World Journal*, 2:407-420.
- BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, W.T. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96:1049-1055.
- BONAVENTURA, C.; JOHNSON, F.M. 1996. Healthy environment for healthy people: Bioremediation now and tomorrow. *Environmental Health Perspective Supplements*, 105(1):5-21.
- BOONCHAN, S.; BRITZ, M.I.; STANLEY, G.A. 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3):1007-1019.
- CRAWFORD, R.L.; CRAWFORD, D.L. 2005. *Bioremediation: principles and applications*, Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, pp. 416.
- D'AURIA, F. 2012. Estrategias de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos: Efecto de la presencia de *Impatiens walleriana* y la inoculación con *Azospirillum brasilense* y microorganismos autóctonos. Trabajo de intensificación para optar por el título de Licenciada en Ciencias Ambientales, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- DAVIS, J.B. 1967. *Petroleum Microbiology*. Elsevier. Ámsterdam, Países Bajos, pp. 604.
- DEAN, S.M.; JIN, Y.; CHA, D.K.; WILSON, S.V.; RADOSEVICH, M. 2001. Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenanthrene-degrading and biosurfactant-producing bacteria. *Journal of Environmental Quality*, 30:1126-1133.
- DÍAS, R.L.; RUBERTO, L.; HERNÁNDEZ, E.; VÁZQUEZ, S.C.; LO BALBO A.; DEL PANNO, M.; MAC CORMACK, W. 2012. Bioremediation of an aged diesel oil-contaminated Antarctic soil: Evaluation of the "on site" biostimulation strategy using different nutrient source. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 75:96-103.

- DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W. 2011. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible: <http://www.infostat.com.ar>. Visitado 10 de septiembre de 2016.
- DI SALVO, L.P.; GARCÍA DE SALAMONE, I.E. 2012. Evaluation of soil-microbial communities by their CLPP. Standardization of a laboratory technique to replace commercial available microplates. *Ecología Austral* 22(2):129-136.
- DUA, M. 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:143-152.
- ELLIS, R.J.; MORGAN, P.; WEIGHTMAN, A.J.; FRY, J.C. 2003. Cultivation-dependent and -independent approaches for determining bacterial diversity in heavy metal-contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology* 69:3223-3230.
- ÉRCOLI, E.; VIDELA, C.; CALLEJAS, C.; GALVEZ, J.; VIDELA, S.; CANTERO, J.; MEDAURA, C.; DI PAOLA, M. 2000. Biorremediación por técnica de acumulación aireada. IV Jornadas de preservación de aguas, aires, y suelo en la industria de petróleo y de gas, Salta, Argentina.
- GARCÍA-JUNCO, M.; GÓMEZ-LAHOZ, C.; NIQUI-ARROYO, J.L.; ORTEGA-CALVO, J.J. 2003. Biosurfactant- and biodegradation-enhanced partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from nonaqueous-phase liquids. *Environmental Science and Technology* 37:2988-2996.
- GRACE LIU, P.W.; CHANG, T.C.; WHANG, L.M.; KAO, C.H.; PAN, P.T.; CHENG, S.S. 2011. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration and Biodegradation* 65:1119-1127.
- JACKSON, M.L. 1976. Chemical analysis of soils. Editorial Omega S.A., Barcelona, España.
- KANDELER, E.; TSCHERKO, D.; BRUCE, K.D.; STEMMER, M.; HOBBS, P.J.; BARDGETT, R.D.; AMELUNG, W. 2000. Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Biology and Fertility of Soils* 32:390-400.
- KAPLAN, C.W.; KITTS, C.L. 2004. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Applied and Environmental Microbiology* 70(3): 1777-1786.
- KOWALCHUK, G.A.; NAOUMENKO, Z.S.; DERIKX, P.J.I.; FELSKE, A.; STEPHEN, J.R.; ARKHIPCHENKO, I.A. 1999. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the  $\beta$ .subdivision of the class Proteobacteria in compost and composted materials. *Applied and Environmental Microbiology* 65(2):396-403.
- LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, *Microbiological Reviews* 54:305-315.
- LEY N° 5439 DE CÓDIGO AMBIENTAL DE LA PROVINCIA DE CHUBUT Y SU DECRETO REGLAMENTARIO 993/07. Disponible: <http://www.estrucplan.com.ar/Legislacion/Chubut/Decretos/Dec00993-07.asp>. Visitado 18 de octubre de 2016
- LEY N° 2567 Y SU DECRETO REGLAMENTARIO 712/02. PROVINCIA DE SANTA CRUZ. Disponible: <http://www.santacruz.gov.ar/ambiente/anexoX.pdf>. Visitado el 10 de noviembre de 2016.
- LEY AMBIENTAL PROVINCIAL N°1914 Y SU DECRETO REGLAMENTARIO 298/06. PROVINCIA DE LA PAMPA. Disponible: [http://www.lapampa.gov.ar/images/stories/Archivos/Normativa/Decretos/Decreto\\_298\\_06.pdf](http://www.lapampa.gov.ar/images/stories/Archivos/Normativa/Decretos/Decreto_298_06.pdf). Visitado el 05 de noviembre de 2016.
- LOICK, N.; HOBBS, P.J.; HALE, M.D.C.; JONES, D.L. 2009. Bioremediation of poly-aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil by composting. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 39(4):271-332.



- LORCH, H.J.; BENCKISER, G.; OTTOW, J.C.G. 1998. Basic methods for counting microorganisms in soil and water. En: Alef, K.; Nannipieri, P. (ed.). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press, Londres, pp. 153-158.
- MA, Y.; ZHANG, J.Y.; WONG, M.H. 2003. Microbial activity during composting of anthracene-contaminated soil. *Chemosphere* 52(9):1505-1513.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. 2006. Brock. *Biología de los Microorganismos*, 10.<sup>a</sup> edición, Prentice-Hall International.
- MARGESIN, R.; HÄMMERLE, M.; TSCHERKO, D. 2007. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: Effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microbial Ecology* 53:259-269.
- MEDAURA, M.C.; BALLA, M.P.; GUTIÉRREZ, P.A.; GARCÍA DE SALAMONE, I.E.; GARCÍA TORRES, T.P.; MONZÓN DE ASCONEGUI, M.A.; ÉRCOLI, E.C. 2007. Composting: bioremediation of soil contaminated with weathered hydrocarbons, Society of Petroleum Engineers, Conferencia de ingenieros del petróleo de América Latina y el Caribe. Buenos Aires, Argentina, DOI: 10.2118/108277-MS
- MULLIGAN, C.N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution* 133(2):183-198.
- NAMKOONG, W.; HWANG, E.Y.; PARK, J.S.; CHOI, J.Y. 2002. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental Pollution* 119:23-31.
- PAUL, D.; PANDEY, G.; PANDEY, J.; JAIN, R.K. 2005. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *Trends in Biotechnology* 23(3):135-142.
- PAUL, E.A.; CLARK, F.E. 1996. *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego, California.
- PÉREZ VARGAS, J.; GARCÍA ESQUIVEL, G.; ESPARZA GARCÍA, F. 2002. Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. *Avance y Perspectiva* 21:297-301.
- PLAZA, C.; XING, B.; FERNÁNDEZ, J.M.; SENESI, N.; POLO, A. 2009. Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by humic acids formed during composting. *Environmental Pollution* 157(1):257-263.
- REARDON, K.F.; MOSTELLER, D.C.; ROGERS, J.B.; DUTEAU, N.M.; KEE-HONG, K. 2002. Biodegradation kinetic of aromatic hydrocarbon mixtures by pure and mixed bacterial cultures. *Environmental Health Perspectives* 110(12):1005-1012.
- RIVERA-CRUZ, M.C.; TRUJILLO-NARCÍA, A.; FERRERA-CERRATO, R.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; VOLKE-HALLER, P.; SÁNCHEZ-GARCÍA, P.; FERNÁNDEZ-LINARES, L. 2006. Fitorremediación de suelos con benzo(a)pireno mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo* 22:1-12.
- RORIG, M.; ALDERUCCIO, S.; MALCOLM, V.; OLSEN, D.; MICHELENA, R.; GARCÍA DE SALAMONE, I.E. 2004. Estimaciones del número de microorganismos, producción de nitratos y actividad de fosfatasa alcalina en un suelo Argiudol vértico de la localidad de Ramírez, Entre Ríos, bajo siembra directa y durante la rotación trigo-soja. En: Monzón de Asconegui, M.A.; García de Salamone, I.E.; Miyazaki, S. (ed.). *Biología del Suelo. Transformación de la materia orgánica. Usos y biodiversidad de los organismos edáficos*. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires, Argentina.
- RON, E.Z.; ROSENBERG, E. 2002. Biosurfactans and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 13:2499-2452.

- ROSENBERG, E.; RON, E.Z. 1998. Bioremediation of petroleum contamination. En: Crawford, R.L.; Crawford, D.L. (ed.) Bioremediation: Principles and applications, Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- RUBERTO, L.A.M.; VÁZQUEZ, S.C.; CURTOSI, A.; MESTRE, M.C.; PELLETIER, E.; MAC CORMACK, W.P. 2006. Phenanthrene biodegradation in soils using an Antarctic bacterial consortium. *Bioremediation Journal* 10:191-201.
- RUTIGLIANO, F.A.; ASCOLI, R.D.; DE SANTO, A.V. 2004. Soil microbial metabolism and nutrient status in a Mediterranean area as affected by plant cover. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1719-1729.
- SECRETARÍA DE AMBIENTE Y DESARROLLO SUSTENTABLE (SAYDS). 2013. Decreto 831/93 Anexo II Tabla 9. Decreto Reglamentario de la Ley 24.051 sobre régimen de desechos peligrosos. Disponible:[http://www2.medioambiente.gov.ar/mlegal/residuos/dec831/dec831\\_anxII\\_t9.htm](http://www2.medioambiente.gov.ar/mlegal/residuos/dec831/dec831_anxII_t9.htm). Visitado el 13 de septiembre de 2016.
- SEMPLE, K.T.; REID, B.J.; FERMOR, T.R. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution* 112:269-283.
- SHENG, X.F.; GONG, J.X. 2006. Increase degradation of phenanthrene in soil by *Pseudomonas* sp. GF3 in the presence of wheat. *Soil Biology and Biochemistry* 38:2587-2592.
- SUGIURA, K.; ISHIHARA, T.; SHIMAUCHI, T.; HARAYAMA, S. 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environmental Science and Technology* 31:45-51.
- TESAR, M.; REICHENAUER, T.; SESSITSCH, A. 2002. Bacterial rhizosphere populations of black poplar and herbal plants to be used for phytoremediation of diesel fuel. *Soil Biology and Biochemistry* 34:1883-1892.
- VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4):503-549.
- ZUCCHI, M.; ANGIOLINI, L.; BORIN, L.; DIETRICH, N.; GINGIOTTI, C.; BARBIERI, P.; SORLINI, C.; DAFFONCHIO, D. 2003. Response of bacterial community during bioremediation of an oil-polluted soil. *Journal of Applied Microbiology* 94:248-257.

## CAPÍTULO 22

### Fitorremediación de suelos salinos

Roberto R. Casas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro para la Promoción de la Conservación del Suelo y del Agua, PROSA, FECIC.

E-mail: casas.roberto@inta.gob.ar

### Introducción

El noroeste bonaerense constituye una región arreica (carente de una red hídrica superficial) que abarca aproximadamente 6 millones de hectáreas; esta región fisiográficamente se conoce como pampa arenosa, transformándose en una de las subregiones más afectadas por las inundaciones recurrentes dentro de la región pampeana.

La zona de referencia configura una gran llanura con pendiente regional de oeste a este; el gradiente promedio es 0,25 por mil. Esta llanura está cubierta por cordones medanosos transversales al norte y médanos parabólicos al sur que entorpecen el drenaje superficial, impidiendo el libre movimiento de las aguas y actuando como barreras o diques naturales que determinan la acumulación en superficie (Casas y Pittaluga, 1990).

