

---

## TÉCNICAS DE BIORRECUPERACIÓN IN SITU EN ACUÍFEROS CONTAMINADOS POR METALES PESADOS

LÓPEZ GUTIÉRREZ, Julio ;GARCÍA MENENDEZ, Olga; GRIMA OLMEDO, Juan;  
BALLESTEROS NAVARRO, Bruno José y PÉREZ GAGO, Manuela

Instituto Geológico y Minero de España. Oficina de Proyectos de Valencia

### RESUMEN

El fundamento básico de la biorrecuperación de acuíferos y suelos consiste en la inmovilización, degradación o transformación de sustancias contaminantes mediante la actividad de microorganismos, obteniéndose productos no tóxicos o al menos con menor toxicidad. Los procesos de biorrecuperación se producen de forma natural principalmente en la zona vadosa del acuífero, y en menor medida en la zona saturada, gracias a la actividad de la fauna microbiana nativa. Mediante la aplicación de las técnicas de biorrecuperación, se induce y/o aceleran los procesos naturales. Estas técnicas se llevan aplicando desde hace más de una década con éxito, in situ, para la recuperación de acuíferos contaminados con sustancias orgánicas biodegradables, principalmente hidrocarburos. Sin embargo recientes ensayos de laboratorio y pruebas ex situ han demostrado la capacidad de los microorganismos para interactuar con metales, produciendo en ellos transformaciones químicas que modifican las condiciones de solubilidad de las especies químicas afectadas, facilitando así su extracción del medio o su inmovilización. Estos resultados marcan el comienzo de un nuevo camino de investigación cuyo resultado final sería la aplicación in situ de técnicas de biorrecuperación en acuíferos contaminados por metales pesados.

**PALABRAS CLAVE:** técnicas de biorrecuperación, contaminación de acuíferos, metales pesados, técnicas in situ.

### ABSTRACT

The basis of aquifers and soils bioremediation is the immobilisation, degradation or transformation of toxic substances through the activity of microbes, getting no-toxic or at least less toxic chemical species as final products. Bioremediation processes occur in nature, basically in the vadose zone and in a lesser degree in the saturated zone of aquifers,

thanks to native microbial fauna. Application of bioremediation technologies involves the stimulation of the natural processes. These technologies have been applied in situ since last decade but focused on organic biodegradable substances like hydrocarbons. However recent lab tests as well as ex situ trials have demonstrated the capability of microbes to interact with heavy metals generating chemical transformations on them that produce solubility changes of the implied substances. Those solubility changes facilitate the metal immobilisation or mobilisation in the aquifer. These incipient positive results may mark the starting point of investigation paths in order to develop applicable in situ bioremediation technologies on heavy metals.

## 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos y las aguas subterráneas por metales es uno de los principales problemas medioambientales en los países industrializados y en vías de desarrollo. Según estudios realizados por el Departamento de Energía de Estados Unidos (Riley et al, 1992), para una población de 18 plantas generadoras de energía e industriales y 91 vertederos de los residuos generados en ellas, en más del 50% de las plantas generadoras de energía y en el 35% de los vertederos aparece contaminación de suelos por metales y radionucleidos. Asimismo, en el 60% de las plantas y el 50% de los vertederos se detectó contaminación de las aguas subterráneas por estos mismos elementos (Figura 1).

