

Biorrecuperación de suelos contaminados por fenantreno mediante el empleo de micronutrientes, una cepa bacteriana degradadora y ciclodextrina

Alba Lara-Moreno^{1*}, Esmeralda Morillo¹, Jaime Villaverde¹

¹ Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC. Apartado 1052. 41080, Sevilla (España)

* lara@irnas.csic.es

Resumen

El fenantreno (PHE) es un compuesto químico que pertenece a la familia de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs en inglés). Estos compuestos generan una gran preocupación debido a su ubicuidad en el medio ambiente, su resistencia a la biodegradación, su bioacumulación y su elevada toxicidad. En este trabajo se aborda la aplicación en cinco suelos contaminados artificialmente con PHE de técnicas de biorrecuperación encaminadas a conseguir la mineralización del contaminante: i) bioaumentación, inoculando *Stenotrophomonas maltophilia* CPHE1, cepa aislada de un suelo con uso industrial mediante cultivos de enriquecimiento; ii) bioestimulación, aplicando una solución de micronutrientes con el fin de estimular a la microbiota endógena de los suelos; iii) adición de 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HPBCD), capaz de mejorar la solubilidad de PHE en agua a través de la formación de un complejo de inclusión. A partir de los resultados obtenidos se concluye que en cuatro de los suelos el bioaumentación con la cepa bacteriana resultó suficiente para alcanzar máximos de mineralización del 33.5, 59.9, 65.3 y 75% durante el tiempo de ensayo (121 días). Sin embargo, en el quinto suelo el uso de HPBCD fue lo que causó la máxima mineralización de PHE, alcanzando el 59% de mineralización al final del periodo de incubación. Ello indica la importancia de seleccionar una buena estrategia de biorrecuperación basada en cada tipo de suelo y contaminante.

Palabras clave: Suelo, fenantreno, mineralización, *Stenotrophomonas maltophilia* CPHE1, ciclodextrina.

1. Introducción

La presencia generalizada de PAHs en el medio ambiente se debe a su generación a partir de la combustión incompleta de una gran variedad de compuestos orgánicos de forma natural o principalmente de origen antropogénico (Abdel-Shafy y Mansour, 2016). Por lo tanto, los PAHs están muy presentes en la atmósfera, agua y suelos, lo que supone una preocupación debido a su elevada toxicidad. En la actualidad, se están tomando medidas para promover la recuperación de emplazamientos contaminados, especialmente el suelo, el cual es considerado una matriz sensible porque tiende a ser un reservorio donde termina aproximadamente el 90% de las emisiones de PAHs (Gupta *et al.*, 2019).

El tratamiento biológico para la recuperación de suelos contaminados, utilizando microorganismos capaces de metabolizar PAHs, es una herramienta en auge gracias a su efectividad y su carácter respetuoso con el medio ambiente (Abdel-Shafy y Mansour, 2016).

Cuando la biodegradación no se puede llevar a cabo de forma natural porque los microorganismos degradadores específicos no están presentes o no disponen de los elementos esenciales para ello en la zona contaminada, se requiere la intervención de actuaciones encaminadas a estimular la actividad microbiológica. Es interesante diseñar una buena estrategia de biorrecuperación, ya sea mediante una bioestimulación, un proceso en el que los microorganismos son estimulados para usar los contaminantes como fuente de carbono, o bioaumentación basada en introducir microorganismos que pueden ser endógenos, exógenos o genéticamente modificados, caracterizados con las capacidades catalíticas deseadas para conseguir la eliminación del contaminante (Cycoń *et al.*, 2017). Una de las características de los PAHs que los hace difíciles de ser degradados en el suelo es su naturaleza hidrofóbica, lo que limita su capacidad de interactuar con las fases acuosas reduciendo su biodisponibilidad. Teniendo en cuenta este enfoque, en este trabajo se ha empleado una ciclodextrina (CD) de origen sintético, HPBCD, con el objeto de aumentar la solubilidad en agua de PHE a través de la formación de complejos de inclusión (Morillo *et al.*, 2012) y así aumentar su biodisponibilidad.

El objetivo de esta investigación es el de recuperar cinco suelos contaminados con PHE partiendo de la monitorización de la acción de la propia microbiota (atenuación natural) o combinando técnicas de bioaumentación (inoculación con *S. maltophilia* CPHE1), bioestimulación (con solución de micronutrientes) y el uso de HPBCD.

2. Materiales y Métodos

PHE en polvo (pureza > 98%), suministrado por Sigma Aldrich (Madrid, España). **PHE** [¹⁴C] adquirido en Bio Trend (California), con una actividad específica de 52 mCi mmol⁻¹ y una pureza radioquímica del 98,4 %.