El período húmedo que afecta a la región desde 1972 provoca periódicamente el anegamiento de extensas superficies que, por carecer de vías de drenaje naturales, determinan que las áreas planas o ligeramente deprimidas mantengan el agua en superficie por mucho tiempo, comportándose como lagunas temporarias. Esta situación conduce al ascenso regional de la capa freática, que lleva disuelta elevadas cantidades de sales ya existentes en profundidad.

La problemática de la salinización y sodificación de los suelos por efecto de las oscilaciones y composición salina de la capa freática cercana a la superficie está incrementándose en extensión e intensidad afectando en grados diversos a millones de hectáreas de tierra.

Solamente en la provincia de Buenos Aires hay más de 3 millones de hectáreas afectadas por este proceso, principalmente en el noroeste y en ambientes bajos de la depresión del salado. La relevancia del problema cobra actualidad ante la posibilidad de utilizar parte de estas tierras para emprendimientos ganaderos principalmente.

La intensificación de los procesos de salinización y sodificación de los suelos en relación con las oscilaciones de los niveles freáticos con aguas cargadas de sales y sodio, están asociados a la

variabilidad climática, principalmente a lluvias superiores a las medias históricas. Pero también son producto de la intensificación del uso agrícola de las tierras más altas circundantes a las afectadas, que alteran y afectan el balance y régimen hídrico de las zonas deprimidas, provocando ascensos temporales o permanentes de los niveles freáticos.

### Fluctuación del nivel de la capa freática

Las fluctuaciones de los niveles freáticos se midieron en el Establecimiento Miraflores, partido de Carlos Tejedor, durante una década en forma continuada. En años de lluvias cercanas a la media anual y sin elevadas concentraciones en alguna época del año, la freática alcanza su máxima profundidad hacia fines de marzo (1,50 – 2,00 metros), elevándose a partir de abril y alcanzando su máximo nivel en los meses de junio – julio (0,60 – 1,00 metros). A partir de estos meses comienza a profundizarse en relación con las tasas de evapotranspiración crecientes, particularmente en la primavera y en la estación estival. En general las aguas freáticas del noroeste de la provincia de Buenos Aires son de salinidad elevada, sódica y bicarbonatada (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Composición y contenido salino mínimo y máximo de aguas subterráneas y superficiales correspondientes a los partidos de Carlos Tejedor, Pehuajo y 9 de Julio (Casas y Pittaluga 1990).

	AGUAS SUBTERRÁNEAS				AGUAS SUPERFICIALES			
	Freatímetros		Molinos		Lagunas		Vías de escurrimiento	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
CE (mS.cm)	4,6	18,2	1,7	8,3	3,3	4,2	1,4	4,8
RS (g)	7,5	8,2	7,5	7,9	7,2	8,1	8,0	8,5
Ca (mg/l)	19,2	83,7	11,8	29,8	1,5	2,2	19,6	45,1
Mg (mg/l)	20,0	512,0	12,0	48,0	206,0	3,5	19,0	60,0
Na (mg/l)	1393,0	3358,0	340,0	1766,0	28,0	35,0	294,0	929,0
K (mg/l)	21,0	75,0	15,0	53,0	24,0	28,0	25,0	28,0
HCO <sub>3</sub> (mg/l)	170,0	1365,0	118,0	1061,0	7,1	8,0	622,0	1299,0
Cl (mg/l)	542,0	6203,0	347,0	2246,0	18,0	25,0	148,0	1376,0
SO <sub>4</sub> (mg/l)	70,0	2723,0	83,0	809,0	7,6	8,3	37,0	222,0
RAS	26	60	15	48	19	20	11	22

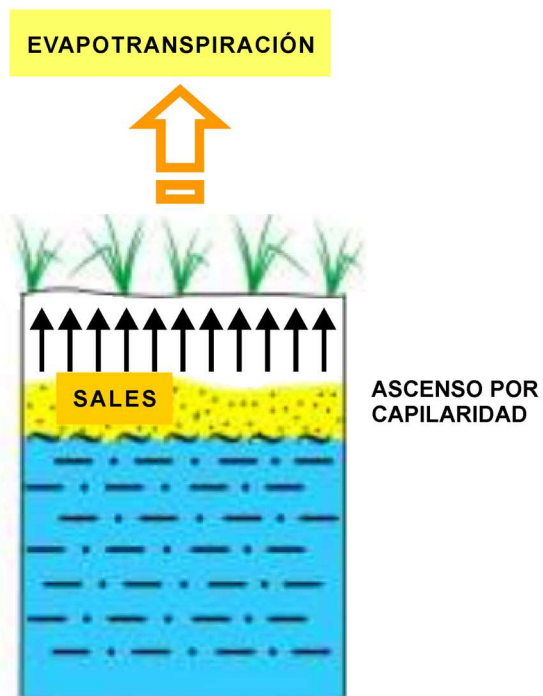
CE: conductividad eléctrica; RS: residuos sólidos; Ca: calcio; Mg: magnesio; Na: sodio; K: potasio; HCO<sub>3</sub>: bicarbonatos; Cl: cloruros; SO<sub>4</sub>: sulfatos; RAS: relación adsorción de sodio.

### El proceso de salinización de los suelos

Al disminuir las lluvias, en los sectores planos y deprimidos, los suelos se van secando por infiltración y evapotranspiración. Es entonces cuando comienza a generarse el proceso de salinización quedando interrumpido el ciclo productivo en amplias superficies de la región. En este

proceso se pueden reconocer tres fases: la primera de ellas se relaciona con el ascenso de la solución salina por capilaridad. La evapotranspiración se incrementa con el aumento de las temperaturas y vientos de primavera, actuando como una verdadera bomba que succiona en forma ascendente a la solución salina, a través del espacio poroso del suelo (Fig.1).

La segunda fase consiste en la concentración salina en el horizonte superficial en función de los factores mencionados anteriormente (Fig. 2). La tercera fase del proceso de salinización es la formación de las costras salina en superficie, que es particularmente visible en épocas calurosas, ventosas y secas (Fig.3). Estas eflorescencias y costras salinas expresan el grado más intenso de salinización y en estos suelos se superan los 20 ds.m de conductividad eléctrica.



**Figura 1.** Salinización. Ascenso de solución Salina por capilaridad (primera fase)



**Figura 2.** Salinización. Concentración salina en el horizonte superficial (segunda fase).



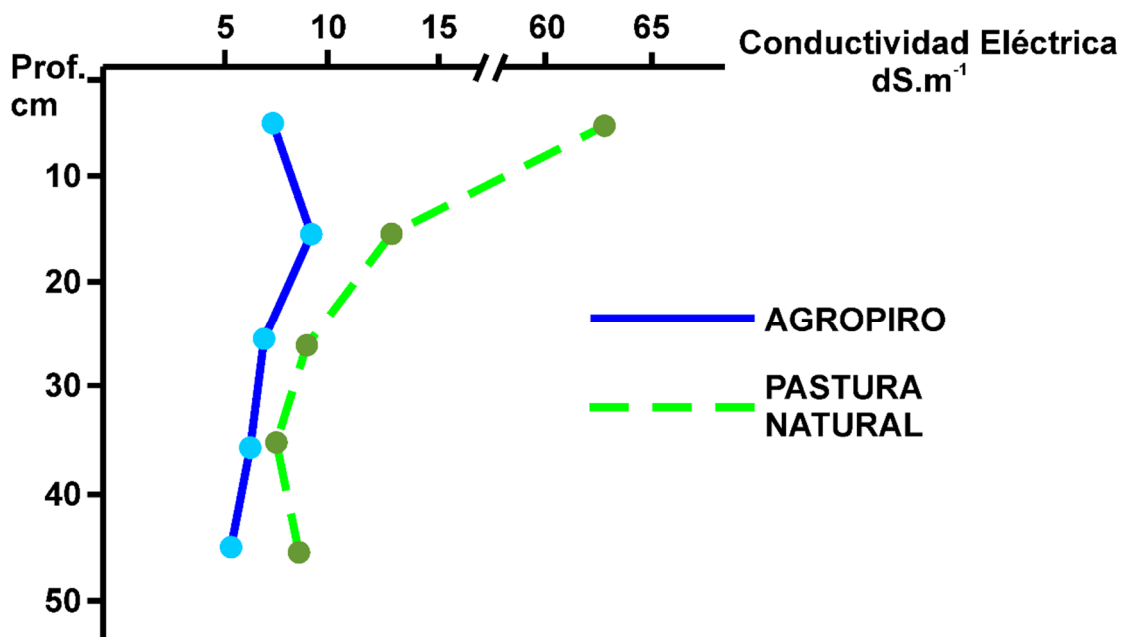
**Figura 3.** Salinización. Formación de la costra salina (tercera fase).

El problema más común de afectación de estos suelos por sales y sodio se debe principalmente a la presencia de bicarbonato de sodio que se acumula en superficie, transformándose en parte a carbonato de sodio provocando una fuerte alcalinización de los suelos con pH por encima de nueve. La presencia de sodio provoca la dispersión de las arcilla y la materia orgánica, cuya consecuencia es la compactación de los suelos que se toman duros en seco e impermeables en húmedo. La situación consignada afecta el crecimiento y desarrollo de muchas especies vegetales al limitar el crecimiento de las raíces por la resistencia mecánica y falta de aireación en el suelo. El

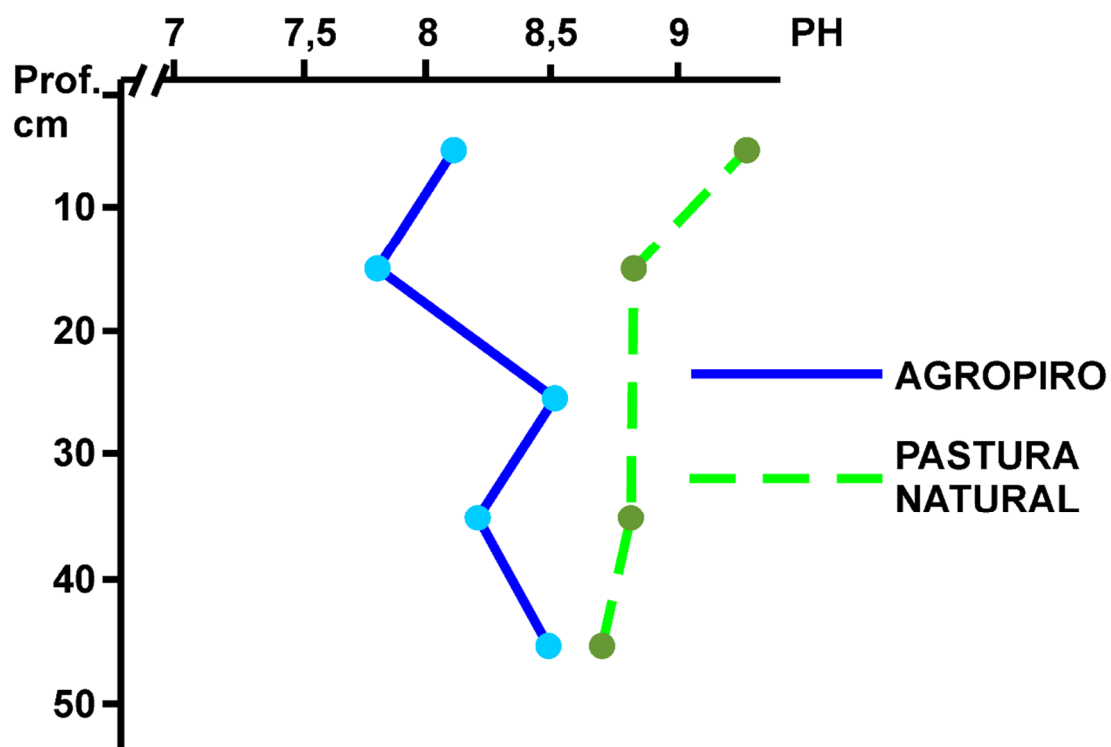
resultado final es la formación de suelos sódicos del tipo conocidos como “álcali negro” debido a la presencia de materia orgánica dispersa en superficie, con pH superiores a nueve y con problemas de disponibilidad de algunos nutrientes tales como el fósforo y los microelementos.

