

Sistemas de tratamientos de residuos sólidos petrolizados.

(Recopilación bibliográfica)

Systems of treatment of oil sludge.

(Review)

1. [Resumen](#)
2. [Introducción](#)
3. [Alternativas de tratamiento de los residuos sólidos petrolizados.](#)
4. [Bioaumentación. Utilización de surfactantes químicos.](#)
5. [Utilización de biosurfactantes.](#)
6. [Oxidación química.](#)
7. [Bioaumentación.](#)
8. [Conclusiones.](#)
9. [Bibliografía.](#)

Resumen

En este artículo se realiza una revisión bibliográfica de los métodos que existen actualmente para tratar los residuos sólidos que se depositan en los fondos de los tanques de almacenamiento de combustibles. Se concluye que la utilización de agua calentada con vapor de la refinería disminuye la viscosidad de los lodos petrolizados, facilitando su extracción de los tanques de almacenamiento; se logra una extracción adicional de hidrocarburos de los lodos petrolizados cuando se aplican chorros a presión con determinada relación agua / solvente (diesel), o surfactantes para emulsionar los hidrocarburos; la fase orgánica de los residuales líquidos extraídos se recupera mediante sedimentación y reintroducción en el proceso de refinación. Se propone la utilización del proceso de biorremediación para tratar los residuales sólidos, el cual puede incrementar su eficiencia con la utilización de surfactantes químicos o biológicos y agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno y el ozono.

Introducción:

El tratamiento de los residuales de la industria de refinación del petróleo, comprende la disposición de los lodos acumulados en el fondo de los tanques de almacenamiento de combustibles, así como de los lodos que se encuentran en los separadores API. Estos desechos contienen hidrocarburos que pudieran ser recuperados y reutilizados en la industria de refinación, además de contener contaminantes peligrosos al medio como metales pesados, hidrocarburos poliaromáticos de carácter cancerígeno, entre otros.

El desarrollo de una tecnología eficiente para el tratamiento de estos desechos, debiera incluir la recuperación del valor energético de estos residuales y su reintroducción en el proceso productivo. El estudio de la variante tecnológica más adecuada depende de las características del residuo sólido a tratar, las condiciones del sitio contaminado, así como del costo de la propuesta tecnológica realizada.

La biorremediación es una de las tecnologías que pudiera utilizarse para tratar estos desechos, por el bajo costo de su implementación, y por la completa destrucción de los contaminantes, o su transformación a compuestos como ácidos grasos, aldehídos, cetonas, que no son dañinos al medio. Sin embargo, la presencia de compuestos persistentes en suelos o matrices acuosas, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos o los bifenilos policlorados, han conducido al desarrollo de varias tecnologías para incrementar la biodegradabilidad de estos contaminantes.

El objetivo de este trabajo es realizar una actualización bibliográfica, sobre diferentes técnicas utilizadas para el tratamiento de los lodos petrolizados que se acumulan en el fondo de los tanques de almacenamiento de combustibles, con vistas a proponer las mejores alternativas, para la recuperación de su valor energético y el tratamiento de los sólidos resultantes mediante la biorremediación.

Análisis y discusión de la bibliografía consultada.

La bibliografía consultada consta de artículos de revistas relacionadas con la temática de la química ambiental y la microbiología aplicada, patentes obtenidas por la vía de Internet. Es actualizada y abarca fundamentalmente el período 1990 al 2003; el 39 % corresponde a la etapa entre 2000 – 2003, el 35 % corresponde al período entre 1995 – 2000, el 18 % al período 1990 – 1994, y solamente el 8 % al período anterior a los años 90.

Tecnologías utilizadas en la limpieza de tanques de almacenamiento de petróleo y recuperación del valor energético de estos residuales.

En la industria de refinación del petróleo se generan distintos tipos de residuales entre los cuales se encuentran aquellos acumulados en el fondo de los tanques de almacenamiento de petróleo. Estos residuales comúnmente llamados lodos, se han convertido en un grave problema debido a que las regulaciones ambientales existentes los clasifican como un residuo peligroso, con las correspondientes dificultades en el método de su disposición y tratamiento, generalmente costosos, sin embargo, mediante apropiados sistemas tecnológicos, pueden ser convertidos en materiales de valor energético o pueden ser dispuestos de manera conveniente (Jonson, Jr. et al., 1993).

Los hidrocarburos acumulados en el fondo de estos tanques sufren un envejecimiento que es gobernado por tres tipos de procesos:

- Físicos, tales como evaporación, disolución y emulsificación.
- Químicos, como oxidación química o fotoquímica.
- Biológicos, como la degradación aeróbica y anaeróbica.

Dichos procesos alteran algunas de las propiedades de los hidrocarburos presentes en estos residuales tales como la densidad, viscosidad y el contenido de carbón, originando la precipitación de éstos hacia el fondo de los tanques en los cuales predominan las fracciones de punto de ebullición superior a 350 °C. Además, el oxígeno atmosférico reacciona con los compuestos no saturados dando origen a gomas y ácidos que coprecipitan con otras impurezas formando emulsiones en el agua. La presencia de complejos metálicos, nitrógeno, oxígeno y azufre contribuye a esto.

En estos residuales también se encuentran una gran variedad de sólidos tales como metales pesados, arena, arcilla, productos corrosivos y residuos de catalizadores, lo que provoca que la carga contaminante que contienen estos desechos sea sustancialmente elevada. La composición del lodo puede variar significativamente lo cual está en dependencia del origen de éste, por ejemplo: los lodos acumulados en el fondo de los tanques de almacenamiento de petróleo, lodos que se encuentran en el fondo del separador API, y los lodos acumulados en el fondo de los tanques de separación por flotación inducida (IAF: Induced Air Flotation). En la composición de estos lodos varía fundamentalmente el contenido de agua e hidrocarburos más que el contenido de sólidos (Clements, et al., 1978). Podemos citar algunas composiciones reportadas para estos lodos petrolizados: 90 % de hidrocarburos, 5 % agua y 5 % sólidos, aunque otros presentan composiciones de 20 % hidrocarburos, 50 % de sólidos, y la composición de agua no es limitada aunque tiene un límite práctico de 75 % (Jonson, Jr. et al., 1993).

La presencia en estas fracciones del petróleo de una elevada concentración de hidrocarburos poliaromáticos, los cuales presentan propiedades mutagénicas y cancerígenas, justifica que estos residuales sean clasificados por agencias internacionales como la EPA (Environmental Protection Agency) como altamente peligrosos. Los métodos tradicionales de limpieza de tanques de almacenamiento de petróleo requieren el uso extensivo de trabajo manual en el interior de éstos mediante el empleo de palas. Sin embargo, se ha tratado de reducir la exposición del personal a elementos tóxicos mediante la utilización de diversas tecnologías. Las diferentes alternativas que se han desarrollado con el objetivo de extraer estos residuales de los tanques de almacenamiento de petróleo, incluyen en algunos casos, la recuperación del valor energético de estos desechos (Moran, 1989; Krajicek et al, 1992; Davis, 1979).

Se ha utilizado la aplicación de agua a presión en la limpieza de estos tanques de almacenamiento, y esta fase acuosa es trasladada a otros tanques para el recobrado del petróleo contenido en ella. Posteriormente se emplean bioemulsificadores para la extracción del residuo oleoso remanente, para lo cual se utilizan una gran variedad de microorganismos degradadores de petróleo, los cuales forman emulsiones de hidrocarburos en agua mientras crecen en estos compuestos. Como ejemplo tenemos el *Mycobacterium rhodochrous* NCIB9905 que al crecer en n-decano produce un emulsificante no iónico, la *Candela petrophilum* produce un agente emulsificante compuesto de una mezcla de péptidos y ácidos grasos, y la *Pseudomonas aeruginosa* produce surfactantes ramnolípidos. Estos microorganismos en su etapa de crecimiento aeróbico en los residuos oleosos de los tanques, liberan al medio estas sustancias extracelulares que exhiben gran especificidad en la emulsificación de sustratos hidrocarbonatos que contienen compuestos alifáticos, aromáticos y cíclicos. La adición de nutrientes es indispensable para que este proceso fermentativo transcurra adecuadamente. Como fuente de nitrógeno se adicionan sales de amonio como sulfato, cloruro, o nitrato de amonio, o también urea; como fuentes de potasio se adicionan fosfato dibásico o monobásico de potasio; y se debe adicionar alguna fuente de cationes divalentes como Mg y Ca (Gutnick et al, 1981, Hannay, 1993).

