

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 412 398**

51 Int. Cl.:

B09C 1/10 (2006.01)

B09C 1/00 (2006.01)

C02F 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2008 E 08855705 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2013 EP 2217391**

54 Título: **Biorremediación in situ subterránea usando microorganismos específicos de sitio**

30 Prioridad:

29.11.2007 EP 07121846

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.07.2013

73 Titular/es:

**CLEANFIELD DANMARK APS (100.0%)
Mesterladden 36
2820 Gentofte, DK**

72 Inventor/es:

**PERMILD, ERIK y
MOGENSEN, ANDERS SKIBSTED**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 412 398 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Biorremediación *in situ* subterránea usando microorganismos específicos de sitio

La presente invención se refiere a un método para la biorremediación de entornos subterráneos contaminados, en el que se recuperan microorganismos autóctonos específicos de sitio del sitio contaminado, se enriquecen *ex situ* y, posteriormente, se reintroducen en el entorno subterráneo contaminado *in situ*.

En sociedades modernas industrializadas, los entornos subterráneos contaminados son una de las principales amenazas para la salud medioambiental y de los seres humanos. Contaminantes tóxicos tales como hidrocarburos de petróleo, disolventes orgánicos, pesticidas o metales pesados ponen en riesgo recursos vitales. Estos recursos son lo más frecuentemente suministros de agua potable, suelos agrícolas y un clima de interiores sano.

Algunos de los retos encontrados más frecuentemente en la limpieza de entornos subterráneos contaminados son contaminantes tóxicos, recalcitrantes y/o persistentes. Además, el acceso físico a contaminantes subterráneos es a menudo complicado y costoso, limitando por tanto el uso de esfuerzos de remediación *ex situ* tales como tecnologías de bombeo y tratamiento o excavación.

En consecuencia, se ha vuelto cada vez más popular el uso de microorganismos que degradan contaminantes para limpieza de sitios, un enfoque conocido como biorremediación. En las últimas décadas se ha observado el descubrimiento de numerosos consorcios y cepas microbianas que pueden degradar y eliminar la toxicidad de contaminantes de aguas subterráneas. En este contexto, el metabolismo microbiano aerobio, es decir, la descomposición de contaminantes catalizada por microbios que consumen oxígeno, desempeña a menudo un papel importante.

Un enfoque bien conocido de biorremediación es la adición de agentes bioestimulantes tales como fuentes de carbono, aceptores de electrones o mezclas nutricionales más complejas y agentes estimulantes al entorno de interés. Se supone que esta medida estimula el crecimiento de la microflora autóctona específica del sitio, aumentando idealmente de ese modo las velocidades de degradación de contaminantes microbianos.

La patente europea n.º 625126 da a conocer un método para la remediación *in situ* de suelo subterráneo contaminado o agua subterránea contaminados por hidrocarburos clorados. El método se basa en el suministro de nutrientes y oxígeno al subsuelo y de ese modo en la estimulación de las capacidades de degradación y crecimiento microbianas. De manera similar, la patente estadounidense n.º 6488850 da a conocer un método que comprende el suministro de un sustrato de butano a un sitio contaminado para estimular microorganismos que degradan contaminantes.

La desventaja principal de estos conceptos es que la microflora autóctona no puede utilizar una cantidad sustancial del agente estimulante añadido (por ejemplo, nutrientes, sustratos orgánicos) debido al número insuficiente de células (especialmente al comienzo del esfuerzo de remediación). En consecuencia, la fracción sin usar de agente estimulante puede experimentar reacciones redox y de sorción no deseadas con la materia orgánica y/o el sedimento subterráneo lo que conduce a ineficacia y aumento de costes. Además, nutrientes que contienen nitrógeno y fósforo en exceso pueden conducir a problemas de calidad del agua tales como eutrofización de aguas superficiales cercanas.

Otro enfoque bien conocido en la biorremediación es la introducción de microorganismos que pueden degradar uno o más contaminantes en el subsuelo contaminado. Esto se combina frecuentemente con las correcciones nutricionales mencionadas anteriormente. Los microorganismos en uso son a menudo aislados y cultivos microbianos enriquecidos altamente especializados que han demostrado previamente sus capacidades de degradación. Un ejemplo es la composición y el método dados a conocer en la patente europea n.º 1352977. En este caso, se presentan especies microbianas novedosas del género *Desulfitobacterium* que pueden deshalogenar compuestos orgánicos halogenados en el subsuelo.

Un inconveniente principal de este enfoque es que los microorganismos que funcionan bien en condiciones de laboratorio definidas a menudo funcionan mal cuando se someten a las microfloras autóctonas y condiciones *in situ* ambientales específicas del sitio. El motivo principal es que una microflora estable es a menudo una biocenosis bien equilibrada caracterizada por diversas interdependencias entre diferentes especies microbianas. En consecuencia, cepas recién introducidas que no están adaptadas a la microecología bien equilibrada de un sitio dado pueden enfrentarse bien a las condiciones fisicoquímicas y/o ecológicas que limitan en última instancia su rendimiento y supervivencia. Esto dará como resultado de nuevo un aumento en los costes y lapsos de tiempo prolongados necesarios para la limpieza del sitio.

La patente estadounidense n.º 5221159 da a conocer un método para eliminar contaminantes del suelo y agua subterránea extrayendo microorganismos naturales en el sitio contaminado, aislando al menos un microorganismo que puede biodegradar los contaminantes, fermentando el/los aislados(s) y reintroduciéndolo(s) finalmente en el subsuelo. Esta invención supera los problemas implicados en la introducción de microorganismos previamente ausentes en un sitio contaminado.