### **El proceso de recuperación de los suelos**

La recuperación de estos suelos se basa en la necesidad de reemplazar el sodio asociado a las arcillas y la materia orgánica por el calcio. Esto se puede lograr solubilizando el carbonato de calcio presente en el mismo suelo incrementando el contenido de dióxido de carbono a través de la actividad de las raíces y descomposición de residuos orgánicos. Cuando se recurre al sistema de recuperación utilizando plantas forrajeras adaptadas, el proceso es más lento y gradual aunque menos costoso que utilizando enmiendas químicas que aceleran el proceso tales como el yeso. Por una parte, el ascenso de los niveles freáticos puede mitigarse incrementando las pérdidas de agua por evapotranspiración de una cubierta vegetal adaptada capaz de consumir los excesos de agua de lluvia percolante antes de que provoquen ascensos de los niveles freáticos. Dicha cobertura vegetal y sus residuos pueden provocar una reducción de la evaporación del agua desde la superficie, reducir el ascenso capilar del agua freática y la concentración salina superficial. Por otra parte las pasturas adaptadas, a través de sus sistemas radicales, mejoran la porosidad y permeabilidad del suelo, facilitando la infiltración del agua de lluvia y el desplazamiento de las sales y del sodio hacia la capa freática mantenida a una profundidad adecuada. Experiencias efectuadas en el Establecimiento Miraflores sobre una pastura de Agropiro (*Thinapirum ponticum*) a un año de su implantación permitieron medir los valores de conductividad eléctrica y pH en relación con la pastura natural sobrepastoreada (Figuras 4 y 5).



**Figura 4.** Variación en profundidad de la conductividad eléctrica en un suelo con Agropirol en clausura y con pastura natural sobrepastoreada



**Figura 5.** Variación en profundidad del PH en un suelo con Agropirol en clausura y con pastura natural sobrepastoreada



Se puede observar la mejoría significativa que se produce en los 20 a 25 cm superiores del perfil en función de la lixiviación de sales y la actividad radical que contribuye al descenso de la conductividad eléctrica y del pH.

Experiencias realizadas por el Instituto de Suelos del INTA apuntan a la instalación de especies forrajeras tolerantes a salinidad y sodicidad de elevada actividad radical y producción de materia seca. Entre las de mejor comportamiento se pueden mencionar grama rhodes (*Chloris gayana*), agropiro (*Thynapirum ponticum*) y lotus (*Lotus tenuis*). Se destaca el excelente comportamiento de la grama rhodes en cuanto a su adaptación a condiciones de elevada alcalinidad con producciones de materia seca superiores a las 6 toneladas por hectárea (Cuadros 2 y 3).

Para soluciones más integrales, estas prácticas deberán completarse con el adecuado manejo de las rotaciones de cultivos de las tierras ubicadas en posiciones más elevadas del relieve, de manera de evitar o minimizar el escurrimiento de agua hacia las áreas deprimidas que incrementan el ascenso de los niveles freáticos.

Se han registrado mejoras en la condición física de los suelos tratados con pasturas, en particular con la grama rhodes y el agropiro. También se registró un leve descenso del pH, aunque continúan dentro del rango alcalino atendiendo al fuerte carácter sódico del ambiente.

**Cuadro 2.** pH, conductividad eléctrica y densidad aparente en los distintos tratamientos de fitorremediación.

TRATAMIENTO	pH	CE (dS.m )	DA (gr/ cm <sup>3</sup> )
Agropiro	9,1	0,49	1,09
Grama Rhodes	9,0	0,42	1,02
Lotus Tenuis	8,9	0,50	1,18
Pastura natural	9,5	1,67	1,42

A su vez se evaluó la producción de materia seca de las distintas especies empleadas en la recuperación de los suelos salino – sódicos.

**Cuadro 3.** Producción de materia seca de las distintas pasturas.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>MATERIA SECA (kg /ha)</b>
Agropiro	2628
Gramma rhodes	5936
Lotus tenuis	890
Pastura natural	300

## **Conclusiones**

Los suelos salino – sódicos en áreas de secano por lo general experimentan un lento proceso de mejoramiento natural que puede acelerarse mediante prácticas de fitorremediación, tendientes a mejorar las condiciones hidrofísicas, químicas y biológicas.

La cobertura de los mismos limita el flujo de sales a superficie manteniendo una salinidad del suelo similar o inferior a la de la capa freática, por lo cual el manejo de estos suelos debe orientarse a conseguir y mantenerlos cubiertos.

Se recomienda iniciar los trabajos de recuperación cuando la capa freática se encuentre en profundidad en general coincidente con la primavera. Posteriormente durante el otoño se procederá a la siembra o interseembra de especies tolerantes a la salinidad. La fertilización con fósforo principalmente se visualiza como una alternativa para integrar en el paquete tecnológico para la recuperación.

El manejo de los suelos afectados por sales que ocupan las áreas más bajas del relieve deberá complementarse con el manejo de los suelos de los sectores medanosos más elevados propendiendo a utilizar rotaciones de cultivos, sistemas adecuados de pastoreo y prácticas mecánicas de control del escurrimiento para evitar o disminuir el anegamiento y el agravamiento del halomorfismo en épocas húmedas, especialmente.

## Bibliografía

CASAS, R.R.; PITTALUGA, A. 1990. Anegamiento y salinización de suelos en el noroeste de la provincia de Buenos Aires. En: Manejo de Tierras Anegadizas. FECIC, Centro para la Promoción de la Conservación del suelo y el agua – PROSA.

CASAS, R.R. 2003. Estrategias de recuperación post – emergencia de los suelos afectados por las inundaciones. En: Inundaciones en la región pampeana. Universidad de La Plata.

CASAS, R.R.; ROSSI, M.S. 2011. Manejo de campos salinos. Ciencia y tecnología. Supercampo. Año XVII, N.º 196.

ROSSI, M.S.; BAIOCCHI, A.; CASAS, R.R. 2012. Forraje halotolerante para fitorremediación de un suelo salino-sódico. 25.ª Reunión Argentina de Ecología. Luján. Prov. de Buenos Aires. 24 al 28 de septiembre.

TABOADA, M.A.; LAVADO, R.S. 2009. Alteraciones de la fertilidad de los suelos. El halomorfismo, la acidez, el hidromorfismo y las inundaciones. Editorial Facultad de Agronomía de la UBA.

ZAMOLINSKY, A.; CASAS, R.R.; PITTALUGA, A. 1994. Manejo de suelos salinos en el noroeste de la Provincia de Buenos Aires. INTA, EEA. General Villegas. Publicación Técnica N.º 15.

---

## CAPÍTULO 23

### La digestión anaeróbica y la bioremediación de suelos

Jorge Antonio Hilbert<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ingeniería Rural, INTA Castelar

e-mail: hilbert.jorge@inta.gob.ar

#### Introducción

La realidad actual impone en las agendas para todos los sectores productivos y de servicios que interactúan con el medioambiente y específicamente con los suelos el adecuado tratamiento y disposición de los residuos orgánicos generados. Sumado a esto cuando hablamos de contaminación no solo nos limitamos a la del agua y a la del suelo, sino también a la atmosférica ya que la emisión de gases efecto invernadero como el metano liberado de las lagunas sin control contribuye en gran medida al calentamiento global del planeta.

La fermentación anaeróbica es un proceso natural que ocurre en forma espontánea en la naturaleza y forma parte del ciclo biológico. De esta forma podemos encontrar el denominado "gas de los pantanos" que brota en aguas estancadas, las lagunas de tratamiento o disposición final de residuos orgánicos, el gas natural metano de los yacimientos petrolíferos así como el gas producido en el tracto digestivo de los rumiantes como los bovinos (denominado fermentación entérica). En todos estos procesos intervienen las denominadas bacterias metanogénicas.

El biogás es un producto de la digestión anaeróbica, que se genera a través de la actividad de bacterias metanógenicas. Las condiciones anaeróbicas ocurren solamente en ausencia de oxígeno. Para reproducir estas condiciones se emplean plantas de biogás o biodigestores como unidades bien cerradas, como una laguna cubierta o un silo de hormigón con techo de lona o de membrana. El biogás generado, es una mezcla de metano y dióxido de carbono. El metano es el vector energético y su composición oscila entre el 50 hasta 75 % de esta manera en las mezclas típicas del biogas se logra un poder calorífico que oscila entre los 5500 y 6000 kcal. Este gas puede ser empleado en todas las aplicaciones normales del gas metano puro.

La producción de biogás es un tema muy actual en Argentina y también en el resto del mundo. En gran parte de las estrategias energéticas el biogás está en la consideración de los decisores políticos, dadas las implicancias energéticas y medioambientales de esta tecnología. En comparación con otras fuentes de energías renovables, como la eólica o la fotovoltaica, el biogás puede generar electricidad y energía térmica durante las 24 horas del día. El biogás constituye una parte muy importante en el "mix" de distintas tecnologías para generar energía limpia, cuidar al medioambiente y disminuir el efecto invernadero.

La Argentina se caracteriza por un sólido sector agropecuario y agroindustrial, la producción de granos, carnes, productos lácteos, alimentos, etc. Esta actividad genera una gran cantidad y diversidad de residuos y subproductos agropecuarios, como los agroindustriales y estiércoles. Si bien los residuos animales no son muy buenos en cuanto a su potencial unitario de generación, contienen bacterias que provienen de los tractos digestivos de los animales responsables del proceso que constituyen la fuente de inóculo al alcance de toda planta de tratamiento.

A estos sectores se le suma otra serie de generadores de residuos fundamentalmente concentrados en centros urbanos de diferente tamaño distribuidos a lo largo de todo el país. La característica de las aglomeraciones humanas es una gran concentración en espacios acotados de recursos orgánicos e inorgánicos que luego producen importantes problemas de disposición final. Estos recursos terminan afectando los suelos de áreas periféricas y aún distantes por medio de transporte por ríos y viento. La digestión anaeróbica y la generación de biogás también cumplen en estos casos un importante rol aportando diferentes tipos de soluciones mediante la aplicación de tecnologías específicas. Como ejemplo podemos dar en este caso las plantas desarrolladas para el tratamiento de aguas cloacales así como los equipos destinados al tratamiento de los residuos sólidos urbanos.

Los últimos 20 años han sido fructíferos en cuanto a descubrimientos sobre el funcionamiento del proceso microbiológico y bioquímico gracias al nuevo material de laboratorio que permitió el estudio de los microorganismos intervinientes en condiciones anaeróbicas (ausencia de oxígeno). Estos progresos en la comprensión del proceso microbiológico han estado acompañados por importantes logros de la investigación aplicada obteniéndose grandes avances en el campo tecnológico. Paralelamente los adelantos en electrónica, comunicaciones y calidad de materiales han permitido lograr importantes mejoras en el rendimiento y confiabilidad de las plantas de tratamiento y producción.

Los países generadores de tecnología más importantes en la actualidad son: China, India, Holanda, Francia, Gran Bretaña, Suiza, Italia, EE. UU., Filipinas y Alemania. (GMI, 2014).

Si analizamos el sector desde la óptica del suelo, nos encontramos con un fuerte déficit de reposición de nutrientes y en muchos casos un deterioro de la fracción orgánica de estos. Ante esta realidad esta tecnología puede aportar soluciones al poder incorporar el producto de los digestores a los suelos como fertilización orgánica equilibrada.

El progreso de los conocimientos de la geoquímica y los ciclos de los suelos han llevado a muchos países o regiones a establecer crecientes requerimientos para permitir la distribución o la incorporación de los efluentes tratados. De esta manera a los procesos de tratamiento se le agregan etapas adicionales de manera de poder lograr el acondicionamiento final y el cumplimiento con los límites o dosis de macro y micronutrientes.

Debe también considerarse reparos en cuanto a la aplicación indiscriminada de enmiendas sin valor de sales suministradas a los suelos con sus consecuencias en su equilibrio mineral y de intercambio catiónico.