Otra tecnología aplicada con frecuencia en estos procesos, es la inyección de vapores calientes para disminuir la viscosidad del lodo que se encuentra en el interior de los tanques lo que facilita su extracción (Powell, J., E., Jr., 1998; Wartel, M., 1997; Miyasaky, M., T., 1996). Posteriormente, se aplican chorros a presión con determinada relación agua / solvente (diesel), o tensoactivos para emulsionar los hidrocarburos, proceso que se realiza mediante recirculación continua hasta que estos residuales son bombeados hacia otro tanque donde se realiza la separación de fases mediante sedimentación. El agua es trasladada a un sistema de tratamiento de residuales líquidos y la fase orgánica es recuperada y reintroducida en el proceso de refinación. Típicamente el 10 % del volumen de lodo permanece en el fondo del tanque como un residuo semisólido (Deal et al, 1998; Jonson; Jr. et al., 1993; Scalliet, 2000).

La sedimentación donde son separados los hidrocarburos, agua y sólidos se produce según el siguiente esquema:

Primera capa: hidrocarburos residuales y agua

Segunda capa: capa acuosa fragmentada en una capa superior libre de partículas sólidas y una inferior conteniendo sólidos y agua.

Tercera capa: sólidos con menos del 10 % de hidrocarburos.

Para la satisfactoria separación de estas capas es necesario un tiempo de residencia de 1 a 2 horas. Como puede observarse, los sólidos resultantes contienen menos que el 10 % de hidrocarburos, y en estas condiciones pueden ser tratados mediante biorremediación (Clements et al, 1978).

Se han utilizados mecanismos para evitar la formación de estos lodos en el fondo de los tanques de almacenamiento de petróleo. Entre estos podemos citar la circulación continua del contenido de hidrocarburo en el tanque, mediante un chorro de combustible que se introduce horizontalmente en el fondo de éste. Esta circulación continua de la masa de combustible sobre todo en la zona cercana al fondo de los tanques evita la formación del lodo. Otros procedimientos emplean un barrido automático en el fondo de los tanques mediante un brazo mecánico (Deal et al, 1998).

El llamado sistema THOR utiliza agua que es calentada con vapor de la refinería para disminuir la viscosidad del lodo y mejorar su extracción, la cual es bombeada al tanque mediante una bomba sumergible. El agua se mantiene circulando durante todo el proceso de liquefacción del contenido del tanque lo cual dura normalmente de 7 a 8 días. La temperatura requerida para procesar el lodo depende de la estabilidad de la emulsión, de la viscosidad del lodo y de la intensidad del mezclado. El hidrocarburo recobrado es reintroducido en el proceso de refinación mezclándose con el crudo en determinadas cantidades. También se ha reportado la adición de solventes seguida por la adición de sales inorgánicas las cuales generan gases y calor, facilitando la remoción y la flotación de la fase orgánica (Franco et al, 1996). Para esto se utiliza una solución acuosa de sales de nitrógeno, formada preferentemente por una sal oxidante como cloruro de amonio o sulfato de amonio, con una sal reductora como el nitrito de sodio en presencia de un catalizador que es un ácido débil como el ácido acético. En esta limpieza termoquímica se libera nitrógeno gaseoso lo cual causa turbulencia y la flotación espontánea del lodo, que también es calentado por la liberación de calor en esta reacción, solubilizándose en el solvente. Dependiendo de la composición de estos lodos, o sea si contienen una considerable cantidad de hidrocarburos de bajo peso molecular, los gases pueden ser recobrados para ser reutilizados (Clements et al., 1978)

Sistema semejante ha sido utilizado por otros autores los cuales reportan una combinación de solventes de extracción constituida por al menos un hidrocarburo alifático de 8 – 10 átomos de carbono en la molécula, al menos un hidrocarburo aromático del tipo benceno o naftaleno, y un agente emulsificante y dispersante. Esta mezcla tiene un gran poder de disolución con respecto al lodo, el cual está compuesto por hidrocarburos pesados que tienen la propiedad de romper las emulsiones que pueden ser producidas entre éstos y el agua. Estos constituyentes de la mezcla de extracción tienen la capacidad de actuar como dispersantes con las partículas de hidrocarburos y también con las de sólidos, impidiendo que estas últimas se aglomeren (Forster, 1984).

Como se conoce, la composición de estos lodos - siendo una mezcla de hidrocarburos, sólidos y agua - le impide ser directamente utilizado en las refinerías como combustible, por lo que se requiere la remoción de las porciones significativas de sólidos y agua. Con este objetivo se han desarrollado diversas tecnologías como la separación de estos sólidos de la fase acuosa mediante filtros presurizados. Este sistema se ha aplicado a fondos de tanques que son relativamente de fácil bombeo, generándose un sólido de fácil disposición. Para lograr un recobrado adicional de productos útiles se emplea una extracción con solventes, y los sólidos generados se tratan mediante biorremediación (Jonson, Jr. et al., 1993).

Se ha utilizado extensivamente la aplicación de la pirólisis para el tratamiento de estos residuales, en sistemas de tratamiento que recuperan entre el 85 al 90 % de los hidrocarburos presentes originalmente en el lodo. Esta

unidad de pirólisis trae como ventaja la generación de gas utilizable como combustible, y la disminución del contenido de hidrocarburos en los residuos sólidos. Mediante la conversión pirolítica se transforman los hidrocarburos sólidos en gases e hidrocarburos líquidos, y las temperaturas requeridas son de 1200 – 1800 °F. Los gases obtenidos a elevadas temperaturas son condensados en sus constituyentes líquidos que pueden ser utilizados en la misma unidad de conversión pirolítica (Breu, 1995).

Alternativas de tratamiento de los residuos sólidos petrolizados.

Biorremediación.

La gran mayoría de las sustancias químicas contaminantes de la industria pueden ser degradadas por los microorganismos. Esto se produce mediante la combinación de procesos metabólicos donde se obtiene una degradación parcial de estos contaminantes, o mediante la utilización de estas sustancias como sustratos de crecimiento por los microorganismos, produciéndose, al menos, la mineralización de parte de la molécula. De esta forma, con la estimulación del crecimiento microbiano *in situ*, puede obtenerse la destrucción o conversión de estos contaminantes en productos menos dañinos. Este procedimiento conocido como biorremediación, necesita la presencia de determinados compuestos para lograr el crecimiento microbiano, como nutrientes, y donantes de electrones y/o aceptores de electrones.

La mayoría de los contaminantes pueden ser clasificados como compuestos alifáticos o aromáticos que contienen diferentes grupos funcionales, tales como: - OH, - Cl, - NH₂, - NO₂ y - SO₃. Comportándose como donantes de electrones, estos contaminantes son oxidados como consecuencia del metabolismo microbiano, y en el mejor de los casos, son mineralizados. Como ya se mencionó, algunos de los intermediarios producidos en estas reacciones son asimilados como fuente de carbono para el crecimiento microbiano (Bouwer et al., 1993). Las condiciones ambientales tales como la ausencia o presencia de oxígeno, la disponibilidad de otros aceptores de electrones como los nitratos o los sulfatos, influyen en el grado de degradación de estos compuestos.

Mientras los microorganismos aerobios utilizan reacciones oxidativas para la transformación de estas sustancias, los anaerobios utilizan reacciones de tipo reductivas. Existen diversos mecanismos propuestos que describen detalladamente como ocurren estos procesos (Reineke, W., 2001; Reineke, W., 1998).

Los tratamientos de biorremediación pueden ser realizados *in situ* o *ex situ*. Los tratamientos *in situ* se aplican directamente al sitio contaminado, los cuales pueden incluir la inyección de aire mediante tuberías (Gruíz et al., 1995). Los tratamientos *ex situ* requieren la excavación y el transporte del suelo contaminado, lo cual puede traer como consecuencia elevados gastos. En algunos casos esto puede estar justificado por la elevada eficiencia del proceso biológico si se realiza en reactores de fase fluidizada, pues en estas condiciones el contacto entre los microorganismos, contaminantes, nutrientes y oxígeno es mayor que en el sistema en fase sólida. Además la agitación continua garantiza la concentración homogénea de estos contaminantes en el reactor, y por tanto la mayor biodisponibilidad de estos compuestos a los microorganismos que se encuentran en las partículas de suelo (Saporano et al., 2002).

En el caso específico de la biorremediación de los lodos petrolizados, después de ser extraídos de los tanques de almacenamiento de combustible mediante una tecnología conveniente, es montado el sistema de tratamiento que incluye su mezclado con la tierra, nutrientes, y agua. En la actualidad se aplican variadas tecnologías para incrementar la eficiencia de la biorremediación, lo cual depende del tipo de sustancia contaminante, su concentración, y las condiciones medio ambientales. Este tipo de tecnologías de tratamiento de residuales se han aplicado con resultados favorables a residuos que contienen hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) o bifenilos policlorados (BPCs), los cuales por sus características estructurales y poca solubilidad tienden a ser persistentes en el medio ambiente. Además, estas sustancias presentan propiedades cancerígenas y mutagénicas, y su incorporación en la cadena alimenticia del ser humano puede provocar un daño irreversible (Angelova, B. et al, 1999).

Entre las tecnologías a las que se ha hecho referencia anteriormente podemos citar:

- Utilización de surfactantes químicos.
- Utilización de surfactantes biológicos o biosurfactantes.
- Empleo de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno o el ozono.