5 Sin embargo, un problema en este sentido es la etapa de aislamiento que puede conducir a una microflora escasamente equilibrada y en última instancia a velocidades de degradación no satisfactorias. El aislamiento de una o más especies microbianas seguido por la producción de aislados en grandes números de células, y finalmente la reintroducción del/de los aislado(s) en su biocenosis previamente bien equilibrada puede comprometer el equilibrio ecológico de la microflora y, de manera más importante, limita potencialmente su rendimiento de biodegradación. Además, las técnicas microbiológicas de purificación y aislamiento pueden ser costosas y llevar mucho tiempo.

10 La patente japonesa n.º 2004181314 da a conocer un método para la descomposición de contaminantes del suelo mediante microorganismos del suelo que están presentes en el suelo de interés. Sin embargo, este método es un enfoque *ex situ* que requiere operaciones mecánicas costosas tales como excavación, agitación y mezclado de material del suelo.

La solicitud de patente húngara n.º 0500412 da a conocer un método para introducir un consorcio microbiano recuperado del entorno que va a remediarse en áreas contaminadas con hidrocarburos halogenados. Sin embargo, este método se dirige a microorganismos anaerobios.

15 Por tanto, es un primer aspecto de la presente invención proporcionar un método de biorremediación que permita el tratamiento *in situ* de un sitio contaminado.

Es un segundo aspecto de la presente invención proporcionar un método de biorremediación que permita una captación microbiana eficaz de agentes bioestimulantes que se añaden al subsuelo.

20 Es un tercer aspecto de la presente invención proporcionar un método de biorremediación que haga uso de un enfoque *ex situ* sencillo y rentable para enriquecer agentes de biodegradación microbianos a partir del entorno subterráneo de interés.

Es un cuarto aspecto de la presente invención proporcionar un método de biorremediación que se dirija a agentes de biodegradación microbianos aerobios.

25 Es un quinto aspecto de la presente invención proporcionar un método de biorremediación que haga uso de la microflora autóctona presente en el sitio de interés.

30 La manera única y nueva en que la presente invención cumple uno o más de los aspectos mencionados anteriormente es proporcionar un método para limpiar un entorno subterráneo contaminado, comprendiendo dicho método las etapas de, (a) obtener una o más muestras del entorno subterráneo contaminado para proporcionar un inóculo microbiano, (b) colocar cada muestra en un reactor continuo de tanque agitado (CSTR) aireado alimentado con una disolución de alimentación para obtener un consorcio microbiano enriquecido, (c) reintroducir el consorcio microbiano enriquecido en el entorno subterráneo contaminado.

35 En la etapa (a), se obtiene un inóculo tomando muestras del entorno subterráneo contaminado que va a limpiarse. Los entornos de interés pueden ser antiguos vertederos, suelos y acuíferos contaminados o similares. Se obtienen una o más muestras sólidas y/o acuosas del entorno subterráneo contaminado mediante técnicas de toma de muestras convencionales. Las muestras pueden incluir muestras de agua subterránea, muestras de suelo, muestras de sedimento de un acuífero o mezclas de las mismas.

40 En la etapa (b), se obtiene un consorcio microbiano enriquecido a partir del inóculo usando un CSTR aireado. Pueden colocarse una o más muestras del subsuelo en el CSTR. La disolución de alimentación para el CSTR puede ser agua del suelo o agua subterránea del entorno subterráneo contaminado. Alternativamente, la disolución de alimentación puede ser un medio sintético que soporta el crecimiento microbiano. En otras realizaciones, la disolución de alimentación puede ser una combinación de agua derivada del entorno subterráneo contaminado y uno o más nutrientes o compuestos que soportan el crecimiento microbiano. Normalmente, el tiempo de residencia en el CSTR será de aproximadamente 24-36 horas, sin embargo, el tiempo de residencia puede ajustarse para que se encuentre fuera de este intervalo. El efluente del CSTR se recogerá ventajosamente para su uso posterior. La aeración del CSTR puede proporcionarse mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como se describe por ejemplo en James A. Mueller, William Charles Boyle, H. Johannes Pöpel: Aeration: Principles and Practice, CRC Press, 2002.

45 Es importante observar que el consorcio microbiano enriquecido es diferente de un cultivo aislado puro. Este último ofrece exclusivamente bacterias de una especie o cepa dadas, mientras que el consorcio de la presente invención mantiene deliberadamente, o al menos imita, la comunidad microbiana presente en el entorno subterráneo contaminado.

50 En la etapa (c), el consorcio microbiano enriquecido se reintroduce en el entorno subterráneo contaminado. Esto puede lograrse reintroduciendo simplemente el efluente recogido del CSTR. Alternativamente, o además, el contenido del CSTR puede introducirse parcial o completamente en el entorno subterráneo. Esto puede lograrse mediante inyección con lanza, perforación horizontal, inyección en pozos o combinaciones de las mismas.

55 El método de la presente invención permite la explotación del potencial de degradación microbiano natural sin tener

que introducir agentes bioestimulantes en exceso en el subsuelo. Por medio del crecimiento y enriquecimiento de la población microbiana *ex situ* en un CSTR, en condiciones controladas, se disminuye considerablemente la demanda de agentes bioestimulantes posterior. Por tanto, la introducción de grandes cantidades de agentes bioestimulantes como etapa inicial de la biorremediación se vuelve innecesaria puesto que la biomasa inicial ya está enriquecida y estimulada.

Además, dicho método sencillo para el crecimiento y enriquecimiento del consorcio microbiano autóctono de un sitio contaminado dado obvia el análisis, el aislamiento y la purificación costosos y que requieren mucho tiempo de distintas cepas microbianas. El presente método aprovecha el hecho que cepas microbianas individuales a menudo funcionan mejor en su biocenosis o consorcio microbiano original.