La generación de biogás, mezcla constituida fundamentalmente por metano (CH<sub>4</sub>) dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), y pequeñas cantidades de hidrógeno (H), sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>) y nitrógeno (N) constituye un proceso vital dentro del ciclo de la materia orgánica en la naturaleza. Las bacterias metanogénicas en efecto constituyen el último eslabón de la cadena de microorganismos encargados de digerir la materia orgánica y devolver al medio los elementos básicos para reiniciar el ciclo. Se estima que anualmente la actividad microbiológica libera a la atmósfera entre 590 y 880 millones de toneladas de metano.

El biogás posee una muy larga historia a nivel mundial con una difusión creciente y sostenida en todo el mundo. Uno de los países líderes en tecnología de biogás orientada específicamente a la generación de energía con una masiva aplicación de digestatos en suelos agrícolas es Alemania con más de 7700 plantas en operación superando los 3500 MW instalados fundamentalmente en campos agrícolas sobre una base de alimentación mixta entre residuos animales y forrajes como el silo de maíz.

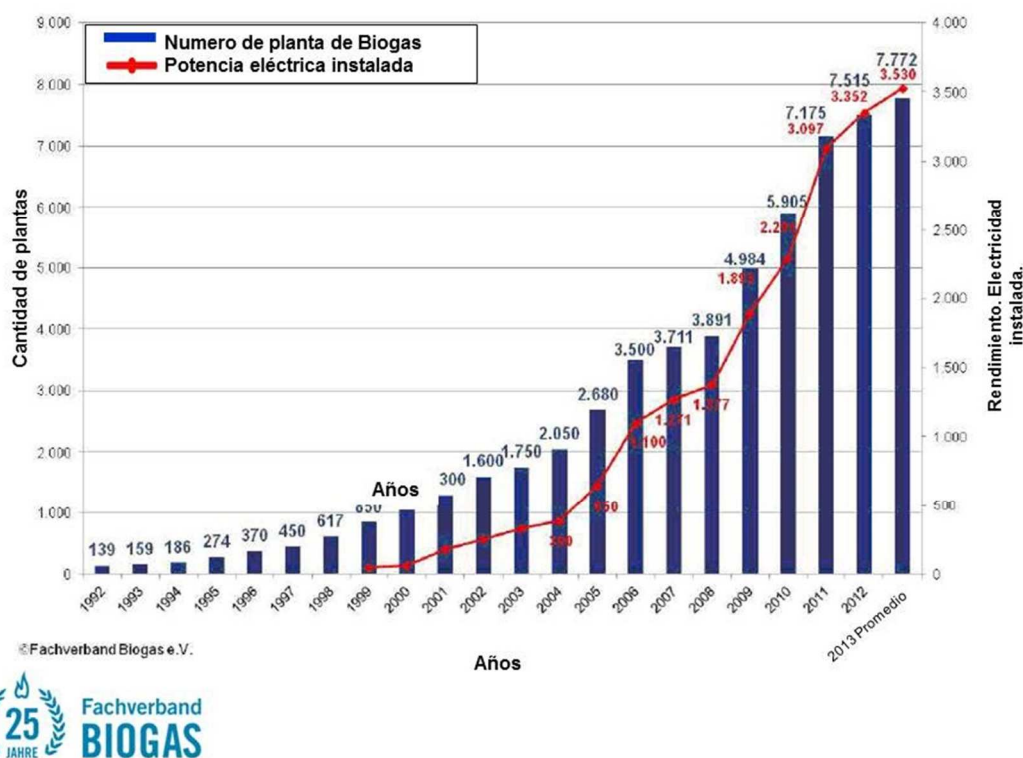


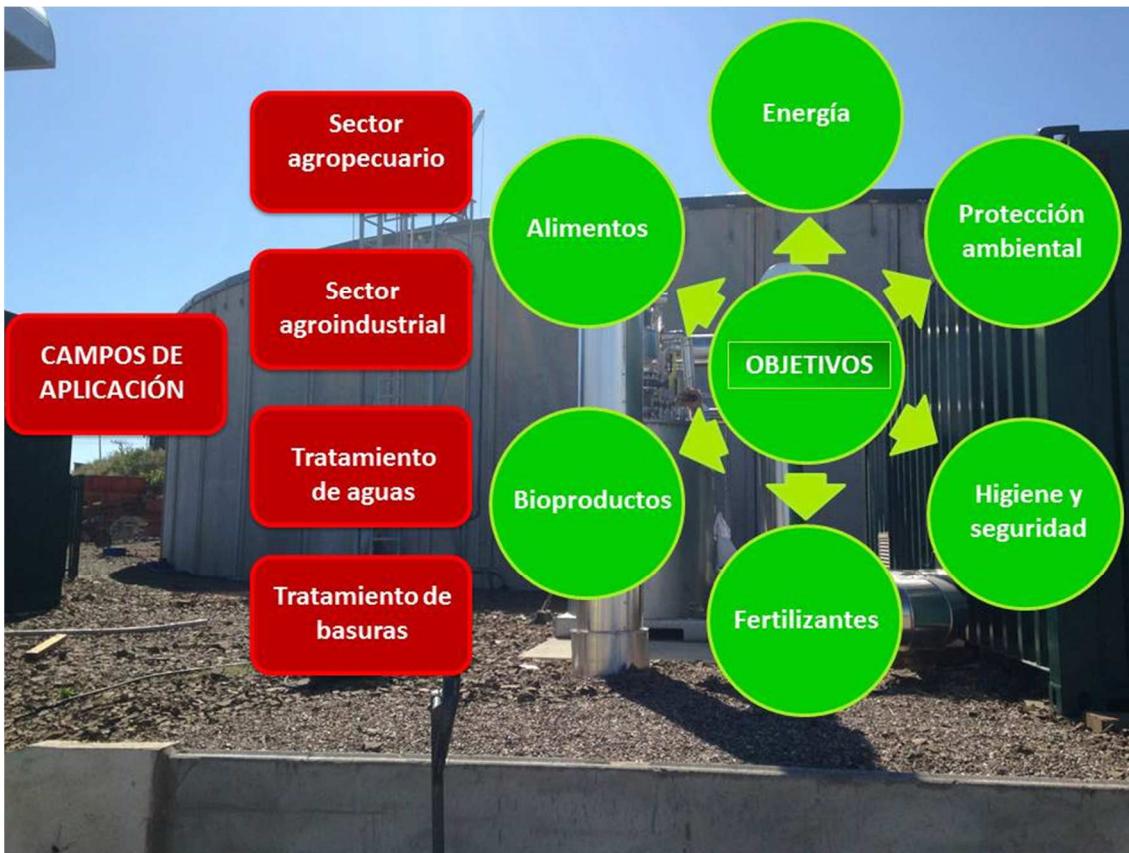
Figura 1. Evolución de las plantas de biogás del sector agropecuario en Alemania.

El desarrollo de India como de China se basa fundamentalmente en digestores de pequeño tamaño a nivel rural. India tiene instalados más de 4 millones de digestores en el sector agrícola con volúmenes que oscilan entre 2 y 5 metros cúbicos. A esto se suman más de 5500 plantas agroindustriales y un crecimiento de 25 plantas que generaran 30 MWatts. China por su parte posee más de 8 millones de digestores en las pequeñas comunidades rurales. A esto se suman plantas de mediano y gran porte en establecimientos intensivos y agroindustrias. Este país posee

uno de los centros de investigación y desarrollo más importante a nivel mundial ubicado en Chengdú, provincia de Sichuan.

### Campos de aplicación

A lo largo de los años transcurridos, la tecnología de la digestión anaeróbica se fue especializando en diferentes campos de aplicación con objetivos muy distintos. Como puede apreciarse en la Figura 2, según los campos de aplicación de la tecnología de la fermentación anaeróbica, los objetivos buscados son diferentes o tienen un distinto orden de prioridades. Analizaremos brevemente la evolución y el estado actual de cada uno de los campos descriptos.



**Figura 2.** Campos de aplicación y objetivos buscados mediante la implementación de esta tecnología.

Las plantas de tratamiento de desechos industriales han tenido una importante evolución en los últimos años y habiendo superado una primera etapa a nivel piloto, en Europa y China se encuentran actualmente siendo difundidas para determinados fines en combinación con tratamientos aeróbicos convencionales. Estos reactores anaeróbicos son de enormes dimensiones (más de 1.000 m<sup>3</sup> de capacidad), trabajan a temperaturas mesofílicas (20 °C a 40 °C) o termofílicas (más de 40 °C) poseen sofisticados sistemas de control y están generalmente conectados a equipos de cogeneración que brindan como productos finales: calor, electricidad y un efluente sólido de alto contenido proteico para usarse como fertilizante o alimento de animales.

La Argentina cuenta con equipos de este tipo en industrias diversas como la citrícola, levaduras, procesadoras de maíz, cerveceras, procesadoras de papas e industria lácteas.

La aplicación del biogás en el área rural ha sido muy importante, dentro de ella se pueden diferenciar claramente dos campos. En el primero, el objetivo buscado es dar energía, sanidad y fertilizantes orgánicos a los agricultores de zonas marginales o al productor medio de los países con sectores rurales de muy bajos ingresos y difícil acceso a las fuentes convencionales de energía. En este caso la tecnología desarrollada ha buscado lograr digestores de mínimo costo y mantenimiento, fáciles de operar. En muchos casos esto trae aparejado bajas eficiencias así como niveles de producción de energía reducidos.

El segundo tipo de tecnología está dirigido al sector agrícola y agroindustrial de ingresos medios y altos. El objetivo buscado en este caso es brindar energía y solucionar graves problemas de contaminación. Los digestores de alta eficiencia desarrollados para esta aplicación tienen un mayor costo inicial y poseen sistemas que hacen más complejo su manejo y mantenimiento.

Ambos tipos de digestores se encuentran hoy día en continua difusión. Los reactores sencillos han tenido una amplia aceptación en China, India, Vietnam, Filipinas y Brasil debido a que en estos países se ejecutaron importantes planes gubernamentales que impulsaron y apoyaron con asistencia técnica y financiera su empleo. En el resto de los países del mundo la difusión alcanzada por este tipo de digestores no ha sido significativa.

Con respecto a los digestores de alta eficiencia la mayoría se encuentran instalados en Europa (se estima un total de 10.000 digestores en los países de la C.E.E.); en el resto del mundo si bien los números son menores, esto no se debe a restricciones de orden tecnológico, sino a problemas de contexto que no favorecen la adopción masiva de esta tecnología. La Argentina está dando sus primeros pasos en este sentido con dos plantas que superan el megawatt de potencia alimentadas con residuos animales y silaje de maíz.

El tratamiento de líquidos cloacales mediante sistemas anaeróbicos solos o combinados con tratamientos aeróbicos es una técnica muy difundida en todo el mundo desde hace más de 40 años. Recientes progresos en equipos de cogeneración han permitido una más eficiente utilización del gas generado y los continuos avances en las técnicas de fermentación aseguran un sostenido desarrollo en este campo.

Debe tenerse en cuenta que la incorporación de esta tecnología obliga a una estricta regulación en cuanto a tipo de productos que se vierten en los sistemas cloacales urbanos; por este motivo en algunos países donde los desechos industriales son vertidos sin tratar en las cloacas los reactores anaeróbicos han tenido graves problemas de funcionamiento y en muchos casos han sido abandonados.

El relleno sanitario, práctica muy difundida en el mundo para enterrar las enormes cantidades de desperdicios generados en las grandes ciudades, ha evolucionado incluyendo hoy en día modernas técnicas de extracción y purificación del gas metano generado, el cual en décadas pasadas generaba graves problemas, entre los cuales figuraba el ambiental, por muerte de la



vegetación que se encontraba en las zonas cercanas, malos olores que molestaban a los residentes y explosivas mezclas de gases que se acumulaban en los sótanos de la vecindad. El avance de esta técnica ha permitido que importantes ciudades del mundo como también en la Argentina se lo utilice para generación eléctrica o su inyección como gas en la red.

