



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 367**

51 Int. Cl.:

B09C 1/10 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/26 (2006.01)

A62D 3/00 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03008213 .5**

86 Fecha de presentación : **09.04.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1352694**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.10.2003**

54

Título: **Composiciones para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos y/o disolventes y/o compuestos orgánicos.**

30

Prioridad: **09.04.2002 IT MI02A0759**

73

Titular/es: **Tirsi S.R.L.**
Cascina Gallona di Cascinazza
27032 Ferrera Erbognone, IT

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

72

Inventor/es: **Scevola, Mario Ercole;**
Allevi, Giovanni y
Allevi, Michela

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

74

Agente: **Álvarez López, Fernando**

ES 2 305 367 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

Composiciones para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos y/o disolventes y/o compuestos orgánicos.

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una nueva composición para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo y/o por disolventes orgánicos y/o por otros compuestos orgánicos biodegradables.

10

Estado de la técnica

La presente invención ofrece una solución a la petición creciente de intervenciones dirigidas a la descontaminación de áreas, antiguos emplazamientos de actividad antrópica, que son decomisados y recalificados de áreas industriales a áreas residenciales o a espacios verdes públicos o privados o que necesitan ser recuperados, como en el caso de vertidos o derrames accidentales.

15

Entre las diversas técnicas para la descontaminación de áreas contaminadas, la biorremediación ofrece la ventaja de ser completamente eco-compatible, evita recurrir a intervenciones drásticas y permite un ahorro económico notable, especialmente cuando el nivel de contaminación y las condiciones locales permiten el tratamiento *in situ*, evitando la transferencia de grandes cantidades de suelo a los vertederos o a los centros de tratamiento.

20

La técnica de biorremediación tradicional consiste en el intento de revitalizar y estimular la proliferación de la flora microbiana indígena superviviente en el suelo contaminado a través de la optimización de los niveles de oxígeno y humedad del suelo y la adición de micronutrientes tales como nitrógeno y fósforo.

25

Por ejemplo, el Documento D1 describe una composición para la biorremediación de suelos contaminados con compuestos halogenados, que consta esencialmente de sales de sulfato, derivados de hierro, donadores de electrones, extractos de levadura, morrenas glaciares, compuestos de nitrógeno y compuestos de fósforo.

30

La composición además puede incluir abono, tensioactivos y/o un muriato de potasio.

El proceso de biorremediación descrito en este documento se produce mediante la adición de la composición de nutrientes anterior al suelo donde estimula el crecimiento de bacterias indígenas, ayudándolas a degradar los contaminantes halogenados.

35

El Documento D2 describe un proceso de descontaminación de suelo de metoxicloro en el que el suelo contaminado se mezcla con material de enmienda tal como residuos agrícolas, fangos de residuos municipales, fangos activos o estiércol de caballo, vaca, oveja, pavo, gallina o pez (columna 2, líneas 14-27). La mezcla así obtenida a continuación se convierte en abono a una temperatura entre 20°C y 65°C, en presencia de un contenido en agua entre el 40% y el 100% y ciclos de conversión en abono alternantes en los que el potencial redox se mantiene por debajo de -200 mV con etapas de conversión en abono en las que dicho potencial se mantiene por encima de los 100 mV (véase columna 1, líneas 29-42). El grado deseado de biodegradación no se consigue en la primera secuencia de tratamiento anaeróbico/aeróbico, sino que es necesario repetir esa secuencia una o más veces para obtener resultados satisfactorios.

40

La biorremediación se puede llevar a cabo sobre suelos no retirados que se oxigenan mediante la insuflación de aire a través de un sistema de tubos perforados introducidos en el suelo (bioventeo). Alternativamente, en especial cuando la contaminación del suelo se extiende hasta mucha profundidad, el suelo a descontaminar se excava y se coloca en pilas (biopilas) que permiten un mayor control de los parámetros anteriormente mencionados.

45

Algunas veces, también se añaden al suelo preparaciones bacterianas de diferentes especies, dirigidas a degradar los contaminantes.

La cinética de la actividad biodegradante está influenciada por las condiciones ambientales tales como la temperatura, humedad, pH, pO₂, la relación entre los posibles nutrientes presentes y, obviamente, el nivel de contaminación.