Según una realización preferida, el método de la presente invención comprende además las etapas de (i) inyectar oxígeno en el entorno subterráneo contaminado, (ii) permitir el agotamiento del oxígeno inyectado dentro del entorno subterráneo contaminado, (iii) repetir las etapas (i) y (ii) al menos una vez, en el que las etapas (i), (ii) y (iii) preceden a la etapa (a). Según una realización particularmente preferida, las etapas (i) y (ii) se repiten dos veces en total. Estas realizaciones se dirigen a microorganismos anaerobios facultativos, es decir, microorganismos que crecen tanto en condiciones ricas en oxígeno como en condiciones de agotamiento del oxígeno. Estos microorganismos son particularmente útiles en biorremediación y limpieza de sitios puesto que pueden oxidar contaminantes orgánicos independientemente del estado redox y suministro de oxígeno de un entorno subterráneo. El uso de tres ciclos aerobios/anaerobios antes de la toma de muestras del entorno subterráneo produce normalmente una recuperación satisfactoria de organismos anaerobios facultativos. Se logran resultados beneficiosos con varios ciclos anaerobios/aerobios alternos a lo largo de un periodo total de 30 a 60 días. Puede inyectarse oxígeno mediante cualquier técnica adecuada conocida en la técnica, por ejemplo, mediante el bombeo de aire atmosférico en el entorno subterráneo. Alternativamente, pueden introducirse oxígeno puro, disoluciones ricas en oxígeno o compuestos que liberan oxígeno.

En la etapa (ii) se permite el agotamiento del oxígeno inyectado. El agotamiento se produce, además de por otros factores, debido al consumo microbiano de oxígeno para procesos respiratorios. El agotamiento puede monitorizarse usando uno o más detectores de oxígeno, tales como un electrodo de oxígeno. Tal como se usa en el presente documento, el término "agotamiento" se refiere a una situación en la que la concentración de oxígeno en el subsuelo, por ejemplo en el agua subterránea, es sustancialmente la misma que, o menor que, antes de la inyección de oxígeno. En este contexto, "sustancialmente la misma" incluye valores que se encuentran hasta 1 mg de oxígeno por litro de agua por encima de la concentración de oxígeno antes de la inyección de oxígeno. El agotamiento del oxígeno puede medirse con respecto a una ubicación o área espacial predefinida y confinada del entorno subterráneo contaminado, tal como se define por ejemplo mediante uno o más puntos o perforaciones de toma de muestras. Según otra realización de la presente invención, se suministra un medio de crecimiento microbiano al entorno subterráneo durante al menos una de las etapas (i)-(iii). El medio de crecimiento puede ser cualquier medio de crecimiento microbiano convencional conocido en la técnica. Comprenderá normalmente fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, metales traza, vitaminas y similares. Proporcionar un medio de crecimiento promoverá la formación de una comunidad microbiana fuerte y vital que incluye microorganismos anaerobios facultativos. Según una realización preferida, el medio de crecimiento microbiano comprende al menos 50 milimoles de potasio por litro de medio, que es normalmente una composición útil para lograr los efectos mencionados anteriormente.

Según otra realización de la presente invención, la disolución de alimentación comprende agua del suelo o agua subterránea derivada del entorno subterráneo contaminado, estando complementada la disolución de alimentación con al menos 50 milimoles de potasio por litro de disolución de alimentación. Esta combinación dará como resultado normalmente composiciones y velocidades de crecimiento beneficiosas de consorcios microbianos. Cuando se usa agua del suelo o agua subterránea derivada del entorno subterráneo de interés, los microorganismos presentes en el CSTR se someten a condiciones químicas similares a su entorno subterráneo, lo que a menudo da como resultado un buen crecimiento microbiano.

Según una realización conveniente de la presente invención, el método comprende además las siguientes etapas que suceden a la etapa (b): (iv) obtener una o más muestras adicionales del entorno subterráneo contaminado para proporcionar material de microcosmo, (v) preparar uno o más microcosmos usando el material obtenido en la etapa (iv), (vi) suministrar a cada microcosmo el consorcio microbiano enriquecido obtenido en la etapa (b) y (vii) monitorizar la actividad microbiana en cada microcosmo midiendo la concentración dependiente del tiempo de uno o más compuestos en el presente documento, seleccionándose los compuestos del grupo que consiste en metano, dióxido de carbono y oxígeno. Tras haberse obtenido el consorcio enriquecido en la etapa (b), se toma una muestra de nuevo del entorno subterráneo contaminado, preferiblemente poco antes de que el consorcio enriquecido se reintroduzca según la etapa (c). Se preparan entonces uno o más microcosmos usando enfoques conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede colocarse una muestra de sedimento en una botella de suero junto con agua subterránea o agua del suelo tomada como muestra del entorno subterráneo. Se añade entonces el consorcio enriquecido, opcionalmente junto con nutrientes, uno o más contaminantes, oxígeno, agentes reductores o similares. Se monitoriza entonces la actividad microbiana en el microcosmo, por ejemplo, midiendo el oxígeno y dióxido de carbono en la fase gaseosa a lo largo del tiempo. Estableciendo este tipo de microcosmos antes de, o simultáneamente con, la etapa de reintroducción, se proporciona un método rentable y sencillo para la exploración y/o monitorización. Los microcosmos paralelos pueden dar una indicación de posibles procesos que tienen lugar en

el entorno subterráneo. De ese modo, puede evaluarse aproximadamente el potencial del consorcio microbiano enriquecido. Durante el esfuerzo de remediación a escala de campo, la toma de muestras del sitio de campo puede reducirse realmente usando este enfoque, puesto que los microcosmos pueden dar una indicación aproximada del estado del entorno subterráneo. Tal como se usa en el presente documento, el término "simultáneamente con la reintroducción" debe entenderse que cubre todas las realizaciones en las que la introducción del consorcio enriquecido en los microcosmos tiene lugar en un intervalo que oscila entre seis horas antes de y seis horas después de la etapa (c). La concentración monitorizada de metano, dióxido de carbono y/u oxígeno puede ser la concentración acuosa y/o gaseosa de estos compuestos. Los microcosmos se someterán normalmente a condiciones similares a las imperantes en el subsuelo de interés, incluyendo temperatura, concentración de contaminantes, suministro de oxígeno y similares.