Cepa bacteriana: *Stenotrophomonas maltophilia* CPHE1 (GenBank accession number: MT138842) aislada en nuestro laboratorio, a través de un cultivo de enriquecimiento de un suelo donde se localiza una industria química clausurada, cuya principal actividad fue la destilación de compuestos orgánicos.

Suelos: Tres suelos de origen agrícola (PLD, CR, LL), un suelo procedente del Parque Natural de los ALC (ALC) y un suelo de origen urbano (R), todos ellos localizados en el sur de España (Tabla 1).

Ciclodextrina: 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPBCD) (Cyclolab, Budapest, Hungría).

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de los suelos empleados.

Suelos	pH	CO ₂ ² (%)	MO (%)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Textura
PLD	8,2	9,7	1,67	47,0	17,1	34,5	Franco arcilloso
CR	8,6	11	0,20	95,3	4,10	0,60	Arenoso
ALC	5,1	0,5	13,9	69,1	7,80	23,1	Franco arenoso
LL	7,8	4,0	0,87	79,6	9,30	11,1	Arenoso
R	7,7	4,0	3,44	77,0	9,50	13,5	Arenoso

Experimentos de mineralización: Para llevar a cabo los ensayos de mineralización se utilizaron respirómetros que constan de un cuerpo principal con matraz de vidrio de 250 mL de capacidad, en cuyo interior se añaden 10 g de suelo, el contaminante no marcado (50 mg kg⁻¹) y marcado ¹⁴C junto con 50 mL de medio mínimo salino (MSM), 1 mL de solución de micronutrientes (SNs) (Fenlon *et al.*, 2011) y el volumen de inóculo bacteriano suficiente para alcanzar una concentración de 10⁸ UFC g⁻¹ de suelo. En la parte superior del matraz se colocó un tapón con una trampa de álcali suspendida (1 mL de NaOH 0,5N) para recoger la producción de ¹⁴CO₂. La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido modelo Beckman LS5000TD.

3. Resultados y Discusión

En la Figura 1 se muestran las curvas de mineralización de PHE tras la aplicación de los diferentes tratamientos investigados sobre los cinco suelos estudiados en este trabajo. Cuando a los suelos contaminados no se les aplicó ningún tratamiento de biorrecuperación no se observó apenas mineralización de PHE.

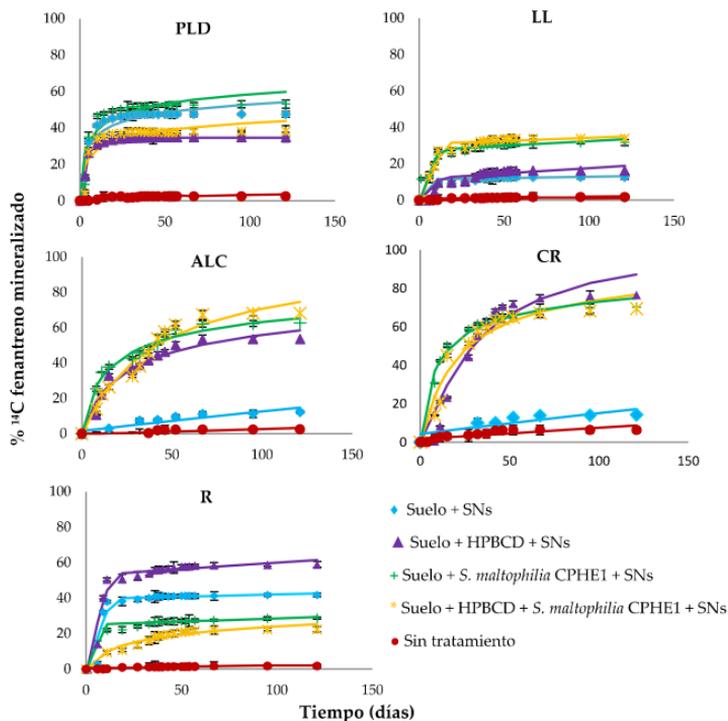


Figura 1. Mineralización de PHE en los suelos estudiados (R, LL, PLD, ALC, CR) tras la aplicación de los diferentes tratamientos estudiados.