Bioaumentación.

Utilización de surfactantes químicos.

Como se ha explicado, uno de los componentes mayoritarios en estos lodos petrolizados son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), los cuales son difíciles de biorremediar debido a la baja solubilidad en agua de estos compuestos. Además, los HAPs muestran una gran tendencia a ser adsorbidos e incorporados dentro de

los microporos del suelo (Knaebel et al., 1994), por lo que su biodegradación requiere, primero, la extracción de los HAPs del suelo hacia la fase acuosa para su posterior catabolismo por los microorganismos. Los surfactantes mejoran o incrementan la transferencia de masa de los contaminantes hidrofóbicos desde la fase sólida o líquida no acuosa hacia la fase acuosa, mediante la disminución de la tensión interfacial y mediante la acumulación de los compuestos hidrofóbicos dentro de la micelas (Li et al., 2002; Bardi, L., 2000).

La molécula de surfactante está constituida por una mitad hidrofílica y una mitad hidrofóbica. Esta última es usualmente una cadena hidrocarbonada que disminuye la solubilidad en agua de estas moléculas, mientras la parte polar, frecuentemente ionizable, realiza el efecto contrario, y de esta forma puede hacer el papel de intermediario entre fases inmiscibles.

A concentraciones inferiores a la concentración micelar crítica (CMC), los surfactantes existen fundamentalmente como monómeros y no contribuyen a aumentar la solubilidad de los HAPs, mientras que por encima de la CMC, los surfactantes adicionados se agregan para formar micelas de tamaño coloidal para lograr el aislamiento de su parte lipofílica del agua. La formación de micelas permite que estos contaminantes se introduzcan en el núcleo hidrofóbico de las micelas, y de esta manera se aumenta la solubilidad aparente de estos compuestos en fase acuosa (Kim et al, 2001; Randazzo et al, 2001; Berti et al, 2000; Briganti et al; 1999; Berti et al, 2002, Liu et al., 1995).

Lo anterior explica que la solubilidad de los HAPs sea proporcional a la concentración de los surfactantes cuando ésta es superior a la CMC. Cuando se emplean concentraciones menores o cercanas a la CMC, la adición de surfactantes no incrementa la solubilidad de los HAPs (Li et al., 2002; Kim et al, 2001; Tiehm et al., 1994; Brown et al., 1999, Cassidy et al, 2002). Además, se ha demostrado que a concentraciones específicas de surfactantes, todas superiores a la CMC, los surfactantes disminuyen la adhesión de las bacterias a las partículas de suelo, de tal manera que ellas se comportan como si estuvieran en suspensión en un sistema de crecimiento sin la presencia del suelo (Brown et al., 1999).

Dos mecanismos son responsables de la transferencia de los HAPs de las micelas hacia los microorganismos:

- a) Difusión de los HAPs a través de las micelas a la fase acuosa y de ésta se difunde hacia los microorganismos.
- b) Contacto directo entre las micelas y la membrana celular, quizás acompañada por la fusión a la membrana, como ha sido postulado para el liposoma fosfatidilcolina (Tiehm et al., 1994).

Para aumentar la solubilidad de los HAPs se deben emplear surfactantes que no sean fácilmente biodegradados, para que no inhiban la biodegradación de estos contaminantes mediante una degradación competitiva. La biodegradación de los surfactantes no iónicos es más difícil cuando la parte hidrofóbica de la molécula es ramificada y cuando se incrementa la longitud de la cadena etoxilada. Un anillo aromático incluido en la parte hidrofóbica de la molécula también limita su biodegradación. Los surfactantes conformados por estructuras poliméricas voluminosas también son degradados lentamente (Kim et al, 2001; Tiehm et al., 1994).

Un parámetro importante para describir las propiedades físicas de los surfactantes es el balance lipofílico-hidrofílico (BLH), el cual está determinado por la relación entre las partes hidrofóbicas y hidrofílicas de la molécula de surfactante. Este parámetro se utiliza para estimar la hidrofobicidad de un surfactante. Los surfactantes con menores valores de BLH forman micelas más grandes. Esto significa que el núcleo de las micelas tiene un mayor volumen, si se compara con el de surfactantes homólogos que tienen un mayor BLH, por lo que pueden incluir en ellos más moléculas de hidrocarburos (Li et al., 2002).

Generalmente, el incremento de la temperatura produce un aumento de la solubilidad de estos sistemas. Sin embargo, el mecanismo que explica el efecto de la temperatura difiere para surfactantes de distintos tipos. En los surfactantes iónicos el incremento de la temperatura aumenta la agitación térmica de las moléculas de surfactantes, y se incrementa así el espacio disponible para la solubilización en las micelas. En las soluciones de surfactantes no iónicos, el aumento de la temperatura tiende a incrementar el número de agregación y por tanto el tamaño de las micelas. Se ha reportado el crecimiento de las micelas cuando la temperatura se incrementa de 22 a 30 °C (Li et al., 2002).

En la aplicación práctica de los surfactantes se puede hacer referencia al procedimiento convencional de “bombeo y tratar”, en el cual la solución acuosa (nutrientes-surfactantes) es inyectada al suelo mediante bombeo en el sitio contaminado, y después extraída nuevamente del suelo, de tal forma que la solución agua-surfactante va atravesando distintas porciones del suelo contaminado. De esta forma, el contaminante es

extraído de las partículas de suelo y esta más biodisponible para los microorganismos degradadores (Jahnke et al, 2000; Carey, 2001)

En general, los surfactantes son vertidos al suelo o aplicados mediante spray. La cantidad de solución que se utiliza depende de la cantidad de hidrocarburos que están presentes en el suelo. Típicamente el rango empleado es de 1 a 30 por ciento en peso basado en el contenido de contaminantes en el suelo. Se ha reportado el uso de soluciones constituidas por una mezcla de surfactantes con un HLB (balance –lipófilico-hidrófilico) en el rango de 4.5 a 12.5 (Jahnke et al., 2000).

Después de la aplicación de la solución de surfactante al suelo éste debe ser mezclado, al menos, de 4 a 24 pulgadas desde su superficie utilizando un arado, y después son aplicados los nutrientes mediante un spray (Varadaraj et al., 1995). También pueden ser adicionados los surfactantes y los nutrientes al suelo en una misma solución (Varadaraj et al., 1994, Varadaraj et al., 1996, Varadaraj et al, 1998). Estos nutrientes son los suministradores de N y P, y entre ellos tenemos compuestos como el nitrato de amonio, el fosfato de amonio, urea, proteínas, aminoácidos, fosfato amónicos de metales alcalinos y nitratos, los cuales son solubles en agua.

Como se ha explicado anteriormente, la utilización de surfactantes químicos incrementa la solubilidad de los compuestos hidrocarbonatos que componen los lodos petrolizados, y por tanto la eficiencia de la biorremediación, pues se facilita significativamente el contacto microorganismo – hidrocarburo. Sin embargo, para la aplicación práctica de esta tecnología, se deben tener en cuenta diversos factores de los cuales depende el incremento de la biodegradación microbiana. Entre estos podemos citar el tipo de surfactante utilizado, lo cual está íntimamente relacionado con su estructura química. Esto quiere decir que en algunos surfactantes, la longitud de la parte hidrófila de su molécula, puede limitar el contacto entre el núcleo micelar y la molécula de hidrocarburo, no siendo el más adecuado para su utilización en estos fines. Además, la concentración empleada de éste también juega un rol muy importante, pues como ya se ha explicado, solamente a concentraciones superiores a la CMC, puede incrementarse la solubilidad de estas moléculas hidrófobas.

El empleo de surfactantes en la biorremediación *in situ* puede llegar a ser una tecnología muy costosa, por lo que debe estar avalada por un incremento significativo en la eficiencia del proceso. Por esta razón, antes de su aplicación práctica deben realizarse ensayos a nivel de laboratorio, para determinar las condiciones óptimas para el diseño del sistema tecnológico a gran escala. En estos experimentos se deben determinar la concentración de surfactantes que posibilite el mayor incremento en la biodegradación de los contaminantes, la biodegradabilidad del surfactante y su toxicidad hacia los microorganismos autóctonos.

Utilización de biosurfactantes.

Los microorganismos producen una gran variedad de sustancias tensoactivas o surfactantes. Los biosurfactantes son frecuentemente producidos por bacterias capaces de crecer en los hidrocarburos y se ha demostrado que estimulan el crecimiento de estas bacterias y aceleran la biorremediación. Estos surfactantes ayudan a dispersar los hidrocarburos, incrementan su área superficial para el crecimiento microbiano, y ayudan a separar las bacterias de estos compuestos emulsionados, después que los hidrocarburos que éstas utilizan como sustrato se han agotado (Ron et al., 2002).

La causa fundamental de la difícil degradación de los compuestos hidrófobos de alto peso molecular es su baja solubilidad en agua, lo cual incrementa la adsorción de éstos al suelo al enlazarse irreversiblemente, y limita la disponibilidad de estas sustancias al ataque microbiano (Knaebel et al., 1994). Los surfactantes al disminuir la tensión interfacial, extraen estas moléculas hidrófobas y las hacen más disponibles a los microorganismos (Ron et al., 2002).