Según otra realización de la presente invención, el método comprende además las siguientes etapas que suceden a la etapa (b) y preceden a la etapa (c): (viii) recoger y secar el consorcio microbiano enriquecido, y (ix) disolver y regenerar el consorcio microbiano secado en una disolución de regeneración que tiene una temperatura que se encuentra en un intervalo que oscila entre 5°C por debajo y 5°C por encima de la temperatura promedio del entorno subterráneo contaminado. Para tratar un sitio con una temperatura de agua subterránea promedio de, por ejemplo, 10°C, la etapa de regeneración debe llevarse a cabo por consiguiente a entre 5-15°C, lo más preferiblemente a, o próxima a, 10°C. La temperatura promedio puede ser una temperatura diaria, semanal, mensual o anual, pero representa preferiblemente la temperatura promedio del entorno subterráneo en el momento de realizar el método. El uso de este enfoque proporciona al método un grado superior de flexibilidad puesto que el consorcio enriquecido no necesariamente tiene que reintroducirse inmediatamente tras su provisión.

La etapa de recogida y secado puede lograrse usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica. Esto puede implicar centrifugación, lavado y secado por congelación. Una vez que se seca el consorcio, no hay presión de tiempo inmediata implicada en el cultivo del consorcio. Por consiguiente, pueden producirse cantidades adicionales del consorcio mientras tanto, si se requiere. Siempre que sea conveniente, el consorcio secado puede redisolverse en una disolución de regeneración, que puede contener fosfato, amonio, potasio y cloruro. Se disuelve el consorcio en la disolución de regeneración, por ejemplo mediante mezclado con un agitador magnético o similar. Ventajosamente, se ajusta el pH de la disolución hasta valores circumneutros. Puede añadirse una fuente de carbono, y puede monitorizarse el consumo de la misma, por ejemplo midiendo el oxígeno disuelto en la disolución. Tras el consumo activo de la fuente de carbono aumentarán las concentraciones de oxígeno disuelto. Pueden alimentarse repetidamente fuentes de carbono. Las fuentes de carbono ventajosas incluyen compuestos que están presentes en el entorno subterráneo contaminado de interés. Estos pueden incluir hidrocarburos de petróleo, tales como alcanos, alquenos, compuestos aromáticos o mezclas de los mismos.

En una realización conveniente de la presente invención, la temperatura del CSTR y su contenido se mantiene en un intervalo que oscila entre 5°C por debajo y 5°C por encima de la temperatura promedio del entorno subterráneo contaminado. Esto contribuirá ventajosamente a la formación de un consorcio microbiano que está, y permanece, bien adaptado a la temperatura *in situ* del entorno subterráneo contaminado. Ventajosamente, puede acompañarse el método de la presente invención con la adición de oxígeno en forma de aire atmosférico o agentes oxidantes tales como peróxido de hidrógeno al subsuelo. De ese modo, puede cumplirse el aumento de demanda de oxígeno del consorcio microbiano enriquecido y pueden evitarse limitaciones en la velocidad de biodegradación.

Normalmente, dicho método implicará la adición de un agente bioestimulante adecuado al subsuelo con el fin de mantener una microflora de degradación activa. Este agente bioestimulante comprende tradicionalmente uno o más compuestos que contienen nitrógeno, fósforo y/o potasio disueltos. Estos macronutrientes son esenciales para el metabolismo microbiano y crecimiento celular. Además, la adición de micronutrientes tales como minerales traza, vitaminas y similares, es deseable para promover una población microbiana viable.

Una de las ventajas principales de la presente invención es el hecho que la degradación de contaminantes por la acción del consorcio microbiano enriquecido tiene lugar *in situ* y por tanto no requiere técnicas *ex situ* costosas tales como excavación del suelo o material de acuífero.

La disolución de alimentación será normalmente un medio acuoso con varias correcciones nutricionales. Éstas son nutrientes tales como especies de nitrógeno, fósforo y/o potasio disueltas y/o micronutrientes tales como minerales traza y/o vitaminas. Éstos últimos pueden adquirirse convenientemente como fertilizantes de plantas domésticas disponibles comercialmente. Otra corrección concebible para el medio podría ser otro sustrato orgánico tal como una fuente de carbono.

En una realización preferida de la presente invención, el grupo que consiste en amonio, nitrato y sus complejos acuosos respectivos constituye al menos el 50% en peso de todos los solutos de la disolución de alimentación. Lo más preferiblemente, el mismo grupo constituye al menos el 80% en peso de todos los solutos de la disolución acuosa. Esta proporción relativamente alta de especies de nitrógeno inorgánicas ha mostrado resultados ventajosos en la etapa de enriquecimiento. Una disolución de alimentación acorde puede producirse disolviendo nitrato de amonio junto con otros constituyentes en agua destilada.

Además, la disolución de alimentación puede contener ventajosamente al menos un contaminante presente en el

entorno subterráneo contaminado de interés. De ese modo, se garantiza que especies microbianas tolerantes o que degradan contaminantes estén soportadas por las condiciones de incubación. Si los contaminantes en el sitio de interés incluyen, o están dominados, por hidrocarburos de petróleo, la disolución de alimentación puede complementarse con gasolina sin plomo o diésel.

- 5 El CSTR se mantiene normalmente a una temperatura próxima a la temperatura *in situ* del entorno subterráneo contaminado de interés. Esto tiene la ventaja de someter la comunidad microbiana a condiciones que son muy similares a su hábitat natural. De ese modo se garantiza que no habrá una pérdida sustancial de actividad o capacidad de degradación tras la reintroducción del consorcio en el subsuelo.