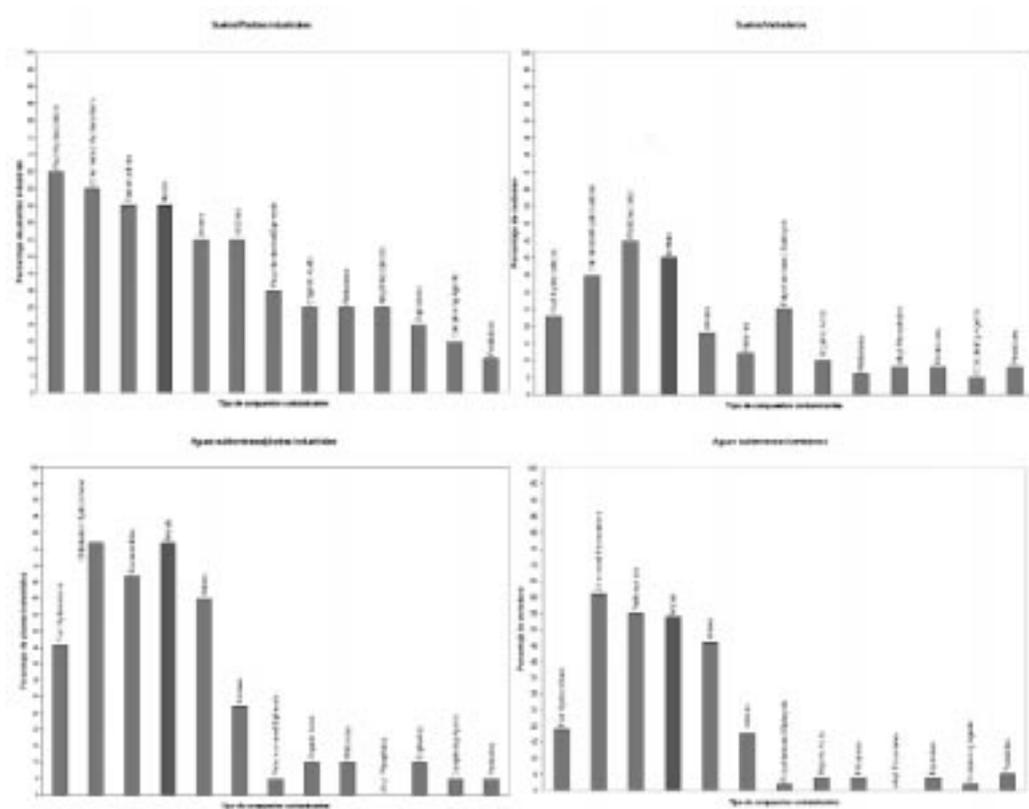
Existen diversas técnicas tradicionales de recuperación de acuíferos contaminados, tanto ex situ como in situ, entre las que se encuentra el bombeo del agua contaminada y posterior tratamiento en superficie, inyección de soluciones acuosas con reactivos, inyección de aire con el fin de eliminar las sustancias volatilizables, uso de especies vegetales que utilizan contaminantes como nutrientes, y aprovechamiento del metabolismo de microorganismos para la transformación y degradación de contaminantes. Este último método se denomina biorrecuperación. (Hazen, 1997).

En el caso concreto de contaminación por metales pesados, las técnicas más utilizadas han sido el bombeo y posterior tratamiento del agua contaminada, el lavado del acuífero mediante soluciones con reactivos específicos, y en menor medida las técnicas electrocinéticas y la fitorecuperación. En el caso del bombeo y posterior tratamiento del agua contaminada, existen problemas de inducción de flujos impredecibles en medios anisótropos que pueden llevar a una pérdida del control de la pluma contaminada, así como la imposibilidad de eliminar los metales adsorbidos por los minerales de las arcillas y la materia orgánica, entre otros (McCullough et al, 1999). El lavado mediante soluciones con reactivos suele ser altamente agresivo con el acuífero, produciéndose transformaciones en el quimismo y en la estructura básica del mismo, existiendo el problema adicional de reactivos exclusivos para una única sustancia y la creación de compuestos residuales que en algunos casos pueden llegar a ser más tóxicos o persistentes que los propios contaminantes (Van Cauwenberghe, 1997a). Las técnicas de fitorremediación presentan el problema de la escasa profundidad de su aplicación, limitada por la profundidad de las

raíces, así como la lentitud de aplicación, limitada por los ciclos de crecimiento de las plantas (Miller, 1996). Las técnicas electrocinéticas han demostrado ser bastante efectivas in situ, aunque existen problemas de aplicación en zonas urbanas donde existen conductores o aislantes en el subsuelo, así como la precipitación prematura de metales en la proximidad del cátodo (Van Cauwenberghe, 1997b).