La producción de biosurfactantes está asociada a la capacidad de los microorganismos de utilizar los hidrocarburos como sustratos. Se ha reportado la pérdida de la capacidad de crecer en hexadecano para la *Pseudomonas aeruginosa* mutante PG201, al disminuir la secreción de sus ramnolípidos extracelulares. Se ha sugerido que la producción de determinados biosurfactantes está condicionada por la presencia de sustratos específicos, y la estimulación del crecimiento celular que se manifiesta en presencia de éste, está restringida al organismo productor solamente. Sin embargo, muchos investigadores consideran que los microorganismos degradadores de estos contaminantes hidrófobos, son capaces de utilizar los biosurfactantes producidos por otras especies para biodegradar los contaminantes hidrófobos (Ron et al., 2002).

Existen dos tipos de biosurfactantes que son producidos por las bacterias: los constituidos por moléculas de bajo peso molecular y los polímeros de elevado peso molecular. Los biosurfactantes de bajo peso molecular

son generalmente glicolípidos, en los cuales los carbohidratos están unidos a largas cadenas de ácidos alifáticos, o lipopéptidos. Los bioemulsificadores, tales como los ramnolípidos, son disacáridos que están acilados con una larga cadena de ácidos grasos o ácidos grasos hidroxilados. Uno de los más estudiados es el ramnolípido producido por varias especies de *Pseudomonas*, el cual está constituido por dos moles de ramnosa y dos moles de ácido β -hidroxidecanoico (Ron et al., 2002). Los biosurfactantes de bajo peso molecular tienen una baja concentración micelar crítica e incrementan la solubilidad aparente de los hidrocarburos incorporándolos en las cavidades hidrofóbicas de las micelas.

Los biosurfactantes de elevado peso molecular están compuestos por polisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas, o mezclas complejas de estos biopolímeros. Estos son menos efectivos reduciendo la tensión superficial, sin embargo son eficientes al cubrir las gotas de hidrocarburos e impedir que éstas se unan, emulsionando así a estas sustancias y aumentando su área superficial (Ron et al., 2002; Rocha et al., 1997). De esta manera, estos biopolímeros que son producidos por la célula al mismo tiempo que los biosurfactantes de bajo peso molecular, emulsifican los hidrocarburos incrementando su área superficial, mientras que los segundos, incrementan la solubilidad y la separación de las células de las gotas de hidrocarburos después de que estas las han utilizado (Falatko et al., 1992). Además se caracterizan por poseer una elevada especificidad a los sustratos, por ejemplo, algunos emulsifican eficientemente mezclas de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, pero no emulsifican a estos diferentes tipos de hidrocarburos por separado; otros pueden emulsificar hidrocarburos puros pero solamente de elevado peso molecular. El biosurfactante de este tipo más estudiado es producido por diferentes especies de *Acinetobacterias*, el cual es un complejo de un heteropolisacárido y una proteína, cuya actividad superficial resulta de la presencia de ácidos grasos que son unidos a los polisacáridos por la vía O-éster y enlaces N- acilados (Ron et al., 2002). Muchos de estos lípidos que constituyen los biosurfactantes son los componentes mayoritarios de la membrana celular, formando una doble capa de lípidos con la parte hidrofílica hacia la parte interior y exterior de la membrana (Falatko et al., 1992).

La cantidad liberada de estos biosurfactantes por la célula, depende del sustrato utilizado, las condiciones ambientales, la disponibilidad del sustrato y la actividad de la biomasa (Ron et al., 2002; Déziel et al., 1996; Falatko et al., 1992). En un estudio realizado sobre la producción de biosurfactantes utilizando como sustrato naftaleno y fenantreno, se obtuvo una menor producción de glicolípidos a partir del fenantreno, pues éste es mucho menos soluble en agua que el naftaleno, y las células requieren más tiempo para adaptarse a la utilización de este sustrato poco accesible (Falatko et al., 1992).

Si el biosurfactante está unido a la célula, puede provocar que la superficie celular microbiana se haga más hidrofóbica en dependencia de su orientación. Por ejemplo, la hidrofobicidad de la superficie celular de la *Pseudomona areuginosa* es muy incrementada por la presencia de un ramnolípido unido a la membrana celular (Falatko et al., 1992), mientras que la hidrofobicidad de las *Acinetobacterias* es reducida por la presencia del emulsificador. Todo esto sugiere que los microorganismos pueden usar sus biosurfactantes para regular las propiedades de su superficie celular, y de esta forma, unirse o desunirse a los hidrocarburos de acuerdo a sus necesidades. Durante la fase de crecimiento exponencial, la emulsión – conteniendo los hidrocarburos - es unida a la célula en la forma de una minicápsula. Después que son degradados todos compuestos que utiliza la célula como sustrato, ésta se separa de esta emulsión para buscar otro sustrato fresco (Ron et al., 2002). Las especies de *Pseudomonas*, las cuales son frecuentemente aisladas de los suelos contaminados con HAPs, producen un biosurfactante compuesto por una mezcla de diferentes ramnolípidos extracelulares cuando crecen en sustratos insolubles (Noordman et al., 2002, Arino et al., 1996). Se ha observado que estos compuestos producidos durante su crecimiento en naftaleno, promueven la solubilización de este sustrato. Sin embargo, la producción de biosurfactantes no parece estar motivada solamente, para facilitar la asimilación de los sustratos insolubles, pues la liberación de estos glicolípidos ha ocurrido en sustratos solubles tales como el glicerol. La excreción de estos biosurfactantes por la célula parece obedecer más a una necesidad fisiológica como es la adhesión de las bacterias a las interfases, así como a la regulación de la hidrofobicidad de la membrana celular, cuando se produce una limitación en la cantidad de nutrientes como el nitrógeno. Otra posibilidad es que estos ramnolípidos ejercen un efecto tóxico sobre las otras especies, y de esta forma la *Pseudomona areuginosa* garantiza su supremacía sobre los otros microorganismos (Arino et al., 1998).

Se ha reportado la adsorción de los surfactantes al suelo, lo cual se debe al alto contenido de materia orgánica que éstos tienen (Kanaebel et al., 1994). Este es un gran problema para la utilización práctica de los surfactantes, y teniendo en cuenta que unos son más afectados que otros, las propiedades de adsorción necesitan ser caracterizadas previamente para la determinación de cuán grave puede afectar este fenómeno a los surfactantes generados en la degradación de los hidrocarburos por estas bacterias (Falatko et al., 1992).

Al parecer, solamente una mezcla de los surfactantes producidos durante la degradación de estos hidrocarburos, incluyendo lípidos celulares, incrementa la solubilidad y facilita la degradación de estos compuestos. Los lípidos celulares tienen excelentes propiedades como surfactantes y pueden formar micelas a bajas concentraciones, pero estos surfactantes no liberan los compuestos orgánicos solubilizados para su degradación (Falatko et al, 1992). Un incremento en la solubilidad aparente del naftaleno ha sido observada cuando la concentración de glicolípidos excretados por la especie *Pseudomonas areuginosa* 19SJ excede la concentración micelar crítica (Déziel et al., 1997).

La estabilidad de la dispersión y emulsión de los hidrocarburos depende de parámetros químicos y físicos, tales como el pH, la temperatura, y la disponibilidad de oxígeno que influye directamente en el metabolismo del sustrato. La actividad del biosurfactante es particularmente sensible a los cambios del pH, y se ha observado que la mayor actividad de la emulsificación se ha obtenido a pH cercanos al neutral (Rocha et al., 1997).

Los bioemulsificadores pueden ser adicionados como un aditivo para estimular la biorremediación, sin embargo, también se puede incrementar la concentración de bioemulsificadores mediante la adición de bacterias que los producen. Las bacterias que producen los bioemulsificadores pueden también participar en la biodegradación de los hidrocarburos, y alternativamente, pueden funcionar como una familia de bacterias que suministran los emulsificadores a las otras bacterias que degradan estos contaminantes (Ron et al., 2002).

Aunque se ha discutido mucho acerca de los mecanismos por los cuales los microorganismos producen surfactantes, sí se ha establecido como un hecho confirmado, que las bacterias productoras de biosurfactantes se encuentran en mayor concentración en los suelos contaminados por hidrocarburos (Déziel et al., 1996).

Si comparamos los resultados que han reportado al emplear surfactantes químicos y surfactantes biológicos debemos decir que estos últimos son más efectivos incrementando la biodisponibilidad de los compuestos hidrofóbicos que los surfactantes químicos, pues son más selectivos, menos tóxicos, más resistentes a los cambios del medio ambiente y más económicos.