- 10 La clase de contaminantes subterráneos seleccionados como diana por el presente método serán normalmente compuestos orgánicos, por ejemplo, pero no exclusivamente, hidrocarburos de petróleo y/o disolventes orgánicos. Estas sustancias normalmente pueden biodegradarse fácilmente por la acción de microorganismos aerobios. Se han descubierto consorcios microbianos, aislados o cultivos de enriquecimiento que pueden oxidar parcial o completamente estas sustancias en numerosos entornos subterráneos. La idea de explotar esta capacidad del metabolismo microbiano aerobio es especialmente atractiva puesto que puede introducirse oxígeno en forma de aire atmosférico de manera fácil y rentable en el entorno subterráneo.

- 15 Hay varias técnicas conocidas mediante las cuales puede reintroducirse el consorcio microbiano enriquecido en el entorno subterráneo contaminado. Normalmente, una o más de las siguientes técnicas lograrán esto: inyección con lanza, perforación horizontal y/o inyección en pozos. Resulta obvio para el experto en la técnica que la elección de la técnica apropiada dependerá de varios parámetros tales como profundidad, accesibilidad y la extensión espacial de la contaminación.

En una realización preferida de la presente invención, el método comprende además la etapa de aplicar una disolución de lavado que comprende al menos un detergente al entorno subterráneo contaminado antes de reintroducir el consorcio microbiano enriquecido. Esta etapa adicional ha demostrado una limpieza de sitios particularmente eficaz, debido a esta combinación específica de etapas.

- 20 La invención se explicará en mayor detalle a continuación, donde se describen propiedades ventajosas adicionales y realizaciones de ejemplo con referencia a los ejemplos y dibujos.

Figuras

La figura 1 muestra un gráfico que representa las concentraciones de hidrocarburo (ordenada) frente al tiempo (abscisa).

- 30 La figura 2 muestra un gráfico que representa las concentraciones de hidrocarburo (ordenada) frente al tiempo (abscisa) para una suspensión microbiana según la invención en comparación con una suspensión microbiana convencional y degradación sin una suspensión microbiana.

- 35 Según otra realización de la presente invención, se añaden uno o más contaminantes a la fase líquida que se usa para preparar la suspensión y para que fluya al interior del CSTR. Ventajosamente, dichos contaminantes pueden elegirse de manera que coincidan con los contaminantes predominantes y/o relevantes en el sitio que va a remediarse según la presente invención. Dichos contaminantes pueden ser compuestos orgánicos, por ejemplo uno o más hidrocarburos de petróleo.

- 40 Según una realización adicional de la presente invención el equipo usado en el laboratorio y/o en el campo, por ejemplo el CSTR, la potencial tubería y un potencial depósito para la disolución de entrada, se esteriliza antes de su uso, por ejemplo mediante sometimiento a autoclave.

Ejemplos

Ejemplo 1: Toma de muestras e incubación de suelo contaminado

- 45 Se tomó como muestra una masa de aproximadamente 2 kilogramos de suelo contaminado de un sitio contaminado. Se tomó como muestra suelo a una profundidad de aproximadamente 1,5 metros por debajo de la superficie. Se realizó la toma de muestras de suelo según las siguientes recomendaciones y directrices publicadas,

- Grøn *et al.* (2003) Håndbog i prøvetagning af jord og grundvand, n.º 3, Amternes Videncenter for Jordforurening (AJV), Teknik og Administration (en danés)
- Miljøstyrelsen (2003) Liste over kvalitetskriterier i relation til forurennet jord (opdateret 2005), som tillæg til Miljøstyrelsens Vejledning n.º 6 1998: Oprydning på forurenede lokaliteter (en danés)
- 50 - Miljøstyrelsen (2000) Miljøprojekt 579. Udvikling af metode til testning af udvaskning af organiske stoffer fra jord og restprodukter (en danés).

Se analizó la muestra de suelo obtenida para determinar hidrocarburos extraíbles con pentano. El análisis mostró

que la muestra contenía aproximadamente 8800 miligramos de hidratos de carbono (fracción de benceno C35) por kilogramo de masa seca.

5 Se mezcló la muestra de suelo con aproximadamente 5 litros de agua corriente para producir una suspensión. El agua corriente puede contener los siguientes constituyentes a sus respectivas concentraciones; 170 miligramos de NaHCO_3 por litro, 50 miligramos de MgCl_2 por litro, 210 miligramos de CaCl_2 por litro; Di Gabriele & Scantlebury (2003) Corrosion Behaviour Of Magnesium Sacrificial Anodes In Tap Water, The Journal of Corrosion Science and Engineering, vol. 4, preimpresión 4. El agua corriente puede tener además un valor de pH circunneuro de aproximadamente 7.

10 Puede reemplazarse el agua corriente por un medio de nutrientes que contiene factores de crecimiento esenciales necesarios para el crecimiento microbiano. Un medio de crecimiento contemplado comprende proteosa peptona, glicerol, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, agar y agua destilada. Otros constituyentes contemplados del medio incluyen compuestos de hierro, extracto de levadura, ácidos grasos y triptona. Un experto en la técnica podrá elegir fácilmente un medio apropiado basándose en los requisitos experimentales, por ejemplo basándose en qué
15 microbios o grupos microbianos se seleccionen como diana. En una realización según la presente invención se seleccionan como diana bacterias del género *Pseudomonas*. Puede encontrarse una visión general útil de diferentes medios en el "Handbook of Microbiological Media", 3ª edición, por Ronald M. Atlas (autor), Lawrence C. Parks (editor), CRC Press, 2004.

En una realización preferida las *Pseudomonas* pueden comprender el microorganismo *Pseudomonas putida*, ya que este microorganismo puede remediar suelos contaminados con naftaleno.

