

# Biorremediación de suelos contaminados con aceite de motor mediante bioestimulantes obtenidos de lodos de depuradora

## Bioremediation of motor oil contaminated soils using biostimulants obtained from sewage sludge

Isidoro Gómez Parrales<sup>1,\*</sup>, Patricia Paneque Macías<sup>1</sup>, Marina del Toro Carrillo de Albornoz<sup>1</sup>, Juan Parrado Rubio<sup>2</sup> & Manuel Tejada Moral<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola. E.T.S.I.A. Universidad de Sevilla. Ctra. de Utrera Km. 1. 41013, Sevilla, España

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, C/ Prof. García González 2, 41012, España  
(\*E-mail: iangel@us.es)

<https://doi.org/10.19084/rca.28751>

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comprobar la capacidad biorremediadora de tres bioestimulantes (BS) producidos a partir de lodos de depuradora en un suelo contaminado por aceite de motor de gasolina. Dos de los bioestimulantes (BS1 y BS2) se obtuvieron por fermentación con *Bacillus licheniformis* y el tercero (BS3) por hidrólisis enzimática. El aceite de motor tiene un elevado contenido en hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) y produjo una fuerte inhibición de la actividad microbiana del suelo. La degradación de estos hidrocarburos dependió del número de anillos aromáticos y en los suelos sin enmendar fue nula para los de 5 y 6 anillos. La aplicación de los tres BS conllevó al incremento de la actividad deshidrogenasa respecto al suelo contaminado sin enmendar, así como a un aumento de la degradación de los PAHs. El efecto de estas enmiendas sobre la degradación de los PAHs no solo dependió de su naturaleza, sino también del tipo de BS aplicado, siendo el hidrolizado enzimáticos el que arrojó los mejores resultados.

**Palabras clave:** Aceite de motor, bioestimulantes, biorremediación, PAH, actividad deshidrogenasa

### ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the bioremediation capacity of three biostimulants (BS) produced from sewage sludge in a motor oil contaminated soil. Two of the BS (BS1 and BS2) were obtained by a fermentation process with *Bacillus licheniformis* and the third (BS3) by enzymatic hydrolysis. Motor oil has a high content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and caused a strong inhibition of the soil microbial activity. The degradation of these PAHs depended on the number of aromatic rings, being observed that hydrocarbons with 5 and 6 aromatic rings were not degraded in non-organically amended soils. The soil dehydrogenase activity as well as the degradation of PAHs increased respect to the non-amended soil when the three BS were used. The effect of these amendments not only depended on the structure of PAHs but also on the chemical composition of BS, being the better results those of the soils amended with the enzymatic hydrolysate.

**Keywords:** Motor oil, biostimulants, bioremediation, PAH, dehydrogenase activity.

## INTRODUCCIÓN

Los aceites de motor usados son un residuo peligroso cuya gestión está regulada por el Real Decreto 679/2006, modificado por la Orden ARM/795/2011. Sin embargo, el manejo de pequeños volúmenes puede hacer que este residuo cause contaminación dispersa (Ramadass *et al.*, 2015). Estos residuos tienen un alto contenido en hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) debido al calentamiento y la oxidación a la que se ven sometidos durante su vida útil (Dindar *et al.*, 2015; Ramadass *et al.*, 2015). Estas sustancias no solo son tóxicas para la salud humana, por sus efectos mutagénicos y carcinogénicos, sino que también inhiben el desarrollo de los microorganismos del suelo (Rodríguez-Morgado *et al.*, 2015a).

Estudios recientes con bioestimulantes edáficos (BS) obtenidos por hidrólisis enzimática han mostrado su influencia positiva en la biorremediación de suelos con PAHs (Tejada *et al.*, 2011; Rodríguez-Morgado *et al.*, 2015a). Asimismo, Rodríguez-Morgado *et al.* (2019) obtuvieron distintos bioestimulantes a partir de lodos de depuradora por fermentación con *Bacillus licheniformis*, que al ser aplicados al suelo estimularon significativamente la actividad microbiana.

La actividad deshidrogenasa ha resultado ser un buen bioindicador de la calidad de los suelos, dada su rápida respuesta ante cualquier cambio (Dindar *et al.*, 2015; Tejada *et al.*, 2011).

Por tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar, en microcosmos, el efecto de diferentes BS, obtenidos de lodos de depuradora por fermentación e hidrólisis enzimática, en la biorremediación de suelos contaminados con aceite de motor de gasolina.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El suelo usado en este trabajo fue un Calcaric Regosols (WRB, 2014) cuyas características físico-químicas se recogen en Rodríguez-Morgado *et al.* (2015b).