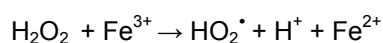
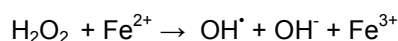
En la aplicación de varios surfactantes químicos se han reportado, efectos positivos y negativos en la biodegradación (Ron et al., 2002; Tiehm et al., 1994; Rocha et al., 1997). Por ejemplo, en la hidrólisis del dodecil sulfato de sodio se forman iones HSO_4^- que conducen a la acidificación del medio, y por tanto se afecta negativamente a la población microbiana. Sin embargo, otros surfactantes químicos como el Triton X100 o el Tween 80, han sido utilizados con muy buenos resultados en la biorremediación. Todo esto quiere decir que los resultados que se obtendrían de la aplicación de este tipo de productos con el objetivo incrementar la biodegradación microbiana, deben ser estudiados para cada caso específicamente, y para cada surfactante, sea de origen biológico o químico.

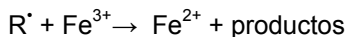
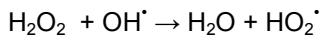
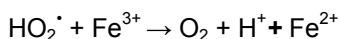
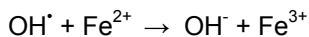
Oxidación química.

En el tratamiento de los lodos petrolizados se aplican también tecnologías basadas en la oxidación química de estos contaminantes. Estos procesos se combinan con la biorremediación, de tal manera que se produce inicialmente la oxidación o transformación parcial de estos contaminantes a compuestos más solubles en agua, los cuales en estas condiciones pueden ser más fácilmente biorremediados.

Se han reportado para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos, y/o hidrocarburos policlorinados sistemas tecnológicos en los cuales se utilizan una combinación de tratamientos en la siguiente secuencia: tratamiento biológico / químico / biológico,. De esta manera, estos hidrocarburos son primeramente biodegradados en una digestión aeróbica o anaeróbica en condiciones apropiadas, obteniéndose el producto de la primera biodigestión. Posteriormente, éste es sometido a un tratamiento químico con peróxido de hidrógeno en presencia de iones ferrosos, preferentemente en un reactor en fase fluidizada donde son oxidados los hidrocarburos, siendo en este estado más fácilmente biodegradables. Estos productos obtenidos son entonces sometidos a una segunda digestión aeróbica o anaeróbica (Soni et al, 1999).

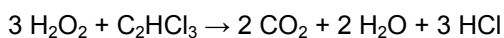
Este tratamiento químico se realiza mediante la reacción de Fenton, donde se produce la generación de radicales hidroxilos que facilitan la oxidación de contaminantes tales como los fenoles, clorofenoles, bifenilos policlorinados (BPCs), alcoholes polivinílicos, hidrocarburos poliaromáticos (HAPs) y clorobenceno (Nadarajah et al, 2002). La aplicación del peróxido de hidrógeno a suelos o sistemas acuáticos comprende una variedad de reacciones competitivas tales como:





Como puede verse, la reacción de Fenton comprende la producción de radicales hidroxilo por la acción de los iones ferrosos en el peróxido de hidrógeno, liberándose iones férricos e iones hidroxilos. Posteriormente, el ión férrico cataliza la producción de radicales hidropéroxidos e ión hidrógeno, convirtiéndose el ión férrico a ferroso (Kukor et al, 2002; Siegrist et al., 2000; Gates – Anderson et al., 2001).

La reacción estequiométrica simplificada entre el peróxido de hidrógeno y el tricloroetileno (TCE) se muestra a continuación:



Como es conocido, la hidroxilación de los compuestos orgánicos es un paso necesario para la degradación biológica, e incrementa la solubilidad éstos. Como en la reacción de Fenton precisamente lo que ocurre es la hidroxilación de estos compuestos, este tratamiento químico incrementa la biodegradabilidad y disponibilidad de contaminantes como los HAPs y de los hidrocarburos policlorados. Al preceder el tratamiento químico con una digestión aeróbica, se logra incrementar la eficiencia del proceso químico, quién a su vez, incrementa la efectividad del tratamiento biológico que le sigue (Soni et al, 1999).

El tratamiento químico utilizado según este procedimiento destruye preferencialmente los hidrocarburos aromáticos de 4 a 6 anillos, y se obtienen HAPs parcialmente oxidados, o sea, compuestos hidroxilados o epoxidados que son más susceptibles a la biorremediación que los HAPs originales, particularmente aquellos conteniendo de 4 a 6 anillos (Soni et al, 1999).

Aunque la reacción de Fenton tiene la capacidad de oxidar los HAPs produce una sustancial disminución del pH del suelo a 2 o 3. A este pH muchos metales pesados se hacen solubles y migran hacia las aguas subterráneas, y además este rango de pH es incompatible con cualquier forma de tratamiento biológico. Por esta razón muchos trabajos consideran una inoculación de microorganismos después del tratamiento químico, pero incrementando el pH cercano al neutro, para restaurar la población de microorganismos después de exponer el medio a las condiciones de oxidación (Soni et al, 1999; Kukor et al, 2002).

El pH óptimo para la transformación del antraceno usando la reacción de Fenton es pH 4, y se ha reportado para otros hidrocarburos como los BPCs y pesticidas, que el rango efectivo para la generación de iones hidroxilo en la reacción de Fenton es de pH 3 – 5. En esta reacción se han utilizado generalmente relaciones H_2O_2 Fe^{3+} desde 2:1 hasta 300:1 para la transformación de varios hidrocarburos. Sin embargo, se evita la utilización de concentraciones elevadas que provocan la oxidación completa de estos contaminantes, y sólo se realiza la oxidación parcial de estos compuestos para que se conviertan en productos más solubles y menos tóxicos para incrementar la degradación microbiana, o para inducir el cometabolismo de los compuestos originales. Por supuesto, después del pretratamiento con la reacción de Fenton, el pH debe ser ajustado a 7 para garantizar que el medio sea biocompatible con el desarrollo microbiano, y finalmente son adicionados los nutrientes y el inóculo (Nadarajah et al, 2002).

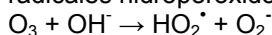
Como se ha explicado anteriormente, este tratamiento de oxidación utilizando la reacción de Fenton se favorece a bajos pH, pues un incremento de éste disminuye la solubilidad de los iones férricos (convertidos a partir de los iones ferrosos por los radicales hidroxilo), que precipitan como un complejo oxihidróxido, y como consecuencia la eficiencia de esta reacción disminuye. Pero por otra parte, con la utilización de un pH óptimo de 2 no podrían ser aplicados el tratamiento químico y el biológico al unísono, pues este último se ve desfavorecido en estas condiciones. Además, a bajos pH son solubilizados los metales pesados los cuales podrían causar un gran daño al ecosistema. Sin embargo, en la literatura se ha reportado un tratamiento utilizando una reacción de Fenton modificada la cual puede realizarse a pH cercanos al neutro, y de esta forma el tratamiento químico sería más biocompatible a la degradación microbiana (Soni et al, 1999; Kukor et al, 2002).

En este procedimiento el pH del sistema es ajustado aproximadamente a 6 con una solución de álcali (por ejemplo: NaOH), una solución buffer (por ejemplo: buffer fosfato de potasio) o carbonato de calcio. El metal de transición empleado en esta reacción, que fundamentalmente es el hierro, es enlazado a un agente quelante, y esta modificación evita su precipitación como una sal insoluble y hace el proceso más biocompatible. Por

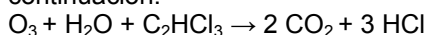
supuesto, el quelato formado es biodegradable, y se debe escoger de tal forma que no se una tan fuerte al metal de transición que impida la participación del metal en la generación de radicales libres. Generalmente se usa el catecol o el ácido gálico que normalmente están en los suelos, y son fácilmente degradados por los microorganismos, de tal forma que su utilización como quelatos no traería ninguna contaminación adicional. Aunque esta forma modificada de la reacción de Fenton no es tan eficiente como la reacción sin modificar, tiene la ventaja de que es directamente compatible con el proceso de biodegradación al realizarse bajo condiciones de pH neutro (Kukor et al, 2002; Nam et al., 2001).

Este procedimiento de oxidación puede ser aplicado como un pretratamiento para los compuestos orgánicos que serían biodegradados, o ser utilizado como un paso posterior a la biodegradación para destruir los contaminantes residuales. Según resultados reportados, la biodegradación seguida por esta reacción de Fenton modificada logró ser más efectiva que el procedimiento inverso. Esto quiere decir que los HAPs fácilmente biodegradables (de dos o tres anillos), son destruidos mediante la biodegradación, y entonces la reacción de Fenton modificada elimina los más recalcitrantes, o sea, los de 4 y 5 anillos aromáticos. Esto coincide con investigaciones donde se plantea que cuando en el suelo se encuentran en forma mayoritaria HAPs de 4 a 5 anillos, la oxidación química es preferida como pretratamiento, y cuando los hidrocarburos de 2 a 3 anillos abundan en el suelo, la biodegradación es recomendada como un paso inicial, para reducir la excesiva biodegradabilidad de los hidrocarburos (Kukor et al, 2002; Nam et al., 2001).