20 Se incubó una submuestra de aproximadamente 0,5 kilogramos de la suspensión mencionada anteriormente en un CSTR a una temperatura de 20°C. Puede ajustarse bien la temperatura de incubación hasta la temperatura de subsuelo específica del sitio contaminado dado. Además, puede aumentarse ventajosamente la temperatura de incubación hasta temperaturas por encima de 20°C, tal como por ejemplo 30°C o 37°C para aumentar la velocidad de crecimiento microbiano.

25 Se estableció un flujo de entrada continuo de agua corriente en el CSTR a una velocidad de flujo de aproximadamente 15 a 20 mililitros por hora. También se estableció un flujo de salida continuo de la fase líquida dentro del CSTR, que coincidía aproximadamente con el flujo de entrada. Un experto en la técnica podrá ajustar la velocidad de flujo según los requisitos y condiciones experimentales, tales como la velocidad de crecimiento microbiano.

30 Además, se aireó el CSTR durante su funcionamiento para promover el crecimiento de bacterias aerobias. Se llevó a cabo la aeración inyectando aire comprimido estéril.

Se tomó una muestra acuosa del CSTR cada día empezando el primer día de incubación. La figura 1 muestra las concentraciones acuosas de diferentes hidrocarburos a lo largo del tiempo. En la figura 1 los cuadrados negros indican los hidrocarburos de la fracción de benceno C10, los círculos negros indican los hidrocarburos de la fracción
35 C10-C25, los cuadrados blancos indican los hidrocarburos de la C25-C35 y los círculos blancos indican la suma de las tres fracciones de hidrocarburos mencionadas anteriormente. Se corrigen las concentraciones de fase acuosa en la figura 1 para los efectos de dilución por agua corriente que fluye al interior del CSTR.

Los datos mostrados en la figura 1 abarcan un intervalo de tiempo de dos días y demuestran la biodegradación satisfactoria de hidrocarburos en esta escala de tiempo. La concentración acuosa inicial de hidrocarburos era de
40 aproximadamente 42000 microgramos por litro (suma de las tres fracciones de hidrocarburos mencionadas anteriormente). En el plazo del periodo de tiempo mostrado de dos días, esta concentración disminuyó hasta un valor final de aproximadamente 10000 microgramos por litro.

Además, se analizó la comunidad microbiana presente en el CSTR. Se tomaron muestras de la suspensión tras dos días completos de funcionamiento del CSTR. Se incubaron las muestras en agar de soja tríptico (TSA) y agar de cetrimida a 20°C. Se identificaron colonias microbianas mediante secuenciación de ADN de fragmentos de ADNr
45 16S. Se compararon las secuencias obtenidas con secuencias conocidas guardadas en GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica ("*National Center for Biotechnology Information*"), Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos ("*U.S. National Library of Medicine*"), la base de datos de secuencias de nucleótidos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular ("*European Molecular Biology Laboratory*", EMBL), la Base de Datos de ADN de Japón ("*DNA Database of Japan*", DDBJ) y el Banco de Datos de Proteínas ("*Protein Data Bank*", PDB) del Colaboratorio de investigación en Bioinformática Estructural ("*Research Collaboratory for Structural Bioinformatics*", RCSB) usando BLAST (herramienta de búsqueda de alineaciones locales básicas, "*Basic Local Alignment Search Tool*" del Centro Nacional de Información Biotecnológica, Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894).

55 La tabla 1 muestra los resultados de diferentes colonias.

Puede usarse la suspensión incubada y/o el flujo de salida acuoso del CSTR para su inyección en el subsuelo y posterior biorremediación. Antes de la inyección, pueden tratarse previamente la suspensión y/o la disolución de flujo

de salida acuoso, por ejemplo para la eliminación de contaminantes u otras sustancias. Otras etapas de tratamiento previo contempladas incluyen purificación, concentración, enriquecimiento y/o corrección con factores de crecimiento microbiano.

Tabla 1

Nombre de la muestra	Resultado
Colonia 1, TSA	611 pares de bases: coincidencia del 100% con <i>Pseudomonas putida</i> J5
Colonia 2, TSA	709 pares de bases: coincidencia del 100% con <i>Comamonas testosteroni</i> NCIMB 10643
Colonia 3, TSA	654 pares de bases: coincidencia del 100% con <i>Pseudomonas lini</i> KNUC164, <i>Ps. Fluorescens</i> PC17 y <i>Ps. Mandelii</i> CIP 105273
Colonia 4, TSA	704 pares de bases: coincidencia del 100% con <i>Delftia acidovorans</i> EEZ23
Colonia 5, cetrimida	701 pares de bases: coincidencia del 100% con <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 17642
Colonia 7, TSA	464 pares de bases: <i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC 55310 y <i>Rh. Boritolerans</i> BTM-6B

- 5 Un experto en la técnica entenderá que las cantidades, los volúmenes y las masas a las que se hacen referencia anteriormente pueden ajustarse según requisitos y condiciones específicos de casos. La cantidad de suspensión de suelo incubada en el CSTR puede aumentarse de manera fácil en un factor de 10 o más. Por consiguiente, puede aumentarse la velocidad de flujo del líquido que fluye al interior del CSTR.

Ejemplo 2: Regeneración del consorcio microbiano secado

- 10 Se preparó una disolución de regeneración para disolver y regenerar el consorcio microbiano secado proporcionando 10 litros de agua en un tanque. Se ajustó la temperatura del agua a 11°C, (preferiblemente el agua está a 10°C ± 2°C) simulando de ese modo las condiciones de temperatura en el subsuelo de interés. Se añadieron los siguientes componentes y se disolvieron en el agua:

- 300 gramos de fosfato de diamonio

- 15 - 30 gramos de fosfato de potasio dibásico dihidratado

- 25 gramos de fosfato de potasio monobásico

- 80 gramos de cloruro de amonio

- 30 gramos de cloruro de sodio

- 20 Se disolvió una masa de 1,5 kg de consorcio microbiano secado según la presente invención en la disolución. Se burbujeó aire ambiental con un flujo de 90 l/h a través de la disolución para lograr una concentración de oxígeno disuelto de aproximadamente 10 mg por litro. Se ajustó el pH a entre 6,5 y 7,0. Se añadieron 150 ml de agua intersticial contaminada sin plomo, tras lo cual disminuyeron las concentraciones de oxígeno disuelto en un plazo de 24 horas. Cuando aumentaron de nuevo las concentraciones de oxígeno disuelto, se añadieron hidrocarburos hasta una concentración de 1900 mg/l. Una vez que se degradó la concentración de hidrocarburos hasta 0,6 mg/l, la suspensión microbiana estaba lista para su aplicación al subsuelo. Los recuentos de placas microbianas de muestras tomadas de la suspensión lista fueron de aproximadamente 10⁸ UFC por mililitro.