Las técnicas de biorrecuperación de acuíferos pueden ser una alternativa a las técnicas clásicas, anteriormente citadas. Entre sus principales ventajas figuran (Van Cauwenbergher y Roote, 1998):

- Baja agresividad con el medio, ya que básicamente consisten en el estímulo de los procesos naturales que tienen lugar en el acuífero, mediante la creación de un ambiente propicio para el crecimiento y desarrollo de la fauna nativa.
- El área de aplicación es superior al de otras técnicas, ya que el propio tratamiento se desplaza con la pluma contaminante.



**Figura 1.** Distribución de tipos de compuestos contaminantes en suelos y aguas subterráneas de una población de 18 plantas industriales y vertederos industriales en los Estados Unidos. Modificado de Riley et al. (1992).

- Inmoviliza o destruye los contaminantes sin que se produzca transferencia a otro medio. Se evita así el vertido de los productos resultantes.

No obstante su aplicación in situ para acuíferos contaminados por metales pesados presenta limitaciones debidas principalmente a la toxicidad de estos elementos para la mayoría de los microorganismos y la escasa biodegradabilidad de los mismos. Por estos motivos las técnicas de biorrecuperación in situ se han desarrollado principalmente en el campo de la contaminación por sustancias orgánicas complejas, como hidrocarburos, barnices, compuestos orgánicos volátiles, pesticidas, disolventes orgánicos y nitrotoluenos procedentes de explosivos.

## 2. CARACTERÍSTICAS Y COMPORTAMIENTO DE LOS METALES PESADOS

Los metales pesados son elementos con elevados pesos atómicos, superiores a 44,956 y una densidad superior a 5 gr/cm<sup>3</sup>, excluyendo a los grupos Alcalino y Alcalinotérreo. Aunque algunos son imprescindibles para el desarrollo de las funciones vitales de los organismos, los denominados esenciales como cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc, vanadio y estroncio, en cantidades excesivas son perjudiciales e incluso letales para los seres vivos. Los metales pesados no esenciales comúnmente implicados en problemas de contaminación de las aguas subterráneas son: cromo, cadmio, mercurio, plomo, arsénico y antimonio (Kennish, 1992).

En las aguas superficiales, los metales pesados existen en forma de coloides, partículas, y como fases disueltas, aunque debido a su baja solubilidad estas últimas suelen presentar concentraciones muy bajas en forma iónica o complejos organometálicos. En las formas coloidales y partículas aparecen como hidróxidos, óxidos, silicatos, sulfuros, o adsorbidos en minerales del grupo de las arcillas, sílice y materia orgánica. La solubilidad de los metales pesados en las aguas superficiales está controlada por el pH, el tipo de ligantes en los que se encuentran adsorbidos, el estado de oxidación de las fases minerales y el ambiente redox del sistema (Connell et al, 1984).

En las aguas subterráneas, el comportamiento de los metales pesados es función de la composición del acuífero, la composición de la materia en suspensión y la composición química del agua. De este modo los acuíferos con mayores niveles de metales adsorbidos serán aquellos constituidos por arenas finas y limos. Asimismo los metales pesados tienen una gran afinidad por los ácidos húmicos, arcillas orgánicas y óxidos cubiertos de materia orgánica. (McCullough et al, 1999).