Otra técnica para incrementar el tratamiento biológico *in situ* de suelos contaminados, comprende la utilización de un peróxido de metal, fundamentalmente peróxido de magnesio, el cual es preparado en combinación con una fuente de fosfato (fosfatos diácidos de metales alcalinos, hidrógeno fosfato de metales alcalinos, fosfato de amonio, fosfato diamónico, o mezclas de éstos). La intercalación con el peróxido de esta fuente de fosfato, extiende el período de la liberación del oxígeno hasta aproximadamente 30 días, debido al efecto que ejerce la estructura molecular del fosfato. De esta manera, se hace más lento el proceso de liberación del oxígeno del peróxido, y se incrementa el potencial redox del suelo durante toda la duración del tratamiento. Las concentraciones empleadas de peróxido de magnesio hacen que este no ejerza un efecto tóxico, además de que la adsorción de trazas de magnesio es esencial para la bioquímica celular (Koenigsberg et al, 1993). Otros de los agentes oxidantes empleados es el ozono (O_3), el cual ha sido aplicado mediante su inyección en el subsuelo para remediar compuestos orgánicos en zonas de aguas subterráneas. El ozono es un agente oxidante extremadamente fuerte, no es dañino al medio y puede oxidar compuestos como benceno y los HAPs. Su descomposición es afectada significativamente por el pH, su concentración y la presencia de radicales libres (por ejemplo, el HCO_3^-). La presencia de sustancias inorgánicas (por ejemplo, OH^- , Fe^{2+}) y compuestos orgánicos (por ejemplo, sustancias húmicas) pueden iniciar y promover la descomposición del ozono mediante reacciones en cadena de tipo radical (Siegrist et al., 2000). La descomposición del ozono en agua se produce mediante un proceso que es limitado por la reacción inicial del ozono con los iones hidroxilo para obtener radicales hidroperóxidos e iones superóxidos:



Los contaminantes oxidables por el ozono incluyen HAPs, pesticidas e hidrocarburos alifáticos (incluyendo moléculas alifáticas saturadas). La reacción de descomposición simplificada del ozono con el TCE se muestra a continuación:



Debido a la elevada reactividad e inestabilidad del ozono, éste es producido *on site* mediante generadores eléctricos. La descomposición del ozono genera una oxigenación que beneficia significativamente la biorremediación. La aplicación de esta tecnología en un sitio contaminado depende de las condiciones presentes en dicha zona. Se han desarrollado sistemas de oxidación química *in situ* donde se inyecta ozono intermitentemente junto con aire comprimido mediante conductos verticales en aguas subterráneas contaminadas (Siegrist et al., 2000).

Las cantidades de ozono requeridas para la remediación de sitios contaminados con HAPs, varía en un amplio rango en dependencia de las características de dicho sitio, y el nivel de contaminación. Se ha reportado que al menos dos horas de exposición directa al ozono son requeridas para remediar algunos sitios contaminados con estos compuestos (Siegrist et al., 2000). Con estas tecnologías se han logrado remediar suelos contaminados, lodos, playas, lagunas y otros sistemas acuíferos incluyendo lagos.

Se han desarrollado diferentes tecnologías entre las cuales se puede citar el empleo de cámaras de mezclado agitadas donde el ozono es inyectado. El tamaño de partícula de los suelos tratados debe ser pequeño (1,27 cm) para incrementar la accesibilidad del ozono hacia los hidrocarburos contaminantes, así como asegurar una vigorosa agitación y mezclado (Bradley, J., P., 2002).

En estos sistemas se utilizan opcionalmente un tratamiento de oxidación primaria con oxidantes como el peróxido de hidrógeno, permanganato, persulfato, etc., junto a la utilización de surfactantes y catalizadores metálicos para facilitar estas reacciones de oxidación. Entre estos catalizadores podemos citar metales, óxidos metálicos, aleaciones metálicas, que pueden alcanzar una transición a un estado de oxidación superior como el hierro, níquel, manganeso, cobalto, cobre, etc. De la reacción del peróxido de hidrógeno con estos materiales contaminados se libera dióxido de carbono y otros gases como consecuencia de la oxidación de los compuestos orgánicos menos estables. Este tratamiento inicial facilita la transferencia de estos contaminantes a la fase acuosa donde ellos son directamente accesibles al ozono, además de oxidar los compuestos más fácilmente oxidables, lo que disminuye la cantidad de ozono a inyectar y el tiempo de tratamiento. La adición de bases se recomienda si la mezcla tiene carácter ácido, pues el tratamiento con ozono es más efectivo en condiciones ligeramente básicas. La aplicación de calor y/o presión adicional puede realizarse para acelerar la reacción (Bradley, J., P., 2002).

Como se ha explicado anteriormente, se puede lograr un significativo incremento en la biorremediación de los residuos oleosos, empleando la oxidación química combinada con la degradación biológica, mediante la transformación parcial de estos contaminantes a través de los procesos de oxidación, en productos de más fácil degradación. Utilizando la reacción de Fenton combinada con el biotratamiento, la biodegradación es de 2 a 4 veces superior a la lograda con la aplicación individual de estas técnicas. Se ha reportado en el tratamiento químico – biológico de suelos contaminados en reactores de fase fluidizada, que el pretratamiento de Fenton durante 48 horas en presencia de un surfactante no iónico, seguido posteriormente por 7 días de tratamiento biológico, trae como resultado la destrucción del 80 – 85% de los HAPs. De esto puede concluirse, que la reacción de Fenton incrementa considerablemente la efectividad del tratamiento biológico para los hidrocarburos de elevado peso molecular como los HAPs, y las eficiencias que se han obtenido demuestran que los productos de la reacción de Fenton no son tóxicos para el cultivo microbiano (Nadarajah et al, 2002). Estos tratamientos de oxidación se llevan a cabo, fundamentalmente, en reactores de fase fluidizada, donde es posible la introducción de inóculos y nutrientes para iniciar la etapa de biodegradación aerobia o anaeróbica, según sea el caso, después de realizada la oxidación previa de estos compuestos. Se utilizan comúnmente surfactantes químicos para incrementar la transferencia de los hidrocarburos desde la fase sólida a la fase líquida e incrementar la efectividad de la acción de los agentes oxidantes. La combinación de la aplicación de surfactantes y agentes oxidantes, puede conducir al establecimiento de un proceso tecnológico muy efectivo para el tratamiento de estos residuales.

Con la oxidación química de los residuales sólidos petrolizados, se puede lograr una destrucción rápida y total de éstos, pero la utilización de reactores y generadores de ozono hace esta tecnología muy costosa. Es por esto que una variante muy utilizada es la combinación de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno el cual se incorpora a los tratamientos de biorremediación *in situ*, para incrementar el potencial redox del medio microbiano, y facilitar la biotransformación de los hidrocarburos.

Bioaumentación.

La bioaumentación es la aplicación de microorganismos a los sitios contaminados, o en los bioreactores donde son tratados estos desechos, para acelerar la descomposición de los contaminantes. A pesar de los avances que se han obtenido en la utilización de la bioaumentación en el tratamiento en pequeña escala de lodos activados, y en los bioreactores para el tratamiento de aguas residuales, esta técnica no ha sido ampliamente aplicada. Esto se debe a que la bioaumentación es menos predecible y controlable que la destrucción química o biológica de los contaminantes (Limbergen et al, 1998).

En la bioaumentación se han utilizado grupos de bacterias que son aisladas de los sitios contaminados, pero también se pueden emplear microorganismos que son modificados genéticamente, y que tienen la capacidad de degradar diferentes compuestos químicos. Existen muchas investigaciones sobre la adición de especies de bacterias a los lodos activados, las cuales actúan como donantes de plásmidos catabólicos a las especies autóctonas. La transferencia de estos plásmidos a las bacterias indígenas, juega un rol importante en la adaptación de estos microorganismos a la presencia de compuestos recalcitrantes, y como consecuencia, incrementa la acción biodegradadora de estos microorganismos (Limbergen et al, 1998; Watanabe, 2001). La adaptación de las bacterias a los compuestos xenobióticos cuando le son transferidos estos plásmidos por los microorganismos inoculados, se debe a que éstas adquieren nuevas características genéticas. Esta transferencia puede ocurrir entre diferentes especies, como gram-positivas y gram-negativas, e incluso entre bacterias, levaduras y plantas. La mayor limitación de la transferencia de genes en el medio ambiente, puede deberse a la baja probabilidad de que células de diferentes especies de bacterias, se encuentren bajo

condiciones que las hacen fisiológicamente competentes para donar o recibir material genético (Limbergen et al, 1998).