Ejemplo 3: Ejemplo comparativo

- 30 Se prepararon tres muestras de 100 ml de suelo que contenía contaminación con hidrocarburos totales de petróleo (TPH). Hidrocarburos totales de petróleo (TPH) es un término usado para describir una gran familia de varios cientos de compuestos químicos que provienen originalmente de petróleo crudo.

Se proporcionó una suspensión microbiana de la colonia 3 dada a conocer en la tabla 1 usando el procedimiento descrito en el ejemplo 2. Se añadieron 10 ml de la suspensión a la primera muestra. Se añadieron 10 ml de una suspensión microbiana convencional usada de manera convencional para degradar TPH a la segunda muestra y se dejó la tercera muestra como control.

- 35 Tal como resulta evidente a partir de la figura 2, no sólo hay una promoción de la degradación usando la suspensión microbiana según la invención, sino que también se completa la degradación mucho más rápido que con los métodos convencionales.

REIVINDICACIONES

1. Método para limpiar un entorno subterráneo contaminado, comprendiendo dicho método las etapas de
 - a) obtener una o más muestras del entorno subterráneo contaminado para proporcionar un inóculo microbiano,
 - 5 b) colocar cada muestra en un reactor continuo de tanque agitado (CSTR) aireado alimentado con una disolución de alimentación para obtener un consorcio microbiano enriquecido,
 - c) reintroducir el consorcio microbiano enriquecido en el entorno subterráneo contaminado.
2. Método según la reivindicación 1, estando el método caracterizado porque comprende además las siguientes etapas que preceden a la etapa (a),
 - 10 (i) inyectar oxígeno en el entorno subterráneo contaminado,
 - (ii) permitir el agotamiento del oxígeno inyectado dentro del entorno subterráneo contaminado, y
 - (iii) repetir las etapas (i) y (ii) al menos una vez.
3. Método según la reivindicación 2, caracterizado porque las etapas (i) y (ii) se repiten dos veces en total.
4. Método según las reivindicaciones 2 ó 3, caracterizado porque se suministra un medio de crecimiento microbiano al entorno subterráneo durante al menos una de las etapas (i)-(iii).
- 15 5. Método según la reivindicación 4, caracterizado porque el medio de crecimiento microbiano comprende al menos 50 milimoles de potasio por litro de medio.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la disolución de alimentación comprende agua del suelo o agua subterránea derivada del entorno subterráneo contaminado, en el que la disolución de alimentación se complementa con al menos 50 milimoles de potasio por litro de disolución de alimentación.
- 20 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque comprende además las siguientes etapas que suceden a la etapa (b):
 - 25 (iv) obtener una o más muestras adicionales del entorno subterráneo contaminado para proporcionar material de microcosmo,
 - (v) preparar uno o más microcosmos usando el material obtenido en la etapa (iv),
 - (vi) suministrar a cada microcosmo el consorcio microbiano enriquecido obtenido en la etapa (b), y
 - (vii) monitorizar la actividad microbiana en cada microcosmo midiendo la concentración dependiente del tiempo de uno o más compuestos en el presente documento, seleccionándose los compuestos del grupo que consiste en metano, dióxido de carbono y oxígeno.
 - 30
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, estando el método caracterizado porque comprende además las siguientes etapas que suceden a la etapa (b) y preceden a la etapa (c),
 - 35 (viii) recoger y secar el consorcio microbiano enriquecido, y
 - (ix) disolver y regenerar el consorcio microbiano secado en una disolución de regeneración que tiene una temperatura que se encuentra en un intervalo que oscila entre 5°C por debajo y 5°C por encima de la temperatura promedio del entorno subterráneo contaminado.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque la temperatura del CSTR y su contenido se mantiene en un intervalo que oscila entre 5°C por debajo y 5°C por encima de la temperatura promedio del entorno subterráneo contaminado.
- 40 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque la disolución de alimentación es una disolución acuosa que comprende al menos un compuesto que contiene nitrógeno, un compuesto que contiene fósforo o un compuesto que contiene potasio, en el que el grupo que consiste en amonio, nitrato y sus complejos acuosos respectivos constituye al menos el 50% en peso de todos los solutos de la disolución acuosa.
- 45 11. Método según la reivindicación 10, caracterizado porque el grupo que consiste en amonio, nitrato y sus complejos acuosos respectivos constituye al menos el 80% en peso de todos los solutos de la disolución acuosa.

12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, caracterizado porque la disolución de alimentación comprende al menos un contaminante presente en el entorno subterráneo contaminado de interés.
- 5 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, caracterizado porque uno o más de los contaminantes subterráneos son hidrocarburos de petróleo.
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, estando el método caracterizado porque comprende además añadir peróxido de hidrógeno y/o aire atmosférico al entorno subterráneo contaminado.
- 10 15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, estando el método caracterizado porque comprende además la etapa de aplicar una disolución de lavado que comprende al menos un detergente al entorno subterráneo contaminado antes de reintroducir el consorcio microbiano enriquecido.
16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, estando el método caracterizado porque comprende además añadir una disolución de nutrientes que contiene al menos una especie que contiene nitrógeno, una especie que contiene fósforo o una especie que contiene potasio disuelta a dicho entorno subterráneo contaminado antes, durante o después de dicha reintroducción del consorcio enriquecido.
- 15 17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, caracterizado porque la reintroducción de dicho consorcio microbiano enriquecido en el entorno subterráneo se lleva a cabo mediante inyección con lanza, perforación horizontal y/o inyección en pozos.