La química del agua controla la tasa de adsorción/desorción de los metales hacia y desde el acuífero. La adsorción elimina el metal del agua y lo almacena en el acuífero, mientras que la desorción devuelve los metales al agua, favoreciendo su movilización. La desorción de los metales suele producirse debido a los siguientes cambios físico-químicos en el agua:

- Aumento de la salinidad. Se produce una competitividad entre los metales y los cationes por rellenar huecos.
- Disminución del potencial redox. Normalmente bajo condiciones deficitarias de oxígeno.
- Disminución del pH. Se produce un incremento de la competitividad entre los metales y los iones de hidrógeno por rellenar huecos, además de producirse una disolución de los complejo metal-carbonato, liberándose los iones del metal en el agua.

Una inversión de estas condiciones favorece la adsorción de metales por los minerales del acuífero.

### **3. PROCESOS EN BIORRECUPERACIÓN**

#### **3.1 Conceptos generales**

Las técnicas de biorrecuperación utilizan microorganismos para reducir, eliminar o inmovilizar contaminantes. Funcionan transformando o degradando los contaminantes a especies químicas no peligrosas o con menor peligro, denominándose los procesos “biotransformación” y “biodegradación” respectivamente.

La biotransformación es cualquier alteración de la estructura atómica o molecular de una especie química, por parte de microorganismos. La biodegradación consiste en la disgregación de sustancias orgánicas en moléculas menores o en componentes inorgánicos, denominándose “mineralización” a la degradación completa de un contaminante orgánico en constituyentes inorgánicos. En condiciones aerobias los productos finales son  $\text{CO}_2$ , agua y materia celular. En condiciones anaerobias el producto final de la biodegradación es  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ . Estos procesos de transformación y degradación son el resultado del uso por parte de los microorganismos de los contaminantes orgánicos como fuente de alimentación y energía.

Para un funcionamiento efectivo de los procesos de biorrecuperación se deben conjuntar varios factores óptimos de carácter faunístico, nutricional y fisico-químico. Así, los microorganismos nativos deben ser capaces de metabolizar las sustancias contaminantes existentes con los nutrientes y los aceptores de electrones (éstos últimos para proporcionar la energía necesaria a los microorganismos) disponibles en el medio.

El principal problema de los metales pesados es que no pueden ser biodegradados. Sin embargo los microorganismos pueden interactuar con ellos transformándolos. Las principales transformaciones se deben a cambios en el estado de oxidación. Esto influye de forma drástica en la movilidad del contaminante, ya que en algunos casos aumenta la solubilidad de los productos de alteración, favoreciendo así su eliminación del medio, y en otros casos disminuye, produciéndose una inmovilización del contaminante. La elección entre una u otra transformación dependerá de si se pretende eliminar la contaminación o

si se quiere evitar su llegada hasta sectores de interés, como por ejemplo pozos de abastecimiento. Además los microorganismos pueden actuar y biodegradar la materia orgánica y los compuestos orgánicos (ácidos húmicos principalmente) a los que suelen estar asociados los metales pesados en los acuíferos, modificando igualmente su movilidad.

Las reacciones responsables de los procesos de biotransformación y biodegradación están relacionadas con el metabolismo de los microorganismos existentes en el acuífero. Para que dichos microorganismos puedan crecer y desarrollar sus funciones vitales necesitan un aporte de nutrientes, básicamente carbono, nitrógeno y fósforo; así como donantes y aceptores de electrones (Van Cauwenberghe y Roote, 1998). Estos últimos son imprescindibles como fuente de energía, ya que la transferencia catalizada de electrones entre donantes y receptores libera la energía requerida para que se produzcan las reacciones bioquímicas vitales. Algunos metales pesados pueden actuar como donantes y aceptores de electrones, o dicho en otras palabras como fuentes de energía, y por ello es posible su biotransformación. Los organismos que utilizan metales como fuentes principales de energía son los denominados chemolitoautótrofos.

Las principales transformaciones de los metales pueden ser directas, por medio de cambios en el estado de valencia cuando actúan como donantes o receptores de electrones, e indirectas, por medio de agentes oxidantes y reductores producidos por los microorganismos y que son responsables de cambios en el pH y del potencial redox (McCullough et al, 1999).