Los aspectos principales que determinan la eficiencia, la eficacia y el costo de la bioaumentación, son la naturaleza de los xenobióticos, las condiciones fisicoquímicas, y el potencial metabólico de la microbiota. El proceso de mineralización de los contaminantes está precedido por un período de aclimatación, que es el tiempo que transcurre entre la inoculación y el inicio de la degradación de estos compuestos, donde las bacterias inducen las enzimas y se producen mutaciones o cambios genéticos (Limbergen et al, 1998). La adaptación de las bacterias inoculadas es el prerequisite indispensable para obtener una actividad degradativa óptima, y en esto puede influenciar el tamaño del inóculo y el tiempo necesitado por estas especies para su crecimiento. Se han incrementado las posibilidades de sobrevivencia de estos microorganismos adicionados al suelo, con una etapa de preadaptación en un medio mínimo en condiciones similares a las presentes en el suelo, en cuanto a concentración y tipo de contaminantes, de tal manera que esto pudiera evitar los problemas causados por el impacto que se produce al ser cambiado bruscamente el medio en que viven estos microorganismos (Limbergen et al, 1998).

La degradación de los contaminantes por diferentes especies de la comunidad microbiana, también puede ocasionar efectos negativos pues se pueden formar productos intermedios que son tóxicos, por lo que es necesario el conocimiento de la vía metabólica de los organismos inoculados (Limbergen et al, 1998). Se ha reportado la utilización de la técnica de bioaumentación en biorreactores de lecho fluidizado, para mejorar la degradación de los poliaromáticos presentes en los sedimentos que se han extraído del fondo de los puertos como el de Nueva York. La aplicación de microorganismos degradadores de HAP (*Paenibacillus validus* PR-P1, *Arthrobacter* sp. PR-P3 y *Sphingomonas* sp. PR-P12), no incrementó la biodegradación al ser adicionados con un contenido microbiano de 10^6 y 10^8 células/mL (Lauren et al, 2002).

El potencial de degradación de los hongos lignodegradadores hacia los compuestos recalcitrantes, tales como los fenoles clorinados, pesticidas, bifenilos clorinados (BPCs) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), ha sido objeto de intenso estudio. La habilidad de estos microorganismos para degradar una gran variedad de compuestos se atribuye, en parte, a la acción de las *enzimas lignolíticas*. Sin embargo, se ha reportado que con la bioaumentación empleando este microorganismo en suelos contaminados por derrames de petróleo, no se ha obtenido un efecto significativo en el incremento de la eficiencia de la biorremediación, lo cual es debido a que la competencia por los nutrientes entre las bacterias del suelo y este hongo, ejerce un papel inhibitorio hacia este organismo (Baheri et al, 2002).

La utilización como inóculo de los microorganismos autóctonos del suelo contaminado, tiene la ventaja de que estos ya están adaptados a los contaminantes que van a ser degradados. Estas especies son cultivadas en un medio de crecimiento donde se utilizan como sustrato los propios hidrocarburos presentes en el suelo, que son extraídos utilizando un solvente apropiado. Sin embargo, según se ha reportado en algunos casos, no se han logrado incrementos notables en la velocidad del proceso en tratamientos *ex situ* en reactores de fase fluidizada, lo cual se atribuye a que puede haber existido una insuficiente adaptación de estas especies a las condiciones del reactor (Saporano et al, 2002).

Se conoce un método analítico novedoso para cuantificar los microorganismos durante el proceso de bioaumentación de forma rápida y no destructiva, mediante la utilización del gen *lux* derivado de la *Vibrio* sp, cuya bioluminiscencia ocurre instantáneamente y depende de la concentración celular y de la actividad metabólica. De esta manera, el gen *lux* ha sido aplicado en la determinación de microorganismos y contaminantes específicos, mediante su incorporación en los microorganismos inoculados. Con este procedimiento los degradadores de xenobióticos con este gen incorporado, son adicionados al suelo contaminado para el estudio de la bioaumentación, y el comportamiento de los microorganismos es evaluado mediante la detección bioluminiscente (Tanaka et al, 2002).

Se conoce la preparación de inóculos de hongos para la bioaumentación de suelos contaminados, los cuales son combinados con grandes cantidades de sustratos orgánicos o desechos de la agricultura, pero esta técnica es muy trabajosa y la calidad del inóculo obtenido es muy variable. Mejores resultados mostró la fabricación de estos inóculos de hongos en forma de pastillas, en las cuales están incluidas el portador, los nutrientes, y el hongo que se encuentra formando una capa cubriendo esta estructura. Como sustrato utilizado en estas pastillas podemos citar el aserrín de álamo, el almidón, granos de harina y lignosulfato de calcio.

Posteriormente, la pastilla conformada por estos constituyentes, es cubierta por un hidrogel de alginato de sodio el cual contiene la biomasa del hongo. El crecimiento de estos microorganismos y la actividad degradadora que éstos presentan, puede ser predeterminada en cada inóculo. Esta estructura en forma de pastillas donde está incorporado el hongo, proporciona suficiente fuerza mecánica, la cual es indispensable en la aplicación a los

suelos donde el daño a los cultivos de hongos puede ocurrir como consecuencia de los procesos de destrucción y remoción del suelo, lo cual puede disminuir el potencial del inóculo (Lestan et al, 1996).

La efectividad de la bioaumentación depende de la sobrevivencia y actividad de los microorganismos en el suelo. Los hongos introducidos con esta técnica, presentan una gran resistencia al ataque de las bacterias y hongos autóctonos del suelo. La presencia de una capa de hongos que se encuentra cubriendo la pastilla, limita el acceso a los nutrientes, presentes en el interior de la pastilla, a los microorganismos autóctonos, y de esta forma, mediante esta ventaja competitiva se garantiza el crecimiento y sobrevivencia de los hongos inoculados (Lestan et al, 1996).

Si comparamos los resultados que se han obtenido en el empleo de la bioaumentación, con los efectos logrados en el incremento de la biodegradación de los hidrocarburos utilizando surfactantes y procesos de oxidación, podemos decir que con la introducción de microorganismos en sistemas de biorremediación *in situ*, o en reactores de fase fluidizada, se han reportado resultados muy contradictorios, y en muchas ocasiones negativos. Los procesos cometabólicos que se generan entre las distintas especies autóctonas que se encuentran en los sitios contaminados, son difíciles de reproducir a nivel de laboratorio en las cepas que serían inoculadas, inclusive utilizando especies modificadas genéticamente. Es por esto que de todas las tecnologías anteriormente discutidas, la bioaumentación es la que menos se ha utilizado para incrementar la biorremediación de los contaminantes.

Conclusiones.

- La utilización de agua calentada con vapor de la refinería disminuye la viscosidad de los lodos petrolizados, facilitando su extracción de los tanques de almacenamiento de combustibles.
- Se logra una extracción adicional de hidrocarburos de los lodos petrolizados cuando se aplican chorros a presión con determinada relación agua / solvente (diesel), o surfactantes para emulsionar los hidrocarburos.
- La fase orgánica de los residuales líquidos extraídos se recupera mediante sedimentación y reintroducción en el proceso de refinación.
- La eficiencia de la biorremediación de los residuales sólidos se incrementa si se emplean tecnologías como la utilización de surfactantes químicos o biológicos, y la utilización de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno.
- El empleo del ozono como agente oxidante es muy efectivo para el tratamiento de residuales, pero su aplicación práctica requiere el empleo de reactores fluidizados y generadores de ozono, haciendo costosa su ejecución.
- La bioaugmentación es una tecnología con la que no siempre se logran buenos resultados, por lo que no se propone su utilización.

Bibliografía.

1. Angelova, B.; Schmauder, H-P. Review article: Lipophilic compounds in biotechnology – interactions with cells and technological problems. *Journal of Biotechnology* 67, 13 – 32, (1999).
2. Arino, S.; Marchal, R.; Vandecasteele, J. – P. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol Biotechnol.* 45, 162 – 168 (1996).
3. Arino, S.; Marchal, R.; Vandecasteele, J.-P. Involvement of a rhamnolipid – producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacterial community. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 769 – 776 (1998).
4. Baheri, H.; Meysami, P. Feasibility of fungal bioaugmentation in composting a flare pit soil. *Journal of Hazardous Materials*, 89, 279-286 (2002).
5. Bardi, L; Mattei, A; Stefan, S; Marzona, M. Hydrocarbon degradation by soil microbial population with β – cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. *Enzyme and Microbial Technology.* 27, 709 – 713 (2000).
6. Berti, D; Randazzo, D; Briganti, F; Baglioni, P; Scozzafava, A; Gennaro, P; Galli, E; Bestetti, G. Direct micellar systems as a tool to improve the efficiency of aromatic substrate conversion for fine chemicals production. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 79, 103 – 108 (2000).
7. Berti, D; Randazzo, D; Briganti, F; Baglioni, P; Scozzafava, A; Gennaro, P; Galli, E; Bestetti, G. Nonionic Micelles Promote Whole Cell Bioconversion Of Aromatic Substrates in an Aqueous Environment. *Langmuir.* 78, 6015 – 6020 (2002).
8. Bouwer, J., E.; Zehnder, J., B. Bioremediation of organic compounds – putting microbial metabolism to work. *Bioremediation*, 11, 320 – 367 (1993).
9. Bradley, J., P. Oxidation of Aromatic Hydrocarbon. United States Patent. 20020030022. (2002).
10. Breu. Pyrolytic conversion system. United States Patent. 5,453,164. (1995).
11. Briganti, F; Randazzo, D; Scozzafava, A; Berti, D; Baglioni, P;; Gennaro, P; Galli, E; Bestetti, G. Characterization of the biological conversion of naphthalene to (+) – cis – (1R, 2S) – dihydronaphthalene in direct micellar systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 7, 263 – 272 (1999).
12. Brown, D., G.; Guha, S.; Jaffé, P., R. Surfactant Enhanced Biodegradation of PAH in Soil Slurry Reactors. *Bioremediation Journal.* 3, 269-283 (1999).
13. Carey. Soil Remediation Compositions and Method. United States Patent. 6,262,002 (2001).
14. Cassidy, D., P.; Hudak, A., J. Microorganism selection and performance in bio-slurry reactors treating PAH- contaminated soil. *Environmental Technology.* 23, 1033 - 1042 (2002).
15. Clements et al. Recovering oil from emulsion by stirring, heating and setting. United States Patent. 4,123,357 (1978).
16. Cooper y col. In situ water and soil remediation method and system. United States Patent 5,967,230 (1999).