Se utilizaron tres BS obtenidos de lodos de la depuradora del Centro de Nuevas Tecnologías del Agua (CENTA), de Carrión de los Céspedes (Sevilla). La obtención de los BS se describe en Rodríguez-Morgado *et al.* (2015b, 2019). Los BS fueron:

BS1 (Fermentación con *B. licheniformis* y constituido por materia orgánica hidrolizada), BS2 (Fermentación con *B. licheniformis* y constituido por bacterias, enzimas y materia orgánica hidrolizada) y BS3 (Hidrólisis enzimática mediante una endoproteasa de *B. licheniformis*). Su composición química se recoge en la Tabla 1.

**Tabla 1** - Características químicas y distribución del peso molecular de las proteínas (media  $\pm$  desviación estándar, n=3) de los bioestimulantes obtenidos por fermentación y por hidrólisis enzimática

	BS1	BS2	BS3
pH	8.0 $\pm$ 0.3	8.3 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 0.2
Materia orgánica (g kg <sup>-1</sup> )	475 $\pm$ 11	468 $\pm$ 19	748 $\pm$ 12
N (g kg <sup>-1</sup> )	31.4 $\pm$ 4.7	29.6 $\pm$ 5.2	34.3 $\pm$ 4.7
Distribución del peso molecular de proteína (D)			
> 10000	40.0 $\pm$ 2.1	42.8 $\pm$ 2.7	22.8 $\pm$ 2.2
10000 – 5000	15.6 $\pm$ 2.1	13.8 $\pm$ 1.6	9.7 $\pm$ 1.1
5000 – 1000	11.8 $\pm$ 1.9	11.7 $\pm$ 1.3	6.2 $\pm$ 1.2
1000 – 300	1.6 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.4
< 300	31.0 $\pm$ 2.5	29.7 $\pm$ 3.2	59.3 $\pm$ 4.7

El diseño experimental se realizó de la siguiente manera: 300 g de suelo tamizados (< 2 mm) y preincubados durante 7 días a 25 °C y al 30-40% de su capacidad de campo, se mezclaron con aceite de motor al 0,7% (p/p) en botes de vidrio de 1L (Ramadass *et al.*, 2015). A continuación, se añadieron los BS para conseguir un 1% de materia orgánica en los suelos (57.4 g de BS1, 59.3 g de BS2 and 35.8 g de BS3). Los tratamientos (tabla 1) se realizaron por triplicado y fueron: C (suelo no contaminado (snc) y no enmendado), C+BS1 (snc con BS1), C+BS2 (snc con BS2), C+BS3 (snc con BS3), C+O+BS1 (suelo contaminado (sc) con BS1), C+O+BS2 (sc con BS2), C+O+BS3 (sc con BS3)

Los PAHs se determinaron a los 2, 20 y 50 días de incubación. Se extrajeron en una mezcla de diclorometano/pentano 1/1. Tras agitarlo en ultrasonido y concentrarlo en rotavapor, se midieron en un CG 7890 AGILENT conectado a un detector de masas MS TRIPLE Q AGILENT 7000C. La actividad deshidrogenasa se determinó a los 2, 6, 9, 14, 20, 35 y 50 días de incubación, siguiendo el método descrito por García *et al.* (1993).

Para comprobar si existían diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos se realizaron análisis de varianza, utilizando el paquete estadístico Statgraphics Plus 2.1.

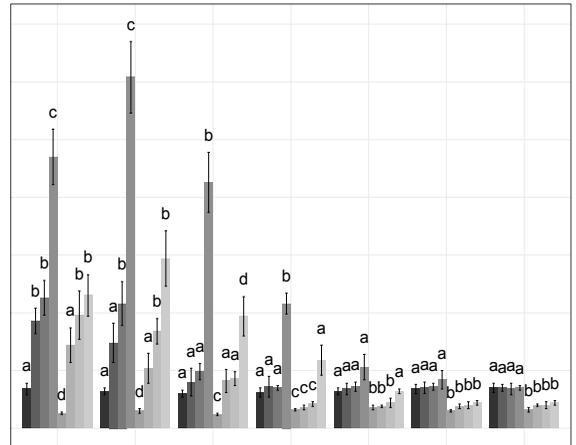
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad deshidrogenasa experimentó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) desde el inicio del experimento, que dependió de la naturaleza del BS aplicado (Figura 1). Los valores más altos se alcanzaron a los 6 días de incubación, siendo BS3 el que produjo la mayor estimulación. A partir de este día, la actividad disminuyó hasta igualar al control al final del experimento. La mayor actividad producida por los BS obtenidos por hidrólisis enzimática frente a los obtenidos por fermentación se debe a que tienen más cantidad de péptidos de bajo peso molecular (Orts *et al.*, 2019; Rodríguez-Morgado *et al.*, 2019).