La respiración microbiana es uno de los procesos metabólicos básicos, ya que a través de ella los microorganismos obtienen la energía necesaria para su desarrollo, por medio de reacciones redox catalizadas por enzimas específicas. Existen dos tipos básicos de respiración: aerobia, cuando el receptor final de electrones es  $O_2$ , y anaerobia, cuando el receptor final de electrones es un compuesto inorgánico distinto del oxígeno, como nitrato, sulfato y  $Fe^{3+}$ .

En la respiración aerobia los organismos chemolitoautótrofos utilizan  $CO_2$  como fuente de alimentación y de energía. Sin embargo también pueden utilizar compuestos inorgánicos, como metales, para obtener energía, utilizándolos como donantes de electrones y el oxígeno como aceptor de electrones. Un claro ejemplo de como afecta la respiración aerobia a la movilidad de los metales pesados, se encuentra en la oxidación del  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ . El  $Fe^{2+}$  actúa como donante de electrones y el  $O_2$  como aceptor, produciéndose precipitados de hidróxidos de hierro. Estos precipitados constituyen superficies de reacción con otros metales contaminantes, permitiendo la formación de complejos y por lo tanto la inmovilización de los contaminantes.

En la respiración anaerobia, los procesos están condicionados por el tipo de aceptor de electrones, ya que no existe oxígeno disponible para hacer dicha función. Los principales aceptores de electrones en medios anaerobios son  $CO_2$ ;  $NO_3^-$ ;  $SO_4^{2-}$ ; y  $Fe^{3+}$ . Los procesos

de reducción se denominan respectivamente metanogénesis, desnitrificación, reducción de sulfatos y reducción de hierro.

### **3.2 Procesos microbianos involucrados en la biorrecuperación de metales pesados.**

Como se indicó en el apartado anterior, la biorremediación de metales pesados sólo se puede llevar a cabo mediante la biotransformación, ya que no son compuestos biodegradables. Existen tres categorías básicas de procesos de biotransformación que pueden afectar a la movilidad y a la toxicidad de los metales pesados: bioacumulación y biosorción; reacciones redox catalizadas biológicamente que producen inmovilización; y solubilización catalizada biológicamente (McCullough et al, 1999).

- Bioacumulación y biosorción

La bioacumulación consiste en la retención de metales en el citoplasma de los microorganismos, mediante su transporte a través de la membrana celular, gracias a la acción de proteínas específicas de transporte.

La biosorción consiste en la inmovilización de iones metálicos, con carga positiva, mediante la adsorción a los grupos iónicos negativos existentes en la superficie celular, y a los polisacáridos existentes en la cubierta exterior de la mayoría de las bacterias.

- Reacciones redox catalizadas biológicamente que producen inmovilización de metales

Los microorganismos reductores de metales producen una reducción enzimática directa de las formas oxidadas de metales, utilizándolos como aceptores alternativos de electrones. Aunque el espectro de metales reducibles por estos organismos es muy amplio, se muestran especialmente efectivos con  $U^{6+}$ ,  $Cr^{6+}$  y  $Tc^{4+}$ . Estas formas oxidadas son altamente solubles, y por lo tanto móviles, en las aguas subterráneas en condiciones aerobias. Su reducción enzimática produce formas reducidas insolubles, lo que provoca su precipitación intra o extracelular.

Además de la reducción enzimática directa de metales pesados, algunos microorganismos, como las bacterias reductoras de metales y las bacterias reductoras de sulfatos, pueden llevar a cabo la reducción indirecta de especies oxidadas solubles. Esto se produce acoplando la oxidación de compuestos orgánicos a la reducción del  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{4+}$  y  $SO_4^{2-}$ . Las especies reducidas  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $H_2S$ , interactúan químicamente con los metales contaminantes solubles produciendo especies multicomponentes insolubles que precipitan.