17. Davis. Apparatus and method of reclaiming and cleaning oil from bottom settings of tanks. United States Patent. (1979).
18. Déziel, E; Paquette, G.; Villemur, R.; Lépine, F.; Bisailon, J-G. Biosurfactant Production by Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 1908-1912 (1996).
19. Falatko, M, D; Novak, J, T. Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Water Environmental Research*. 64, 163 – 169 (1992).
20. Forster. Composition and process for recovering and upgrading petroleum products. United States Patent. 4,474,622 (1984).
21. Franco et al. Process for the termo-chemical cleaning of storage tank. United States Patent. 5, 580,391 (1996).
22. Gates – Anderson, Siegrist, R., L.; Cline, S., R. Comparison of Potassium Permanganate and Hydrogen Peroxide as Chemical Oxidants for Organically Contaminated Soils. *Journal of Environmental Engineering*, 127 (2001).
23. Gruiz, K.; Kriston, E. *In Situ* Bioremediation of Hydrocarbon in Soil. *Journal of Soil Contamination*, 4, 163 – 173 (1995).
24. Gutnick et al. clearing oil – contaminated vessels with alpha – emulsans. United States Patent. 4, 276,094 (1981).
25. Hannay. Method for abandoning an underground storage tank United States Patent. (1993).
26. Jahnke et al. Surfactant- Assisted Soil Remediation. United States Patent. 6,090,896 (2000).
27. Johnson, jr. et al. Process for recovery of tank bottom wastes. United States Patent. 5,259,945 (1993).
28. Kanaebel, D., B.; Federle, T., W.; McAVOY, D., C.; Vestal, R. Effect of Mineral and Organic soil Constituents on Microbial Mineralization of Organic Compounds in Natural Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 4500 – 4508 (1994).
29. Kim, I., S.; Park, J., S.; Kim, K., W. Enhanced Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Nonionic Surfactants in Soil Slurry. *Applied Geochemistry* 16, 1419 – 1428 (2001).
30. Knaebel, D., B.; Federle, T., W.; McAvoy, D., C.; Vestal, R. Effect of mineral and Organic Soil Constituents on Microbial Mineralization of Organic Compounds in Natural Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4500 – 4508 (1994).
31. Koenigsberg, et al. Use of metallic peroxides in bioremediation. United States Patent 5, 264,018 (1993).
32. Krajicek et al. Method for dispersing sediment contained in storage tank. United States Patent. (1992).
33. Kukor, J, J y col. Remediation of contaminants including low bioavailability hydrocarbons. United States Patent 20020034421 (2002).
34. Lauren, L., A.; Buggs, V., H.; Eastep, M., E.; Enríquez, R., C.; Leonard, J., W.; Blaylock, M., J.; Huang, J-W.; Häggblom, M., M. *Bioremediation Journal*, 6, 125-141 (2002).
35. Lestan, D; Lamar, R, T. Development of Fungal Inocula for Bioaugmentation of Contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2045 – 2052 (1996).
36. Li, J.-L.; Chen, B.-H. Solubilization of Model Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Nonionic Surfactants. *Chemical Engineering Science*, 57, 2825-2835 (2002).
37. Limbergen, H., V.; Top, E., M.; Verstraete, W. Bioaugmentation in activated sludge: current features and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50, 16 – 23 (1998).
38. Liu, Zhongbao; Jacobson, A., M; Luthy, R., L. Biodegradation of Naphthalene in Aqueous Nonionic Surfactant Systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 145 – 151 (1995).
39. Manresa, M., A.; Bastida, B.; Mercadé, M., E.; Robert, M.; Andrés, C.; Espuny, M., J. Guinea, J. Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas Aeruginosa* 44T1. *Journal of Industrial Microbiology*. 8, 133 – 136 (1991).
40. Miyasaki, M., T. Method and apparatus for recovering the fuel value of crude oil sludge. United States Patent. PCT/US96/17361 (1996).
41. Moran. Apparatus and method for removal of sludge from tanks. United States Patent. 4, 828,625 (1989).

42. Nadarajah, N; Van Hamme, J; Pannu, J; Singh, A; Ward, O. Enhanced transformation of polycyclic aromatic hydrocarbon using a combined Fenton's reagent, microbial treatment and surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59: 540-544 (2002).
43. Nam, K; Rodriguez, W; Kukor, J, J. Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by biodegradation combined with a modified Fenton reaction. *Chemosphere*, 45, 11 – 20 (2001).
44. Noordman, W, H.; Wachter, J, H, J; Borer, G., J.; Janssen, D, B. The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. *Journal of Biotechnology*. 94, 195 – 212 (2002).
45. Powel, J. E. Jr. System and process for in tank treatment of crude oil sludges. United States Patent. PCT/US98/13448 (1998).
46. Randazzo, D; Berti, D; Briganti, F; Baglioni, P; Scozzafava, A; Gennaro, P; Galli, E; Bestetti, G. Efficient Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Dihydroxylation in Direct Micellar Systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 74, 240 – 248 (2001).
47. Reineke, W. Biodegradation and Persistence. *Handbook of Environmental Chemistry*. 2, 1-161 (2001).
48. Reineke, W. Development of hybrid strains for the mineralization of chloroaromatics by patchwork assembly. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 287 – 331 (1998).
49. Rocha, C.; Infante, C. Enhanced oily sludge biodegradation by tensio - active agent isolated from *Pseudomonas aeruginosa* USB – CS1. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47, 615 – 619 (1997).
50. Ron, E. Z.; Rosemberg, E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 249-252 (2002).
51. Saporano, S.; Bonomo, L.; Petruzzelli, G.; Romele, L; Barbarafieri, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) slurry phase Bioremediation of a manufacturing gas plant (MGP) site aged soil. *Water, air, and soil pollution*, 135, 219 – 236 (2002).
52. Scalliet. Process of breaking a sludge emulsion with a ball mill followed by separation. United States Patent. 6,056,882 (2000).
53. Siegrist, R., L.; Urinowicz, M., A.; West, O., R.; Crimi, M., L.; Lowe, K., S. Principles and Practices of In Situ Chemical Oxidation Using Permanganate. In *In Situ Chemical Oxidation for Site Remediation*. Chapter 1, 1 – 34 (2000).
54. Soni y col. Secuencial biological / chemical / biological treatment of organic waste. United States Patent. 5,955,350 (1999).
55. Tanaka, T; Xing, X-H, Matsumoto, K; Unnoc, H. Preparation and characteristic of resting cells of bioluminescent *Pseudomonas putida* BLU. *Biochemical Engineering Journal*, 12, 29-36 (2002).
56. Tiehm, A. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the presence of Synthetic Surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 258-263 (1994).
57. Varadaraj y col. Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soil and Water. United States Patent. 5, 300,227 (1994).
58. Varadaraj y col. Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soil. United States Patent. 5, 436,160 (1995).
59. Varadaraj y col. Surfactant-Nutrients for Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soil and Water. United States Patent. 5,514,588 (1996).
60. Varadaraj y col. Urea-Surfactant Chatharates and their Use in Bioremediation of Hydrocarbon Contaminated Soil and Water. United States Patent. 5, 705,69 (1998).
61. Wartel, M. Method for cleaning an oil storage tank and device for implementing. United States Patent. PCT/FR97/02347 (1997).
62. Watanabe, K. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 237–241(2001).
63. Deal et al. Method for cleaning chemical sludge deposits of oil storage tanks. United States Patent. 4, 770,711. 1988.

Dr. Miguel A. Díaz Díaz,
Centro de Investigaciones del Petróleo.
Washington # 169 esquina Churruca, Cerro. Ciudad de la Habana, Cuba.
alfonso@ceinpet.cupet.cu