50

Las técnicas de biorremediación tradicionales conducen no obstante a resultados parciales o inciertos y requieren periodos extremadamente prolongados.

Por tanto, se percibe la necesidad de desarrollar una técnica de biorremediación que permita la consecución de la descontaminación rápida y completa de un suelo contaminado.

55

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a una nueva composición para la biorremediación de suelos contaminados que comprende un compost procedente del compostaje de residuos lignocelulósicos vegetales, fangos biológicos y/u otros residuos fermentables y con un índice de respiración comprendido entre 500 y 1000, integrado con una asociación de bacterias y/o mohos adaptados y/o inducidos a metabolizar el(los) contaminante(s) que se desea(n) retirar del suelo.

60

ES 2 305 367 T3

Preferentemente, dichas bacterias y/o mohos se aíslan del suelo contaminado, se revigorizan y se multiplican hasta la concentración deseada.

5 Ahora se ha encontrado de manera sorprendente que dicha composición, cuando se usa en la descontaminación de suelos contaminados por hidrocarburos y/o disolventes orgánicos y/o compuestos orgánicos, permite la reducción del grado de contaminación de esos suelos hasta los límites legales en periodos extremadamente rápidos, notablemente inferiores a aquéllos necesarios por los procedimientos de biorremediación tradicionales.

10 La presente invención se refiere, además, a un procedimiento para la biorremediación de suelos que comprende el uso de esa composición.

Descripción detallada de la invención

15 El objeto de la presente invención es una composición para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos y/o disolventes y/o compuestos orgánicos que comprende:

20 a) un compost procedente de materiales lignocelulósicos vegetales, de fangos biológicos, de las fracciones húmedas de residuos urbanos sólidos, de estiércol animal o de sus mezclas que tiene un índice de respiración que abarca entre 500 y 1000; y

b) una asociación de bacterias y/o mohos adaptados y/o inducidos a metabolizar el(los) contaminante(s) concreto(s) que se desea(n) eliminar del suelo;

25 en el que la cantidad de dichas bacterias y/o mohos por m³ de dicha composición corresponde a la presente en un volumen que abarca entre 1000 y 5000 ml de un caldo de cultivo que contiene entre 20 y 40 g de biomasa húmeda/litro.

30 La composición de la invención es particularmente adecuada para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos de petróleo, alcoholes, por ejemplo metanol, isopropanol, n-butanol, ácidos orgánicos y sus derivados, por ejemplo, ácido fenilacético y ésteres, por ejemplo, acetato de butilo, cetonas, por ejemplo, acetona, o sus mezclas.

35 Particularmente preferido es el uso, en la composición de la invención, de un compost procedente de materiales lignocelulósicos vegetales, de fangos biológicos o de sus mezclas. Los materiales lignocelulósicos vegetales adecuados para la preparación del compost según la invención son, por ejemplo, residuos de podas, residuos de frutas/vegetales y residuos agrícolas.

40 El compost de la composición de la invención se prepara según las técnicas conocidas en la materia, por ejemplo, en bioceldas con aireación forzada o en pilas volteadas periódicamente.

Durante la formación del compost, en la fase termófila, se alcanzan temperaturas elevadas, superiores a 70°C, que dan lugar a la eliminación de posibles gérmenes patógenos presentes.

45 Los microorganismos presentes en la composición de la invención, preferentemente aislados del mismo suelo que se desea descontaminar y no modificados genéticamente, pertenecen tanto a bacterias (por ejemplo, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*) como a mohos (por ejemplo, *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Fusarium*).

50 Preferentemente, las bacterias y/o mohos presentes en la composición de la invención se aíslan de un suelo contaminado y se revitalizan. El término "bacterias y/o mohos revitalizados" significa bacterias y/o mohos en los que, además de la activación de la capacidad proliferativa, también se ha mantenido y/o iniciado la inducción enzimática funcional a la biodegradación de los contaminantes presentes en el suelo.