- Solubilización catalizada biológicamente

La solubilización de metales biosorbidos y coprecipitados puede producirse por procesos microbianos tanto de forma directa como indirecta, aunque la solubilización de metales

pesados a partir de coprecipitados con las fases minerales del acuífero, requiere una solubilización parcial previa de dichas fases minerales, óxidos principalmente. La reducción directa de óxidos de hierro por bacterias reductoras de metales, favorece la solubilización de un gran rango de metales pesados que pudieran estar coprecipitados en dichos óxidos. Así, por ejemplo, durante la reducción de la goetita por la especie anaerobia *Clostridium*, se solubilizan cadmio, níquel, y zinc.

Asimismo, la creación de ácidos orgánicos durante el metabolismo de los microorganismos, es capaz de bajar el pH del sistema, hasta valores que permitan interferir con las cargas electrostáticas que mantienen unidos los metales pesados a la superficie de los óxidos e hidróxidos de hierro y ser desplazados por los iones de hidrógeno liberados al sistema.

Otro mecanismo de movilización de metales pesados es mediante la acción de metabolitos orgánicos que actúan como quelatos creándose complejos solubles quelato-metal.

#### 4. TÉCNICAS DE BIORRECUPERACIÓN IN SITU

Las técnicas de biorrecuperación consisten básicamente en el aprovechamiento de los procesos microbianos naturales que se producen en un acuífero o en el suelo, mediante los cuales los contaminantes son utilizados por los microorganismos como fuente de alimento o de energía para poder desarrollar sus actividades vitales. La aplicación de tecnología permite favorecer o amplificar la capacidad natural de los microorganismos para transformar o degradar los contaminantes, mediante la creación de un ambiente propicio para su desarrollo.

El ambiente más favorable para la mayor parte de los microorganismos, entre los que se incluyen bacterias, hongos y algas es el siguiente (McCullough et al, 1999):

- temperatura: 15-45 °C
- pH entre 5,5 y 8,5
- relación de nutrientes carbono:nitrógeno:fósforo de 120:10:1
- presencia de agentes oxidantes y/o reductores que permitan las reacciones metabólicas de los microorganismos

Además de estas condiciones, para que la biorrecuperación sea efectiva es necesario que los microorganismos sean los apropiados para el contaminante y que dichos contaminantes no sean tóxicos para los microorganismos.

Existen diversas técnicas de birrecuperación tanto ex situ como in situ. Las técnicas ex situ, han sido más aplicadas y presentan un grado de desarrollo mayor. No obstante las técnicas

in situ presentan una serie de ventajas sobre las técnicas ex situ, como un coste menor, ya que no se precisa la extracción del agua contaminada, y se evita la construcción de plantas de tratamiento, además de no generar residuos a eliminar en superficie. Como el tratamiento se produce en el propio sistema contaminado, es efectivo para contaminantes que se encuentran adsorbidos por las fases minerales del acuífero, y que no pueden ser tratados mediante bombeo.

Las principales técnicas de biorrecuperación in situ son la bioestimulación y la bioamplificación (biostimulation, bioaugmentation), las cuales se pueden aplicar individualmente o en conjunto.

- Bioestimulación. Consiste en la inyección de una mezcla de agua no contaminada y los elementos necesarios para el desarrollo microbiano, es decir, nutrientes y aceptores o donantes de electrones. Los nutrientes son, generalmente carbono, nitrógeno y fósforo en forma de  $\text{CO}_2$ , amonio y fosfatos, y el aceptor de electrones suele ser oxígeno disuelto. Los pozos de inyección se sitúan a distancias máximas de 30 metros, debiendo disponerse además de pozos de extracción aguas abajo en la dirección del flujo subterráneo, en el caso de que se persiga una movilización de los metales pesados.
- Bioamplificación. Consiste en introducir microorganismos específicos que puedan biotransformar o biodegradar contaminantes concretos. Hasta la fecha esta técnica sólo se ha aplicado con éxito en tratamientos ex situ. En la actualidad se está comenzando a investigar en la aplicación de la ingeniería genética en el campo de la biorrecuperación. Mediante la manipulación de los genes de microorganismos se pretende reforzar su capacidad metabólica, así como crear organismos especializados en contaminantes concretos. La polémica surge a la hora de introducir especies artificiales en medios naturales sin conocer su comportamiento a largo plazo.