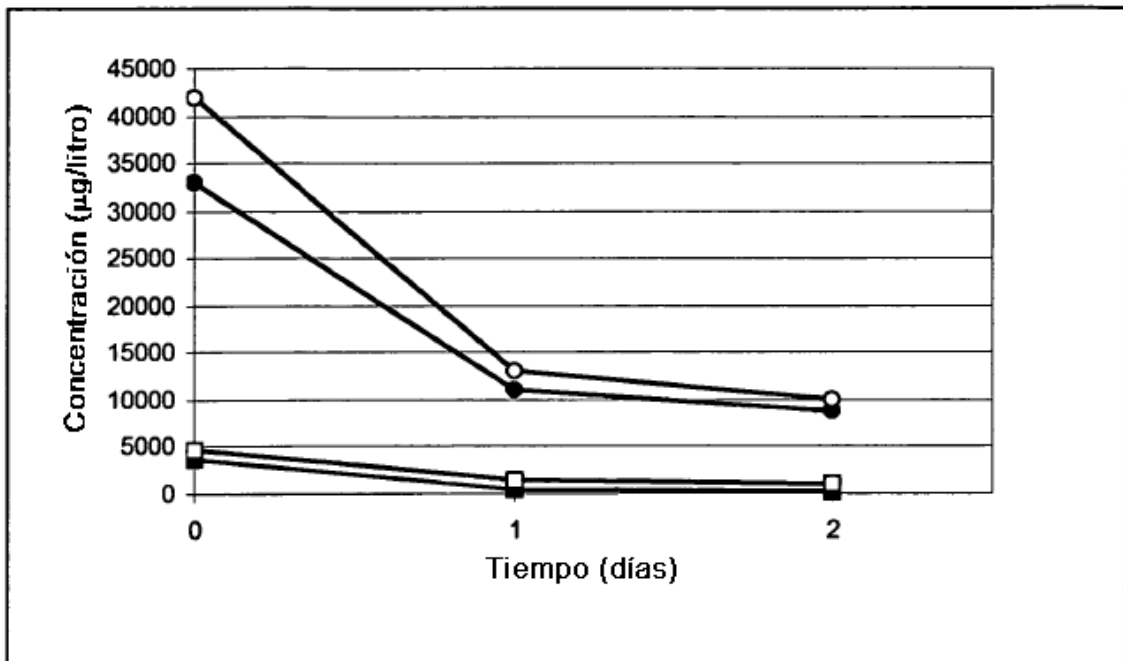


Figura 1

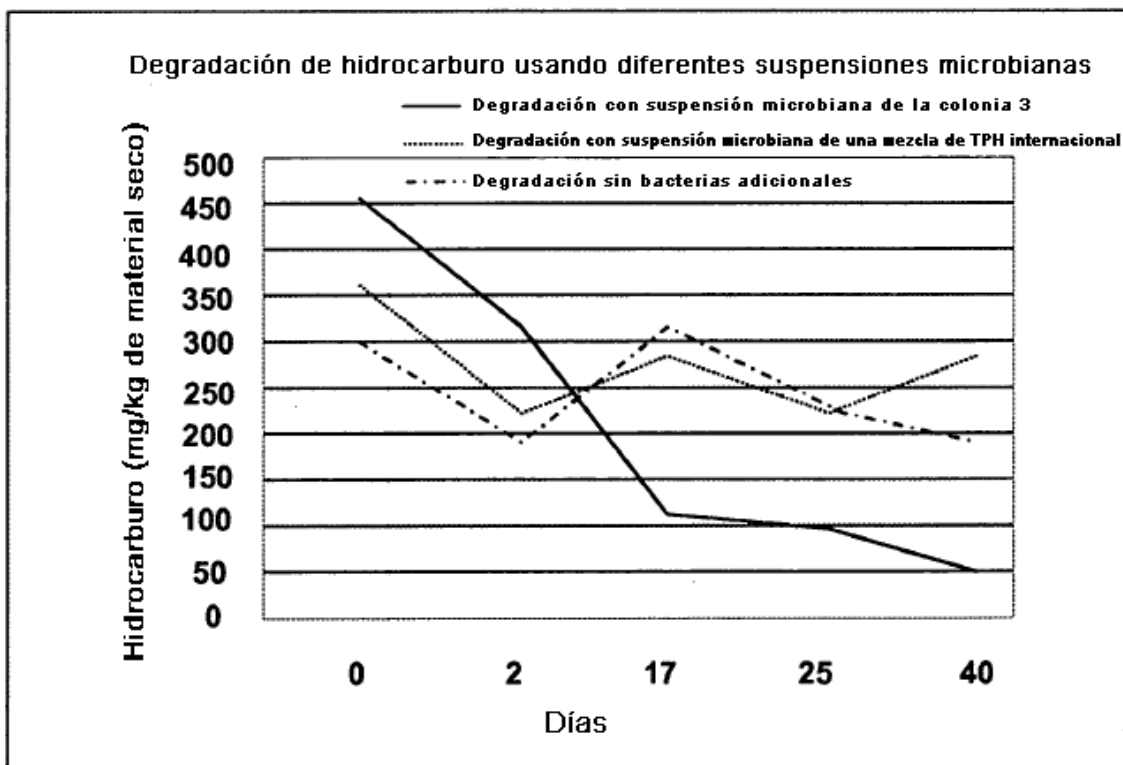


Figura 2