Los reactores anaeróbicos agroindustriales son de enormes dimensiones (más de 1.000 m<sup>3</sup> de capacidad), trabajan a temperaturas mesofílicas (20 °C a 40 °C), o termofílicas (más de 40 °C), poseen sofisticados sistemas de control y están generalmente conectados a equipos de cogeneración que brindan como productos finales calor, electricidad y un efluente sólido de alto contenido proteico, para usarse como fertilizante o alimento de animales.

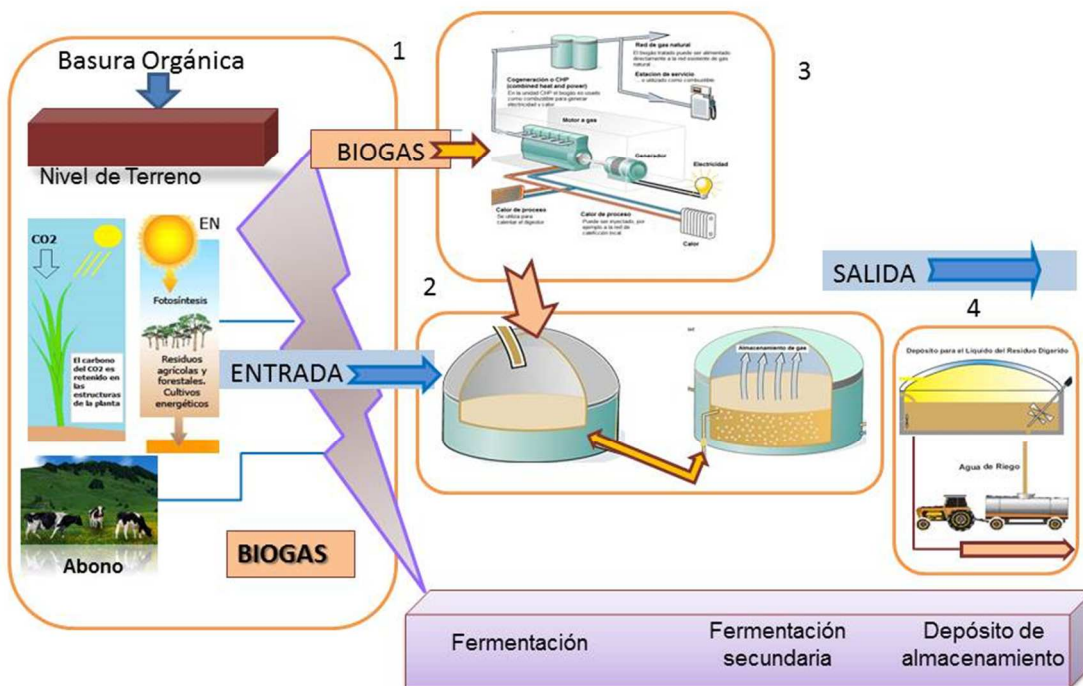
### **Materias fermentables y etapas del proceso**

Las materias primas fermentables incluyen dentro de un amplio espectro a los excrementos animales y humanos, aguas residuales orgánicas de las industrias (producción de alcohol, procesado de frutas, verduras, lácteos, carnes, alimenticias en general), restos de cosechas y basuras de diferentes tipos, como los efluentes de determinadas industrias químicas.

Debemos considerar a esta tecnología como un sistema que se inserta en el esquema de producción en el cual podemos diferenciar las etapas de:

1. captación, traslado y adecuación del residuo,
2. procesamiento y degradación de la materia orgánica (digestor),
3. uso de la energía generada en forma calórica, eléctrica o motriz,
4. captación, adecuación y uso final de los efluentes tratados.

## Componentes y funcionamiento de una planta de biogas en Alemania



**Figura 3.** Componentes de un sistema integral de aprovechamiento de biomasa mediante el uso de la digestión anaeróbica.

Básicamente, por un lado, el sistema integral incluye a las instalaciones apropiadas para la recolección y limpieza de los residuos, una cámara de recepción, una de digestión denominada comúnmente reactor y un depósito de efluentes tratados que deben ser empleados adecuadamente. Por otro lado están las líneas de gas y los depósitos y sistemas de uso. Cada una de las partes enunciadas es crucial y un proyecto puede fallar si alguna de ellas no está debidamente atendida.

La producción de gas de un digestor anaeróbico es continua a lo largo de las 24 horas del día; no ocurre lo mismo con el consumo que puede estar concentrado en una fracción corta de tiempo. Por este motivo será necesario almacenar el gas producido durante las horas en que no se consume. La dispersión del consumo y su intensidad determinará el volumen de almacenamiento requerido. Por lo tanto cuanto más concentrado esté el consumo en un período corto, mayor será la necesidad de almacenaje. Por lo general el volumen de almacenamiento no baja del 50 % de la producción diaria. (Hilbert 2007).

Para el caso de plantas para instalar en el sector agropecuario el análisis preliminar de todo tipo de tecnología debe tomar como punto inicial el aspecto humano. En este tema entran a jugar la capacidad de la mano de obra, el tiempo disponible que se puede dedicar a la nueva actividad y la predisposición para realizarla. Estos factores se tornan limitantes en muchos lugares y establecimientos debido a la sobre carga de tareas y responsabilidades a cargo del personal y a la

predisposición al manejo del estiércol o residuo que está condicionada al tipo de manipulación que se hacía de este, con anterioridad a la introducción de esta nueva técnica. Se deberá por consiguiente buscar para el análisis un tipo de digestión que no altere en forma significativa las tareas y manejo que se venían realizando para tratar de economizar la cantidad de horas/hombre para la operación.

Desde el punto de vista de la materia prima será necesario contar con un sistema de fácil recolección y manipulación evitándose en las zonas frías el lavado con agua de las instalaciones el cual produce grandes volúmenes con altas diluciones y bajas temperaturas. En algunos casos como los feedlots la introducción de esta tecnología implica importantes inversiones en el cementado de pisos de corrales, enrejados de recolección de estiércol y canales de conducción así como colocación de techos para evitar el agua de lluvia.

El medioambiente con sus características climáticas y de suelo condicionan el tipo de digester para construir incidiendo también en la selección del modelo y en el monto de la inversión inicial necesaria, ya que existen parámetros que pueden ser modificados como la temperatura de funcionamiento, el tiempo de retención hidráulica y la velocidad de carga volumétrica, los cuales están relacionados entre sí y determinan la eficiencia final del digester y la energía neta disponible.

Dada la importancia que tienen las condiciones agroclimáticas, fundamentalmente la temperatura, en la determinación de costos y definición de la técnica para emplear analizaremos con mayor profundidad este aspecto.

Para las zonas templadas y frías existen dos opciones principales que deben considerarse a fin de dimensionar y diseñar el reactor. Estas opciones están determinadas fundamentalmente por la temperatura de trabajo del equipo pudiéndose optar entre temperaturas: ambiente, 10 °C a 25 °C; mesofílica, 30 °C a 40 °C; y termofílica, 40 °C a 55 °C. El rango de temperatura en que finalmente trabaje el sistema determinará el tiempo de permanencia de la materia en el digester o tiempo de retención y la eficiencia de producción de biogás. En el Cuadro 1 se observa cómo se modifican cada uno de los parámetros enunciados.

**Cuadro 1.** Relación entre la temperatura de funcionamiento, el tiempo de retención y la eficiencia de de producción de biogás expresada en metros cúbicos por metro cúbico de digester.

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO DE RETENSIÓN (DÍAS)	EFICIENCIA (m <sup>3</sup> biogás/m <sup>3</sup> digester)	CALEFACCIÓN
10 - 25	50 - 70	0,01 - 0,30	NO
30 - 40	20 - 30	0,70 - 1,00	SÍ
40 - 55	10 - 20	1,00 - 2,00	SÍ

La modificación de los tiempos de retención tiene una directa influencia sobre el tamaño del digester requerido para un mismo volumen de material para digerir con la consiguiente modificación de la inversión inicial necesaria.

El proceso no genera calor suficiente para elevar y mantener la temperatura por lo tanto se requerirán sistemas de calefacción, aislación y control en el caso de optarse por trabajar en el rango meso o termofílico. Estos sistemas y controles también inciden en los costos iniciales y de mantenimiento de los digestores.

Para ayudar al análisis de donde tendrá mayor posibilidad de éxito esta tecnología daremos las siguientes pautas:

### **Insumos o materia prima con bajo costo de oportunidad**

Esta situación se presentará en los lugares que muestren las siguientes características:

- ✓ Zonas de producción tipo intensiva donde se concentre el sustrato o materia prima para emplear, debido a la factibilidad de manipulación y transporte de esta.
- ✓ No haya restricciones de tipo social al manejo de los desechos y al aprovechamiento del estiércol.
- ✓ Exista una tradición, costumbre o metodología de recolección de los residuos.
- ✓ Se disponga de agua en forma, cantidad y calidad suficiente para alimentar los digestores.
- ✓ Se disponga de capital suficiente, con un bajo costo de oportunidad, por haberse cubierto las principales inversiones alternativas de alta rentabilidad o se disponga de créditos preferenciales.
- ✓ Exista disponibilidad de mano de obra con capacidad y voluntad para la operación de los digestores.

### **La eficiencia adecuada del sistema**

Existe alta probabilidad de obtener rendimientos adecuados donde:

- ✓ Haya una seguridad de suministro constante en tipo y calidad de sustrato fermentable. Variaciones en el material para digerir complican el funcionamiento de los reactores.
- ✓ Se disponga de asistencia técnica para las etapas de diseño, puesta en marcha y mantenimiento del digestor.
- ✓ Se disponga de materiales adicionales para realizar codigestión e incrementar la producción de energía en forma significativa (silo de maíz, sorgo).
- ✓ La temperatura ambiente no sea baja. Zonas de menor temperatura obligan a recurrir a sistemas de calefacción y aislación de un mayor costo, y dejan disponible una menor cantidad de energía.

- ✓ Se logre un adecuado diseño del digestor, lo cual permitirá un mejor manejo, un ahorro de tiempo de operación y un aumento en la confiabilidad.
- ✓ Se disponga de un adecuado servicio de mantenimiento.

## **Los productos generados tengan un significativo valor**

Esta condición se dará en los lugares donde:

- ✓ Exista una limitante al libre acceso a los combustibles tradicionales.
- ✓ Exista una escasez en el medio convencional de obtención de energía, ej.: leña.
- ✓ No haya disponibilidad de dinero para satisfacer la demanda de energía y fertilizantes.
- ✓ Los tipos de tratamiento de los desechos deban realizarse a altos costos.
- ✓ El costo de manipuleo de las materias primas y el efluente sea bajo y competitivo.
- ✓ Las características del suelo sean tales que se logren altas respuestas en el rendimiento de los cultivos ante aplicaciones de abonos.
- ✓ Se obtenga un alto precio por la energía producida (eléctrica o inyección de gas).
- ✓ Se pueda aprovechar el calor generado en la producción eléctrica para actividades que tengan una alta rentabilidad.

Cada uno deberá efectuar un análisis cuidadoso y sumar la cantidad de las características que se enumeraron. Cuanto mayor sea la cantidad de dichos factores que se den positivamente se tendrán grandes posibilidades de implementar este tipo de tecnología con éxito y en forma redituable.

La política gubernamental será el factor determinante en la distribución y alcance de esta tecnología en las zonas preseleccionadas. El aporte del capital será uno de los factores de mayor incidencia en una primera etapa, junto con la disponibilidad de asistencia técnica.

## **Campo agroindustrial**

La aplicación de esta tecnología en el campo agroindustrial en la Argentina viene experimentando un crecimiento lento, pero sostenido; en los últimos años se vienen produciendo fuertes inversiones en este campo liderados por la agroindustria tucumana (plantas cítricas, levaduras, industria del azúcar y del bioetanol). Es así que nos encontramos con plantas en marcha de enormes dimensiones que en gran parte también han incorporado los beneficios de los mecanismos de desarrollo limpio con los denominados “bonos de carbono” generados a través de un proceso de certificación de reducción de emisiones de gases efecto invernadero por parte de dichas industrias.