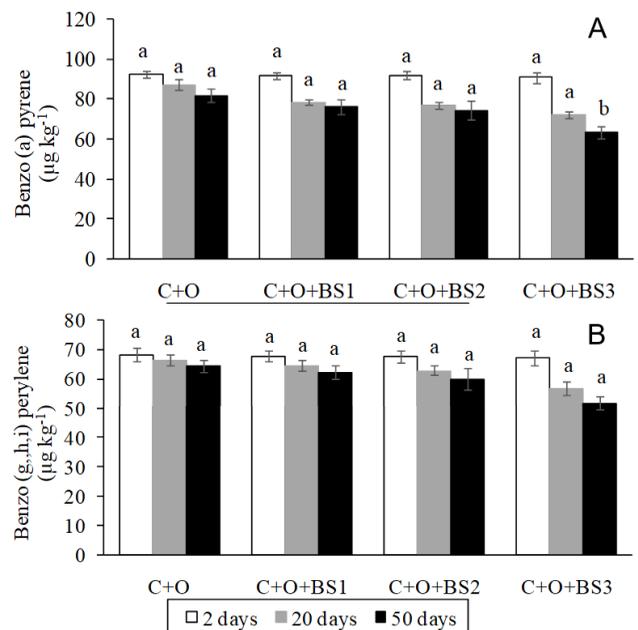
La contaminación del suelo con el aceite de motor disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) la actividad deshidrogenasa (54,3 %) al final del periodo experimental. La aplicación de los BS al suelo contaminado supuso una recuperación de la actividad metabólica del suelo, que fue mayor en los suelos tratados con BS3 frente a los tratados con BS1 y BS2. Tanto el efecto nocivo de los PAHs sobre la actividad deshidrogenasa, como la reducción en la inhibición al añadir diferentes BS también ha sido observado por otros autores (Tejada *et al.*, 2011; Rodríguez-Morgado *et al.*, 2015a).

La adición de los BS aumentó la degradación, siendo mayor para los suelos con BS3 que para los enmendados con BS1 y BS2. Así, se observó que en el tratamiento C+O+BS3, la concentración de nafaleno fue un 77% significativamente más baja al final del periodo experimental. Con respecto a los hidrocarburos de 3, 4, 5 y 6 anillos, se observó una bajada del 59%, 45%, 30% y 16%. En los suelos enmendados con BS1 y BS2, la disminución de la concentración de los PAHs de 2, 3, 4, 5, y 6 anillos fue del 62%, 50%, 33%, 16% y 10%, respectivamente (Figuras 2 y 3). Este comportamiento coincide con el observado por Rodríguez-Morgado *et al.* (2015a) en un experimento con PAHs de 3, 4 y 5 anillos aromáticos. En este trabajo los BS con proteínas de menor peso molecular produjeron la mayor degradación.

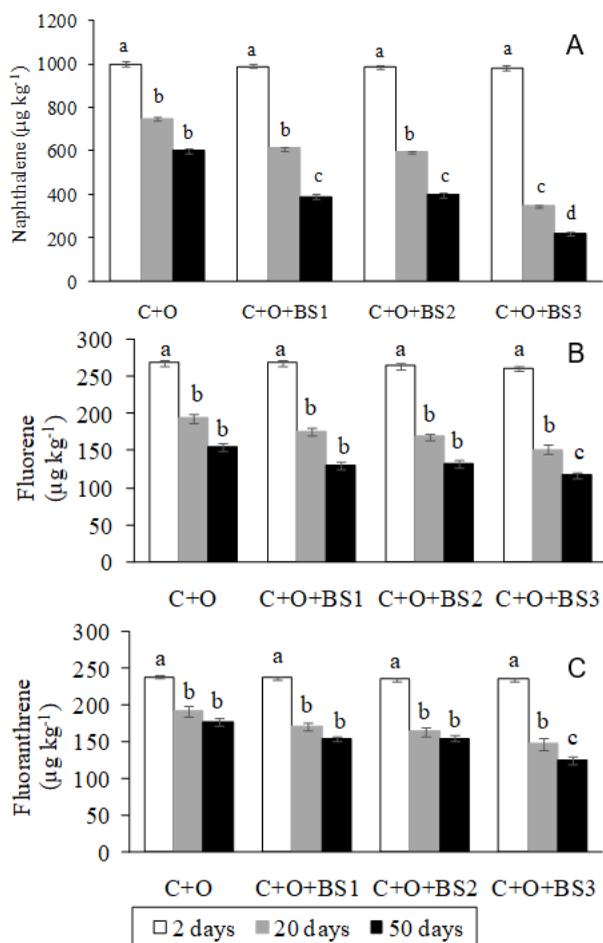
En nuestro caso, BS3 tiene el mayor contenido en proteína de peso molecular menor de 300 D (59,3%) respecto a BS1 (31%) y BS2 (29,7%) (Tabla 1).