La adición de la solución de micronutrientes (SNs) produjo sólo una ligera activación de la microbiota endógena de los suelos LL, ALC y CR, y por tanto aumentó levemente la mineralización de PHE. Pero su efecto fue mucho mayor en los suelos PLD y R, en los que se obtuvieron porcentajes de mineralización de PHE del 47,6% y 41,8%, respectivamente. La microbiota endógena de estos suelos pudo actuar como degradadora efectiva de PHE al ser estimulada porque estaría previamente adaptada a la presencia de PAHs o de compuestos con estructuras químicas similares, los cuales habrían producido una alteración de las comunidades microbianas de los mismos como resultado de la toxicidad directa de dichos compuestos, favoreciendo el desarrollo de algunos taxones microbianos capaces de usar como fuente de carbono y energía el PHE, mientras que otros microorganismos se vuelven menos prevalentes en los suelos contaminados (Parajuli *et al.*, 2017). La interacción sinérgica entre los miembros que forman la microbiota de estos suelos hace que el producto metabólico que produce un microorganismo puede ser utilizado por otro conduciendo a una degradación más eficiente

(Gupta *et al.*, 2019). La adición de HPBCD como extractante de PHE de los suelos incrementó su mineralización significativamente con respecto al tratamiento con SNs solo en los suelos ALC, CR y R, alcanzando porcentajes del 53,4%, 76,5% y 59%, respectivamente.

La inoculación con *S. maltophilia* CPHE1 en los casos de los suelos LL, PLD, ALC y CR mostró los máximos resultados cinéticos de mineralización (33,5%, 59,9%, 65,3%, 75%, respectivamente), pero en tres de ellos (LL, ALC y CR) la adición además de HPBCD no mejoró la mineralización. Incluso en el caso de PLD, cuando se aplicó HPBCD se observó un efecto negativo en la recuperación del suelo contaminado. Este descenso de la mineralización se debe a una competencia de la microbiota de este suelo por la fuente de carbono disponible presentando cierta preferencia por dicho azúcar como fuente de carbono y energía en lugar de PHE (Fenyvesi *et al.*, 2005), ralentizándose el proceso de mineralización.

En el suelo R es en el único en el que se obtiene una drástica disminución de la mineralización en presencia de *S. maltophilia* CPHE1 en relación a la obtenida con solo adición de micronutrientes (SNs), lo que indica una competencia de esta cepa con la microbiota endógena del suelo que ya se vio anteriormente que era muy activa.

4. Conclusiones

Cada uno de los suelos empleados en el presente trabajo mostró resultados diversos tras la aplicación de los diferentes tratamientos estudiados, por lo que se considera importante seleccionar una buena estrategia de biorrecuperación basada en el tipo de suelo y contaminante. Los suelos LL, PLD, ALC y CR precisaron de un degradador específico *S. maltophilia* CPHE1 para mejorar la cinética de mineralización, si bien en el suelo CR se obtuvo una cinética similar con solo aplicar HPBCD. Por otro lado, en el suelo R, la estrategia probada más efectiva resultó ser el empleo del agente químico HPBCD la cual es capaz de hacer más biodisponible a PHE en el suelo a través de la formación de un complejo de inclusión, ya que su microbiota endógena era muy activa como degradadora específica de PHE.

Agradecimientos

Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Proyecto CTM2017-82472-C2-1-R (cofinanciado por FEDER).

5. Referencias

- Abdel-Shafy, H.I.; Mansour, M.S.M. 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Petrol.* 25(1): 107–123.
- Cycoń, M.; Mroziak, A.; Piotrowska-Seget, Z. 2017. Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. *Chemosphere* 172: 52–71.
- Fenlon, K.; Andreou, K.; Jones, K.C.; Semple, K.T. 2011. The extractability and mineralisation of cypermethrin aged in four UK soils. *Chemosphere* 82: 187–192.
- Fenyvesi, E.; Gruiz, K.; Verstichel, S.; De Wilde, B.; Leitgib, L.; Csabai, K.; Szaniszló, N. 2005. Biodegradation of cyclodextrins in soil. *Chemosphere* 60(8): 1001–1008.
- Gupta, G.; Kumar, V.; Pal, A.K. 2019. Microbial degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons with emphasis on pyrene. *Polycycl. Aromat. Comp.* 39(2): 124–138.
- Morillo, E.; Sánchez-Trujillo, M.A.; Moyano, J.R.; Villaverde, J.; Gómez-Pantoja, M.E.; Pérez-Martínez, J.I. 2012. Enhanced solubilisation of six PAHs by three Synthetic cyclodextrins for remediation applications: Molecular modelling of the inclusion complexes. *PLoS ONE* 7(9): 1–8.
- Parajuli, A.; Grönroos, M.; Kauppi, S.; Plociniczak, T.; Roslund, M.I.; Galitskaya, P.; Laitinen, O.H.; Hyöty, H.; Jumpponen, A.; Strömmer, R.; Romantschuk, M.; Hui, N.; Sinkkonen, A. 2017. The abundance of health-associated bacteria is altered in PAH polluted soils - Implications for health in urban areas. *PLoS ONE* 12(11): 1–18.