Otro polo importante también lo encontramos en la provincia de Santa Fe con aplicaciones en industrias tales como la láctea, cervecera y frigorífica. Las tecnologías empleadas son diversas así como los proveedores donde se entremezclan los nacionales con empresas internacionales.

## **Otras aplicaciones**

### **Rellenos sanitarios**

Existen también en nuestro país ejemplos de captura de este tipo de gas en rellenos sanitarios, como el CEAMSE en Buenos Aires, donde se generan importantes cantidades de gas que de otra forma serían liberados a la atmósfera. Estos gases son hoy en día en parte empleados para la generación de energía eléctrica que se inyecta a la red. Los rellenos sanitarios debidamente equipados y manejados son capaces de generar enormes cantidades de biogás.

En estos casos se realiza toda un red de captación de gas por succión que luego se conduce a las etapas de filtrado y adecuación antes de su empleo en motores de combustión interna unidos a generadores.

A esta fuente debemos sumarle el tratamiento y aprovechamiento de residuos cloacales mediante plantas de tratamiento mixtas adecuadas en las cuales pueden aprovecharse los volúmenes de gas generado con múltiples usos. Existen en nuestro país modernas plantas de tratamiento y aprovechamiento de gas en este campo.

En estos casos lo que se procesa son los lodos provenientes de las etapas de tratamiento primario mediante digestores de mezcla completa. Los efluentes son dispuestos en establecimientos agropecuarios como landfarming.

Hoy en día se presentan grandes oportunidades para la expansión de esta tecnología que no cesa en incorporar innovaciones y mejoramiento que permite aumentar su confiabilidad y rendimiento.

### **Codigestión**

La mezcla de los estiércoles con sustancias de alto potencial para la generación de biogas se denomina codigestión. Esta aumenta significativamente la capacidad de producción de biogás por cada planta de tratamiento.

Por las razones mencionadas, la mezcla de estiércoles con materia de alta potencia, como los silajes de plantas enteras, constituye una forma de sumar dos materias. El uso de este tipo de mezclas para la producción de biogás es una forma muy común en Europa, particularmente en Alemania. En los últimos dos años se han comenzado a construir y puesto en marcha las primeras plantas de codigestión con capacidad de generación eléctrica que supera el Megavatio. (San Luis y Córdoba), estas se basan en estiércol de cerdo más silaje de maíz y sorgo.

## **Promoción del biogás**

Dentro de las diversas acciones promovidas a nivel internacional, se encuentra la de Global Methane Initiative que tiene como objetivo impulsar la acción cooperativa multilateral y multinacional tendiente a mitigar las emisiones de metano a la atmósfera, generadas por la intervención del hombre. Hoy en día ya son 42 los países miembros y más de 1000 entidades públicas y privadas se han incorporado. Argentina coordina la comisión de agricultura.

En los últimos años se han realizado estudios a nivel nacional que permiten cuantificar el potencial regional de aprovechamiento. Dichos estudios son la base para la localización de futuros centros de aprovechamiento. El INTA ha generado gran cantidad de información como manuales, sistemas de cálculo y estudios regionales que se encuentran disponibles en su página web de bioenergía en una sección específica para este tipo de energía.

Existen otras instituciones como el INTI, universidades de diferentes partes del país que poseen experiencia y capacidad de asesoramiento en este tema, las cuales se suman al sector privado que se encuentra en crecimiento y consolidación.

La Argentina posee Ley 26.190, que apunta a cumplir con el 8 % del consumo de fuentes renovables en 10 años. Esta normativa busca crear incentivos para la generación eléctrica a partir de fuentes renovables de energía.

## **Información sobre la producción de biogás**

La producción de biogás necesita una provisión de materia orgánica con alta capacidad de ser degradada. Los digestores pueden alimentarse con distintas materias primas. Existen variables técnicas medibles en cada tipo de sustrato entre los cuales puede mencionarse el porcentaje de sólidos, sólidos volátiles digeribles, demanda química de oxígeno, sólidos volátiles degradables. De acuerdo a las características del sustrato y a las condiciones de operación existen otros parámetros que nos brindan información sobre la eficiencia y modo de trabajo de las plantas como el pH, la alcalinidad, etc.

La biomasa en degradación dentro de un digestor requiere de una cierta cantidad de tiempo que varía en función del tipo de materia prima y de la temperatura de funcionamiento. En digestores que se alimentan en forma continua a estos días de permanencia se le da el nombre de tiempo de retención hidráulica.

Las materias con una alta concentración de materia volátil (materia orgánica digestible) producen en un mismo tiempo de digestión (tiempo retención hidráulica = TRH) una mayor cantidad de biogás. Generalmente existen muchas ecuaciones y reglas por el manejo de plantas de biogás. Gran parte de los sistemas de cálculo toman en cuenta la carga diaria de los digestores medido en materia volátil. Este valor se calcula sobre la base de kg de materia orgánica/por metro cúbico de volumen de fermentación/por día ( $\text{kg}/\text{m}^3/\text{d}$ ). Representa como parámetro la carga de alimentación

con respecto al volumen del digestor y su eficiencia de digestión. Es posible una sobrealimentación del proceso, como también una alimentación insuficiente. La carga diaria con materia orgánica depende mucho de la tecnología empleada en la planta instalada y la producción de biogás es función de esta.

Generalmente existen muchas variaciones en la tecnología de digestores y así como en las metodologías y equipos empleados en el pretratamiento de estos materiales. En ambientes agropecuarios normalmente se trabaja con digestores de tecnología de mezcla completa. Estos digestores funcionan mejor con una temperatura en el interior de 36 grados Celsius y con una buena agitación de la materia prima para evitar una sedimentación y un efecto de una capa flotante de materias livianas, como fibras, paja, hojas, etc.

Las plantas de alta eficiencia con mezcla completa se caracterizan por una carga de 3 hasta 5 kg de materia orgánica por metro cúbico de volumen de digestión por día. Este valor es producto de una mezcla preestablecida de estiércoles y silo de maíz respondiendo a una concentración de diseño de materia seca.

**Cuadro 2:** Producción estimada de biogás proveniente de distintas materias primas sobre la base de digestores de mezcla completa y calefaccionados.

	Materia seca (%)	Materia orgánica (%)	m <sup>3</sup> de biogás t MS org.	Potencia (m <sup>3</sup> ) de BG cada t de materia fresca
Silaje de maíz	32 %	94 %	642 m <sup>3</sup>	193 m <sup>3</sup>
Estiércol de cerdos estabulados en la RA	1 %	45 %	354 m <sup>3</sup>	1,6 m <sup>3</sup>
Estiércol de vacas lecheras en la RA	2 %	60 %	354 m <sup>3</sup>	4,2 m <sup>3</sup>
Estiércol de vacunas / feed lot (posible)	8 %	80 %	400 m <sup>3</sup>	25,6 m <sup>3</sup>
Guano de gallinas ponedoras	45 %	75 %	500 m <sup>3</sup>	169 m <sup>3</sup>
Granos / cereales (off spec)	87 %	98 %	700 m <sup>3</sup>	597 m <sup>3</sup>

En Argentina la difusión de esta tecnología no ha llegado a números significativos, la mayoría de las plantas a nivel agropecuario son de baja eficiencia tipo lagunas cubiertas. Recientemente se han puesto en marcha plantas de alta eficiencia y codigestión. A nivel agroindustrial existen grandes digestores. Una de las plantas más grandes esta ubicada en Tucumán, en la planta de procesamiento de citrus de la empresa de Citrus Vil. Existen adaptaciones y desarrollos que siguen los lineamientos de equipos con calefacción y agitación como el de Guadalupe de Norte, cerca de Reconquista, en la provincia Santa Fe. Este establecimiento se llama Naturaleza Viva.

Cuando se prioriza la producción de energía renovable como el biogás para reemplazar energías no-renovables, como gas natural y gasoil se requiere la mezcla de los efluentes como los estiércoles con materia de alta potencia de producción de biogás.



A modo de ejemplo, un metro cúbico de estiércol de cerdos (provenientes de una explotación de ciclo completo, estabulado todo el año muy común en nuestro país) tiene una concentración de materia seca de 1 hasta 2 %. Esta materia seca contiene 40 hasta 50 % de materia orgánica volátil, clave para la digestión anaeróbica, ya que esta fracción es la base del consumo y del metabolismo de las bacterias anaeróbicas. Una de las razones de la baja concentración se produce debido al sistema de manejo de lavado de las instalaciones con una significativa cantidad de agua. El resultado es un efluente con baja potencia para la producción de biogás. Un metro cúbico de esta materia fecal genera desde 1 hasta 2 m<sup>3</sup> de biogás, con 55 hasta 60 % de metano. Una tonelada de silaje de maíz (con la planta entera, con un promedio de 32 % materia seca), como se utilizan en tambos como forraje de vacas lecheras, produce 190 hasta 200 m<sup>3</sup> de biogás. El proceso de digestión anaeróbica solamente a base de silaje de maíz no funciona correctamente dado que no se generan las condiciones ideales para la degradación por parte las bacterias por lo tanto el agregado de otros elementos que reduzcan el porcentaje de sólidos y aporten inóculo de bacterias como son los estiércoles. De esta manera se logra llegar a una mezcla semilíquida con porcentajes de sólidos entre 5 hasta 15 % de materia seca.

Acondicionado o uso del biogás: el biogás requiere de un sistema de acondicionamiento para purificar el contenido de sulfhídrico y vapor de agua. Esto requiere de instalaciones específicas en la línea de distribución así como de la implementación de inyección regulada de oxígeno en el gasómetro para reducir el sulfhídrico.

Un valor clave en los cálculos de consumo de biogás para la generación de energía eléctrica es la concentración de metano en este. Mientras que el gas natural tiene entre 90 y 99 % de metano las proporciones de este gas en la mezcla son variables. Un metro cúbico de gas natural con casi 100 % de metano contiene alrededor 10 kWh de energía térmica.

Otro parámetro clave es la eficiencia de transformación del metano en electricidad. Este parámetro está conformado por la eficiencia de transformación de energía térmica (poder calorífico) en energía mecánica (como la energía de transmisión) y sobre la base de este parámetro está la eficiencia de generación de energía eléctrica en el generador.

Las eficiencias son menores en los motores generadores de tamaños pequeños. Para el caso de motores de 1 MW de capacidad, la eficiencia aproximada es del 40 % en la transformación de energía térmica en electricidad. Esto significa que planteado como único aprovechamiento el eléctrico, se desperdicia una gran cantidad de energía térmica que se libera a través del escape en forma de aire caliente (más o menos 18 %) y en los sistemas de refrigeración 42 %. Estos valores dependen de distintos equipos y proveedores de motores y pueden cambiar hasta 5 % dentro del mismo proveedor.

Por lo tanto si alimentamos un motor generador con biogás que contenga un 50 % de metano y partiendo de una eficiencia del 40 % en la transformación de energía térmica en electricidad, obtendríamos un factor de conversión de 2 kWh de electricidad (1 m<sup>3</sup> de biogás 50% 40% 10 kWh). Al mismo tiempo se produce una gran cantidad de calor a una temperatura cercana a los 90

grados centígrados, que en parte es empleada para la propia calefacción de la biomasa ingresante y el mantenimiento de la temperatura de fermentación dentro del digestor.

**Tabla 3:** Valores de producción de una planta de 1 MW de electricidad.

	Potencia MW	por día (24 h)	por semana (7 d)	por mes (30,5 d)	por año (8760 h * 90 %)
Demanda de biogas (m <sup>3</sup> con 50 % de metano)	500 m <sup>3</sup>	12.000 m <sup>3</sup>	84.000 m <sup>3</sup>	366.125 m <sup>3</sup>	3.943.350 m <sup>3</sup>
Producción de energía eléctrica	1,0 MW	24,0 MWh	168 MWh	732 MWh	7.908 MWh
Producción energía térmica	1,1 MW	25,2 MWh	176 MWh	769 MWh	8.304 MWh

La planta en consideración produciría entonces 24 MWh, 168 MWh por semana y 732 MWh de electricidad por mes. La ocupación de una planta se calcula sobre la base de las horas de operación anual. De las 8760 horas del año y considerando una operación estable del 90 % implicarían 7.900 horas por año produciéndose 7.900 MWh (cuadro 2).