**Figura 1** - Evolución de la actividad deshidrogenasa (media  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ ) en suelos enmendados con los BS y contaminados con aceite de motor. Letras diferentes por cada día indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2** - Evolución de PAHs con 5 (A) y 6 (B) anillos aromáticos (media  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ ). Letras diferentes por tratamiento indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3** - Evolución de PAHs con 2 (A), 3 (B) y 4 (C) anillos aromáticos (media  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ ). Letras diferentes por tratamiento indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que el aceite de motor de gasolina inhibe drásticamente la actividad microbiana del suelo. Por otro lado, los datos obtenidos tras la aplicación de BS revelan que la enmienda de suelos con estos productos es una buena estrategia para biorremediar suelos contaminados con PAHs. Finalmente, se confirma que los BS producidos por hidrólisis enzimática tienen una mayor capacidad biorremediadora que los procedente de fermentación, ya que tienen un mayor contenido en péptidos de bajo peso molecular.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (España), Plan Estatal 2017-2020, referencia RTI2018-097425-B-I00, y la Junta de Andalucía (Consejería de Economía y Educación), Proyectos I+D+i FEDER Andalucía 2014-2020, con referencia US-1263885.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dindar, E.; Şagban, O.T. & Başkaya, H. (2015) - Variations of soil enzyme activities in petroleum-hydrocarbon contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 105, p. 268-275. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.09.011>
- García, C.; Hernández T.; Costa F.; Ceccanti B. & Masciandaro, G. (1993) - The dehydrogenase activity of soils an ecological marker in processes of perturbed system regeneration. In: Gallardo-Lancho, J. (Ed.) - *Proceedings of The XI International Symposium of Environmental Biogeochemistry*, Salamanca, Spain; p. 89-100.
- Orts, A.; Tejada, M.; Parrado, J.; Paneque, P.; García, C.; Hernández, T. & Gómez-Parrales, I. (2019) - Production of biostimulants from okara through enzymatic hydrolysis and fermentation with *Bacillus licheniformis*: comparative effect on soil biological properties. *Environmental Technology*, vol. 40, n. 16, p. 2073-2084. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1436596>
- Ramadass, K.; Megharaj, M.; Venkateswarlu, K. & Naidu, R. (2015) - Ecological implications of motor oil pollution: Earthworm survival and soil health. *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 85, p. 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.02.026>
- Rodríguez-Morgado, B.; Gómez, I.; Parrado, J.; García, C.; Hernández, T. & Tejada, M. (2015a) - Accelerated degradation of PAHs using edaphic biostimulants obtained from sewage sludge and chicken feathers. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 300, p. 235-242. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.05.045>
- Rodríguez-Morgado, B.; Gómez, I.; Parrado, J.; García-Martínez, A.M.; Aragón, C. & Tejada, M. (2015b) - Obtaining edaphic biostimulants/biofertilizers from different sewage sludges. Effects on soil biological properties. *Environmental Technology*, vol. 36, n. 17, p. 2217-2226. <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1024760>
- Rodríguez-Morgado, B.; Caballero, P.; Paneque, P.; Gómez, I.; Parrado, J. & Tejada, M. (2019) - Obtaining edaphic biostimulants/biofertilizers from sewage sludge using fermentative process. Short-time effects on soil biochemical properties. *Environmental Technology*, vol. 40, n. 3, p. 399-406. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1393016>
- Tejada, M.; Benítez, C. & Parrado, J. (2011) - Application of biostimulants in benzo(a)pyrene polluted soils: Short-time effects on soil biochemical properties. *Applied Soil Ecology*, vol. 50, p. 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.08.002>
- WRB (2014) - *International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps*. World Reference Base for Soil Resources, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome. 192 p.