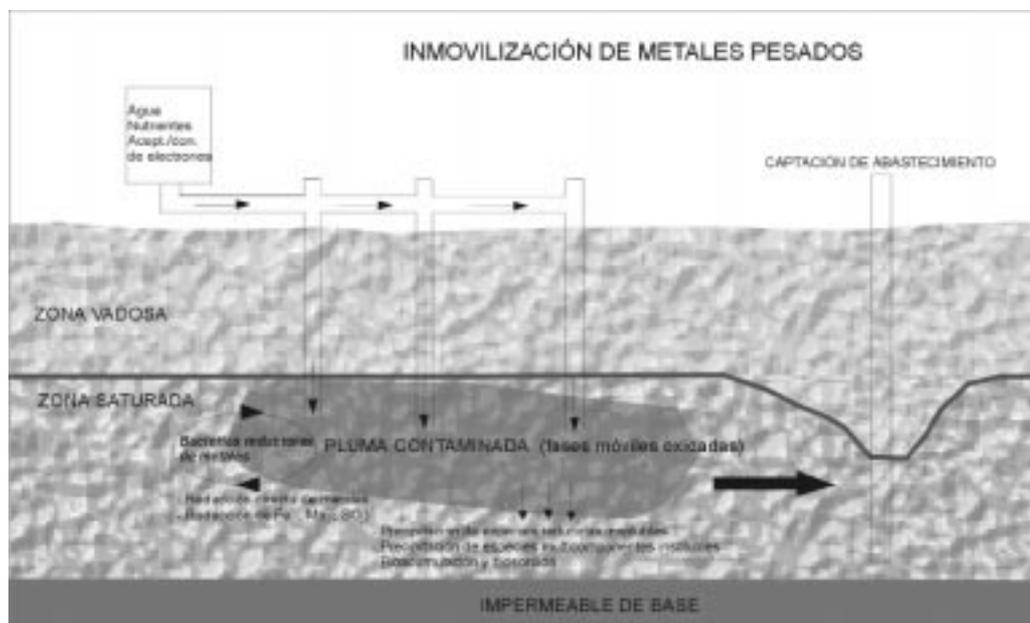


Figura 2. Esquema de inmovilización de metales pesados, con el fin de evitar su llegada a una captación de abastecimiento.