El cálculo prosigue en una segunda etapa estimando la cantidad de materia prima necesaria para generar los volúmenes de gas ya identificados (Cuadro 3). Si un metro cúbico de estiércol de cerdos genera desde 1 hasta 2 m<sup>3</sup> (en el cálculo hemos trabajado con un promedio de 1,6 m<sup>3</sup>) de biogás y la planta tiene una demanda de 12.000 m<sup>3</sup> de biogás por día, necesitaríamos un ingreso de 7.500 m<sup>3</sup> de estiércol por día. Si bien es un valor teórico equivalente al residuo generado por un establecimiento de 75.000 cerdas en ciclo completo con todos sus reproductores y crías. En el caso de silaje de maíz, una tonelada de materia verde produce 193 metros cúbicos de biogás. El silaje de maíz tiene 32 % de materia seca (Cuadro 1). Debido a los problemas comentados de manejo de este tipo de sustratos con alta concentración de sólidos se lo mezclaría hasta alcanzar una concentración en un rango entre el 10 y 15 % de materia seca. A fin de lograr este tipo de mezclas el uso de agua es desaconsejable. Una complementación ideal son los residuos de animales que típicamente contienen entre un 1 y 2 % de materia seca. Si se analiza el proceso completo de degradación de la materia orgánica dentro de un digestor, esta puede dividirse en diferentes etapas.

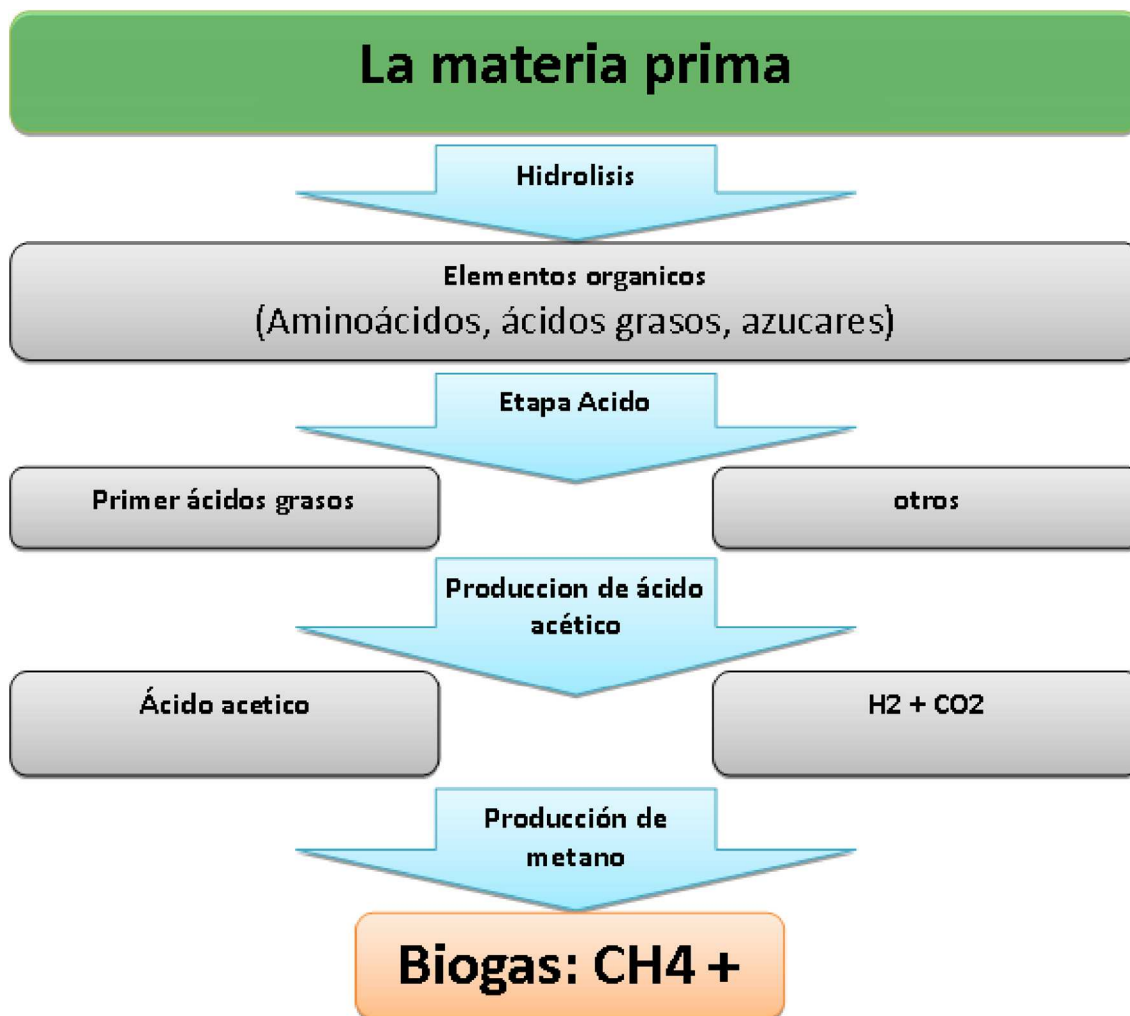


Figura 4. Orden de proceso de la digestión anaeróbica.

Cuadro 4. Composición de biogás.

Componentes	Concentración (%)
Metano ( CH <sub>4</sub> )	50 – 75 %
Dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> )	25 – 45 %
Agua (H <sub>2</sub> O)	2 – 7 Vol. %, (a 20-40 °C)
Acido sulfhídrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	20-20.000 ppm
Nitrógeno (N <sub>2</sub> )	< 2 Vol.-%
Oxígeno (O <sub>2</sub> )	< 2 Vol.-%
Hidrógeno (H <sub>2</sub> )	< 1 Vol. -%

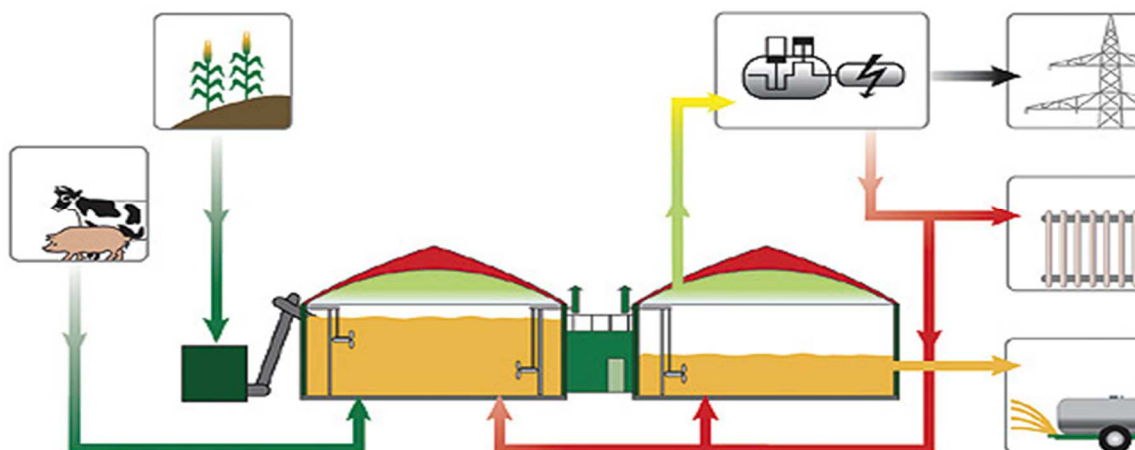
## Fichas económicas de un proyecto y de la operación de la planta

Un tema clave en toda planta de biogás es el nivel de inversión inicial así como la posibilidad de su recuperación. Con respecto al tiempo de amortización se trabaja con un período de 10 años, común por plantas energéticas. La vida útil de la planta manejada adecuadamente sería de 20

años. Para el adecuado análisis de un proyecto se deberán cumplir determinadas etapas de manera de lograr un estudio integral que asegure la sustentabilidad operativa y económica de este.

1. Ideas (brain storming), Evaluación de acceso a la biomasa
2. Cálculo energético y de las masas
3. Primer cálculo de sensibilidad de financiamiento
4. selección de concepto tecnología y de la(s) empresa(s)
5. Planificaciones finales
- 6. Evaluación de sistema de financiamiento**
7. Construcción de la planta
8. Final de obra
9. Carga y arranque del digestor
10. Aumento y estabilización de la producción de biogás

**Figura 5.** Orden de las diferentes etapas del desarrollo de proyectos de biogás, las etapas 1 a 5 son claves para asegurar el éxito.



**Figura 6.** Concepto de una planta integrada.

El valor de la inversión se realiza empleando valores específicos por un metro cúbico de volumen de digestión así como por kW instalado. Estos valores específicos varían en relación del tamaño de la planta, con valores específicos más bajos, si la planta es más grande, mientras la inversión total sube (economías de escala).

Los valores incluyen la planta entera, llave en mano, con las cuatro aéreas típicas de plantas de biogás:

- El área de tratamiento de materias primas por la alimentación.
- El área de proceso con los digestores.
- La planta de aprovechamiento de biogás con los motores generadores.
- El área de postratamiento de efluentes, como los biofertilizantes.

El valor específico para la inversión del digestor se estima en 450 USD por m<sup>3</sup> instalado, con respecto a la generación de electricidad se emplea 3.000 USD por kW instalado de capacidad de producción de energía eléctrica. Para un volumen de 6.600 m<sup>3</sup> la inversión llave en mano rondaría los 3 millones de USD, de la misma forma para el valor de 3.000 USD/kW instalado para la generación de 1 MW de energía la inversión será también 3 millones de USD.

## El efluente y su relación con el recurso suelo

El proceso fermentativo y de producción de biogás no extrae más que carbono, trazas de azufre, hidrógeno y algo de nitrógeno por reducción de NH<sub>3</sub>. Para una alimentación media de 50 kg/día y una producción diaria de 1 m<sup>3</sup> de gas la masa se reducirá solamente en un 2 %.

La viscosidad del efluente se ve reducida drásticamente debido a la transformación de los sólidos volátiles (un 50 % de estos son reducidos en un digestor en régimen). Esto hace al efluente mucho más manejable para su utilización. El efluente carece prácticamente de olor debido a que las sustancias provocadoras del mal olor son reducidas casi en su totalidad en función del tiempo de retención. La relación carbono/nitrógeno se ve reducida mejorando en forma general el efecto fertilizante del efluente.

El Cuadro 5 da los valores aproximados de la composición en los principales macronutrientes, pero se debe tener en cuenta que estos valores son sólo indicativos pues según el tipo de alimentación, raza, manejo, etc.; que tengan los animales y el tratamiento que sufran los estiércoles antes y después de su digestión estos valores pueden variar en forma significativa.

**Cuadro 5.** Composición química media de residuos animales.

MATERIAL DE CARGA ESTIÉRCOLES	COMPOSICIÓN (%)			RELACIÓN NUTRITIVA		
	N <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	N <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O
Vacuno	0,46	0,2	0,5	2,3	1	2,5
Porcino	0,72	0,4	0,3	1,8	1	0,6
Aviar (seco)	3,60	4,6	2,5	0,8	1	0,6

Todos los nutrientes utilizados por los vegetales en forma importante (nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio) al igual que los elementos menores son preservados durante la fermentación. En el caso del fósforo su porción directamente asimilable no se ve afectada ya que los efluentes contienen un 50 % en esta forma. En contraste con los otros nutrientes el nitrógeno, contenido en un 75 % en macromoléculas orgánicas y un 25 % en forma mineral en los estiércoles, sufre una transformación reduciendo a un 50 % el nitrógeno orgánico y aumentándose a un 50 % el nitrógeno en forma mineral directamente asimilables por las plantas.

Con respecto a este último nutriente es muy importante el tratamiento que se le dé al efluente después de que sale del digestor debido a que a medida que transcurren los días se incrementa la pérdida de nitrógeno mineral (5 % en 11 días, 15 % en 20 días). En el caso de secar el efluente, la pérdida puede llegar al 90 %. Una alternativa que se emplea para preservar el nitrógeno es realizar separaciones usando mallas y centrífugas de la parte líquida del efluente para luego ser empleada en fertiirrigación ya que contiene la mayor parte del nitrógeno.

Debido a su rápida descomposición el efluente brinda rápidamente nutrientes disponibles. Los ácidos húmicos presentes en este material contribuyen a mejorar la estructura del suelo y su porosidad aumentando al mismo tiempo la capacidad de intercambio. La cantidad de humus estable duplica generalmente al que se consigue mediante la utilización de estiércoles incrementando al mismo tiempo en forma significativa la actividad biológica del suelo.

El elevado contenido de nitrógeno en forma de amonio ( $\text{NH}_4$ ) presente en los efluentes ayuda a evitar la pérdida por lavado y lixiviación del nitrógeno del suelo, al igual que las pérdidas por volatilización producidas por los procesos de desnitrificación biológica. Existen amplias evidencias del incremento en la producción de distintas especies provocada por la aplicación de efluentes al suelo. Tanto en este aspecto como en los anteriores, las aseveraciones y cifras son relativas debido a que se está trabajando con sistemas biológicos muy complejos como son: el material orgánico de carga, el digestor, el suelo y finalmente el cultivo.

Esta interacción y variación provoca grandes diferencias en los resultados y hace difícil cuantificar los beneficios obtenibles de la aplicación así como también definir dosis y modos de aplicación. El proceso fermentativo también tiene un efecto beneficioso si se lo emplea como biofertilizante ya que un gran porcentaje de semillas de las malezas se tornan inviables.

A pesar de que el aspecto sanitario no puede ser ubicado estrictamente como un uso, aporta indudables beneficios al reemplazar otros sistemas costosos para obtener el mismo grado de descontaminación. El tratamiento de los desechos por vía anaeróbica elimina la acumulación de estos a la intemperie evitando la proliferación de moscas, mosquitos, otros insectos y roedores portadores de peligrosas enfermedades.

El proceso en sí mismo produce una reducción del 90 % al 99 % de los principales patógenos animales (estafilococos, salmonella, pseudomonas). Esta reducción muy importante desde el

punto de vista del saneamiento está regulada por la temperatura de fermentación y la cantidad de días que permanece la biomasa dentro del digestor (tiempo de retención).

El efluente de los digestores tiene otras aplicaciones entre las cuales merecen mencionarse: la preparación de compost, la alimentación de algas y peces y de animales en raciones balanceadas. Se han realizado numerosos ensayos y extendido sobre todo en Oriente el uso del efluente como sustrato para el crecimiento de algas y peces en estanques cerrados. En otro tipo de estanques también se crían patos y peces, los que son aprovechados para confeccionar la ración de los animales conformando lo que se ha dado en denominar "Granjas integradas".

Por un lado, como un aditivo al material vegetal para la confección de compost, el efluente es excelente ya que aporta una buena fuente de nitrógeno que acelera el proceso y enriquece al mismo tiempo al producto final con fósforo y otros elementos. Por otro lado, el proceso de compostado completa la efectiva destrucción de patógenos lograda en la digestión anaeróbica.

Esto completa los usos potenciales del efluente de los digestores, últimamente otros productos de la digestión están utilizándose a nivel experimental como es el caso del CO<sub>2</sub> obtenido de la purificación del gas. Estos usos solo son posibles en grandes plantas industriales donde la rentabilidad del producto justifique las inversiones necesarias para implementar este uso.

Concluimos con un análisis FODA de esta tecnología como un aporte a su análisis crítico en la Argentina.

## Sector biogás

### Análisis FODA

	Fortalezas	Debilidades
<b>Industria Eólica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Competitividad económica.</li> <li>- Proyectos exitosos desarrollados en los últimos años.</li> <li>- Tecnología probada a nivel internacional.</li> <li>- Energía constante de base.</li> <li>- Posibilidad de inyectar en puntos extremos de la red mejorando el factor de carga.</li> <li>- Redes de transmisión disponibles.</li> <li>- Buena aceptación e interés del público.</li> <li>- Buen potencial de generación de empleos reales.</li> <li>- Red nacional de investigadores con conocimiento del tema.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Marco Regulatorio Incompleto especialmente relacionados con el efluente de las plantas.</li> <li>- Fracasos y abandonos de plantas que deben ser remontados.</li> <li>- Alta inversión inicial y alto costo de oportunidad del recurso financiero en el sector agropecuario y agroindustrial.</li> <li>- Dependencia de importación de algunos componentes.</li> <li>- Escaso desarrollo de las empresas locales.</li> <li>- Dificultad para acceder a financiamiento en condiciones de plazo y costo.</li> <li>- Bajo nivel de conocimiento, visibilidad y apoyo práctico y efectivo por parte de</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudios preliminares de evaluación del recurso a nivel nacional y en algunas provincias.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>iniciadores.</li> <li>- Necesidad de capacitar RR. HH.</li> <li>- Falta de laboratorios de apoyo para la caracterización de productos, análisis de sus potencialidades y resolución de problemas.</li> </ul>
	<b>Oportunidades</b>	<b>Amenazas</b>
<b>Argentina y la región</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Necesidad de cubrir demanda energética insatisfecha con prioridad en lugares extremos de la red de distribución.</li> <li>- Buena perspectiva de crecimiento económico.</li> <li>- Excelente recurso biomásico con buena diversidad geográfica.</li> <li>- Capacidad industrial y tecnológica.</li> <li>- Liquidez y bajos costos de capital en el mundo.</li> <li>- Potencial demanda de instrumentos financieros de largo plazo en el mercado local.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cambios en los marcos regulatorio y tarifario.</li> <li>- Fuerte subsidio a las energías convencionales con especial énfasis en el gas importado.</li> <li>- Falta de solución al acceso al financiamiento internacional.</li> <li>- Incumplimiento de pagos y condiciones contractuales.</li> <li>- Difusión de tecnologías de baja calidad y confiabilidad.</li> </ul>

## Bibliografía

Hilbert Jorge A. 2007. Manual para la producción de biogás.  
[www.inta.gob.ar/documentos/manualparalaproducciondebiogas](http://www.inta.gob.ar/documentos/manualparalaproducciondebiogas). Visitado: 7 de agosto de 2016.



## Conclusiones

El Primer Taller Internacional de Biorremediación (PRITIBIO) 2013 realizado por el Instituto de Suelos-CIRN-INTA y la Cátedra de Microbiología Agrícola y Ambiental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA) convocó a investigadores nacionales y del extranjero que por dos días expusieron sus trabajos en biorremediación. Los citados investigadores más otros convocados oportunamente han hecho posible la realización de esta publicación. Se está trabajando en biorremediar los recursos naturales comenzando a entender el valor que estos tienen para la vida del hombre. Esto también deja un mensaje respecto a lo poderosa que es la naturaleza para mantenerse y equilibrarse a pesar de la voracidad invasiva del hombre sobre los recursos naturales.

Se plantean como grandes desafíos hacia futuro la preservación de los suelos ante los eventos extremos (ej. sequías, inundaciones, huracanes y tornados) previstos por el cambio del clima, y a cómo regenerar la fertilidad de suelos degradados y contaminados por agroquímicos, la urbanización y la minería. Es aquí donde la bioremediación tendrá un rol central para evitar que cada vez más suelos se desvíen del destino que plantea una buena funcionalidad.

## Biografía de los editores

### Brutti, Lucrecia Noemí



Ingeniera Agrónoma de la Universidad de Entre Ríos, Magister Scientiae en Microbiología del Departamento de Microbiología y Doctora en Agronomía del Departamento de Ciencias del Suelo, ambos de la Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas. Profesional de Gestión Externa y Coordinadora del Área Edafología del Instituto de Suelos-CIRN. Docente colaborador de la materia Bioindicadores en la FAUBA y de Edafología y Manejo y Conservación de Suelos en la Facultad de Ciencias Agroalimentarias de la UM. Investigadora en temas relacionados con la biología del suelo, gestión de residuos, fijación biológica de nitrógeno, gases efecto invernadero, degradación de materia orgánica, aplicaciones de bioinsumos microbianos y biorremediación de suelos. Dirección de becarios. Correctora de publicaciones científicas. Numerosas publicaciones nacionales e internacionales.

### Beltrán, Marcelo Javier



Ingeniero Agrónomo de la Facultad de Agronomía (FAUBA). Investigador en temas relacionados con la fertilidad química del suelo, la nutrición de los cultivos, manejo y conservación de los

suelos, aplicaciones de fertilizantes orgánicos y el uso de productos alternativos para el desarrollo de los cultivos. Dirección de becarios y tesis de grado. Doctorado en desarrollo en el Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (UNS), tema: efecto del centeno como cultivo de cobertura sobre la dinámica de macro y micronutrientes. Presentaciones realizadas en congresos y publicaciones en revistas nacionales e internacionales.

**García de Salamone, Inés Eugenia**



Ingeniera Agrónoma y Magister Scientiae en Producción Vegetal, de la Facultad de Agronomía (FA) UBA y Philosophical Doctor en Ciencias del Suelo, University of Saskatchewan, Canadá. Profesora a cargo de la coordinación de la asignatura Microbiología Agrícola y Ambiental de la FAUBA. Investigadora en temas relacionados con la ecología microbiana de sistemas suelo planta, aplicaciones de bioinsumos microbianos y biorremediación de suelos contaminados con petróleo y con elevadas dosis de herbicidas. Dirección de becarios y tesis de grado y postgrado. Numerosas publicaciones nacionales e internacionales.

Este libro fue una promesa realizada durante el PRITIBIO 2013 (Primer Taller Internacional de Biorremediación) que fue organizado entre la FAUBA (Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires), la Agencia del MINCYT (Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva) y el Instituto de Suelos CIRN INTA (Centro de Investigaciones en Recursos Naturales del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). Es un compendio de las presentaciones realizadas en ese taller.

Puede definirse a la contaminación, como la presencia de un elemento o una sustancia en cantidad no aconsejable en un lugar que no corresponde. Sucede por intervención natural o antrópica y puede provenir de una fuente fija o una difusa. En cuanto al tipo de contaminante, podrían ser pesticidas, petróleo, residuos urbanos, metales pesados, residuos agrícolas, residuos pecuarios.

Biorremediación se refiere a un conjunto de metodologías que utilizan microorganismos o partes de ellos, seleccionados naturalmente o por modificaciones de la ingeniería genética, para degradar sustancias que se han trasladado a un lugar que no corresponde, o están en cantidades no recomendables como resultante de un proceso productivo mal manejado o de un incidente natural.

Bioprofilaxis, se refiere a las metodologías utilizadas para prevenir una contaminación.

La biorremediación y la bioprofilaxis podrían categorizarse por el recurso natural afectado, las herramientas utilizadas para biorremediar y/o el contaminante participante del proceso.

Los recursos naturales afectados en esta publicación se refieren al aire, al agua y al suelo.

Las metodologías utilizadas son in situ o ex situ. Estas, utilizan herramientas como la digestión anaeróbica, las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas, las plantas, la bioenergía, la simbiosis micorrízica arbuscular y las camas biológicas.

Los contaminantes a los que refiere la publicación son hidrocarburos, la actividad agropecuaria en general, el biodiesel, los metales pesados, la salinidad, los PAHs, el petróleo, los pesticidas, y el relleno sanitario (biogás y líquido lixiviado).

En lo referido a herramientas, participan transformaciones físico-químicas y bioquímicas que incluyen fermentaciones y transformaciones surgidas por el metabolismo de las plantas y los microorganismos en procesos naturales de espacio abiertos, o en procesos manejados por el hombre en espacios cerrados.



Ministerio de Agroindustria  
Presidencia de la Nación