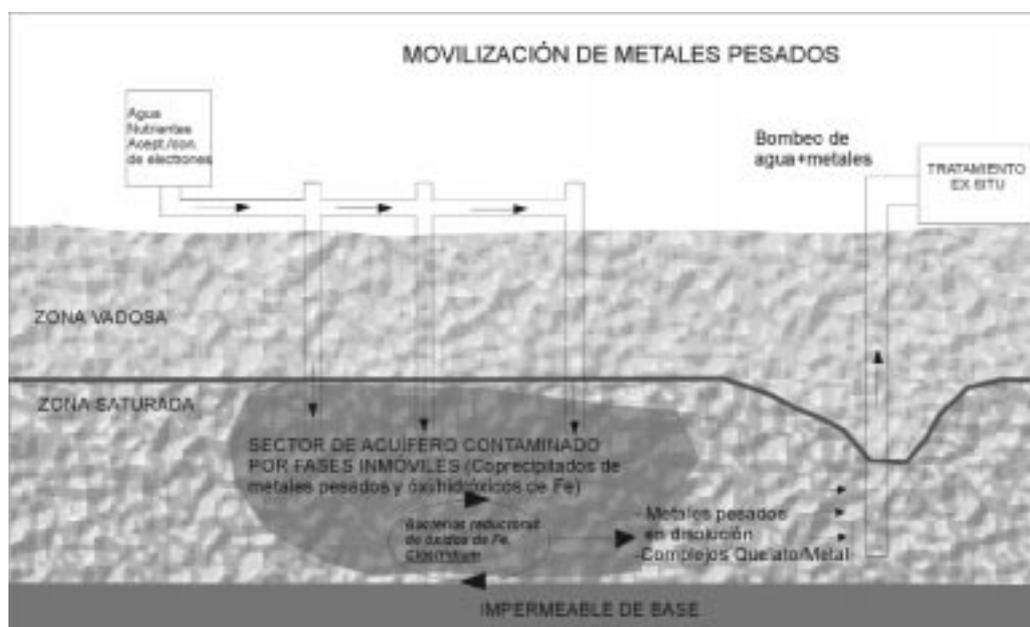


Figura 3. Esquema de estrategia de movilización de metales pesados en un acuífero contaminado por fases inmóviles, para su retirada mediante bombeo y posterior tratamiento en superficie.

## 5. CONCLUSIONES

Las técnicas de biorrecuperación de acuíferos pueden ser una alternativa consistente a las técnicas clásicas de recuperación de acuíferos contaminados por metales pesados, como lo demuestra la capacidad de numerosos microorganismos de biotransformar sustancias inorgánicas, como los metales pesados. La estrategia a seguir dependerá de la pretensión de movilizar o inmovilizar los contaminantes. No obstante, la aplicación de técnicas *in situ* para metales pesados está poco desarrollada y se necesita profundizar en el conocimiento del comportamiento de las diversas especies de metales en el subsuelo, la dinámica de sistemas, y en las reacciones metabólicas que rigen los procesos de biotransformación.

La aplicación de microorganismos especializados, inoocuos para el sistema, abre un nuevo horizonte de investigación en el campo de la ingeniería genética.

## BIBLIOGRAFÍA

- Connell, D.W., G.J. Miller. 1984. *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*. John Wiley & Sons, NY.
- Hazen, T.C., (1997). *Bioremediation in Microbiology of the terrestrial Subsurface*. P. Amy and D. Haldeman eds. pp.247-266.
- Kennish, M.J., (1992). *Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects*. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL
- McCullough, J., Hazen, T.C., Benson, S.M., Metting, F.B., and Palmisano, A.C. (1999). *Bioremediation of Metals and Radionuclides...What it is and how it works*. Office of Biological and Environmental Research of the U.S. Department of Energy's Office of Science. NABIR primer LBNL-42595. Available at: <http://www.lbl.gov/NABIR/primer>
- Miller, Ralinda R. (1996) *Technology Overview Reports. Technology Overview Reports Phytoremediation (TO-96-03)*. Available at: <http://www.gwrtac.org>
- Riley, R.G., J.M. Zachara, and F.J. Wobber, (1992). *Chemical Contaminants on DOE Lands and Selection of Contaminant Mixtures for Subsurface Research, DOE/ER-0547T*, U.S. Department of Energy, Washington, D.C.
- Ritz, S.M., (1996). *States Speak Out on Natural Attenuation*. Available at: <http://www.gvi.net/soils/JanFeb96/statespeak.htm>
- Technologies Encyclopedia (1996). *Biodegradation (In Situ)*. Available at: <http://clu.in.com/bioinsitu.htm>
- Van Cauwenberghe, Liesbet (1997a) *Technology Overview Reports In situ Flushing (TO-97-02)*. Available at: <http://www.gwrtac.org>
- Van Cauwenberghe, Liesbet (1997b) *Technology Overview Reports. Electrokinetics (TO-97-03)*. Available at: <http://www.gwrtac.org>
- Van Cauwenberghe, Liesbet, and Roote, D. S. (1998) *Technology Overview Reports In situ Bioremediation (TO-98-01)*. Available at: <http://www.gwrtac.org>