55 Por ejemplo, se toman muestras representativas de suelo en diversas áreas del emplazamiento contaminado, se aísla la flora microbiana autóctona sobre un medio de cultivo en agar y a continuación se revitalizan y se multiplican en un cultivo líquido basado en carbohidratos simples y complejos, extractos de proteínas y sales minerales. A dicho medio de cultivo se añaden pequeñas cantidades, del orden de ppm, del(de los) contaminante(s) descubierto(s) en el suelo a recuperar con el objetivo de mantener o iniciar en los microorganismos la inducción enzimática funcional a la biodegradación de las sustancias contaminantes identificadas. Preferentemente, los contaminantes anteriormente mencionados se añaden al medio de cultivo en cantidades comprendidas entre el 5% y el 20% con respecto al nivel de contaminación encontrado en el suelo contaminado. La preparación del caldo de cultivo al cual se añade el compost se produce en un cultivo aireado sumergido, a una temperatura comprendida entre 20°C y 30°C, hasta el final de la fase de crecimiento logarítmico, cuando el contenido en biomasa del medio de cultivo está comprendido entre 20 y 40 g/litro.

65 El caldo de cultivo se puede añadir directamente al compost en relaciones que abarcan entre 1000 y 5000 ml por m³ de abono. Alternativamente, el caldo de cultivo se puede secar previamente sobre un soporte sólido poroso, preferentemente constituido por salvado de cereal y/o gránulos minerales porosos.

ES 2 305 367 T3

En ese caso, el caldo de cultivo se pulveriza sobre el soporte poroso, preferentemente en cantidades que abarcan entre 0,75 y 1 ml por gramo de soporte, y el material húmedo se liofiliza o se seca a vacío a una temperatura $\leq 30^{\circ}\text{C}$.

5 Al abono se le añade una cantidad de microorganismos sobre el soporte sólido equivalente a aquella contenida en un volumen de entre 1000 y 5000 ml del caldo de cultivo anteriormente mencionado.

10 Preferentemente, la composición de la invención también comprende micronutrientes. Preferentemente, dichos micronutrientes están constituidos por sales inorgánicas de fósforo y posiblemente oligoelementos tales como sales de Fe^{2+} y de Co^{2+} .

10 En los casos en los que el suelo a descontaminar sea excesivamente compacto, la composición de la invención puede comprender gránulos minerales de elevada porosidad tales como, por ejemplo, zeolitas, montmorillonitas y silicatos complejos, que estimulen la difusión de oxígeno hacia el interior de la masa de suelo a descontaminar.

15 Un objeto adicional de la presente invención es un procedimiento para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos y/o disolventes orgánicos y/o compuestos orgánicos que comprende la mezcla del suelo contaminado con la composición de la invención en cantidades que abarcan entre el 1% y el 50% en v/v, preferentemente entre el 20% y el 30%.

20 Preferentemente, ese procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) la excavación del suelo contaminado;
- 25 b) la adición al suelo contaminado de la composición de la invención en cantidades que abarcan entre el 1% y 50% en v/v, preferentemente entre el 20% y el 30%, y la mezcla para así obtener una masa homogénea;
- c) la incubación de la mezcla a una temperatura comprendida entre 10°C y 40°C , una tensión de oxígeno de al menos el 2% y una humedad comprendida entre el 20% y el 65% durante un período de tiempo que abarca entre 30 y 180 días en función del tipo y el nivel de contaminantes.

30 Preferentemente la etapa c) se lleva a cabo incubando la mezcla en biopilas en las que la tensión de oxígeno anteriormente mencionada se mantiene mediante la insuflación de aire a través de un sistema de tubos perforados conectados a ventiladores externos o volteándolas mecánicamente a intervalos de al menos 10-15 días.

35 Alternativamente, la mezcla obtenida en la etapa b) se vuelve a colocar en el mismo lugar de la excavación y la tensión de oxígeno anteriormente mencionada se mantiene mediante la insuflación y/o aspiración de aire a través de un sistema de tubos perforados introducidos en el suelo (bioventeo).

40 El procedimiento de biorremediación según la invención permite obtener un suelo fertilizado y descontaminado que se puede usar para la recuperación de áreas marginales o se puede reciclar a suelos agrícolas.

45 Ejemplo 1

Un suelo contaminado por hidrocarburos de petróleo, extraído de una antigua instalación de depósito de carburante se vuelve homogeniza mezclándolo y pasándolo a través de un tamiz rotatorio con una malla de 7 cm.

50 A 1 m^3 de suelo, homogenizado, a continuación se le añade una composición constituida por:

- a) $0,2\text{ m}^3$ de compost vegetal con un tamaño en el intervalo de 1,5 a 6 cm que tiene un índice de respiración de 620, y
- 55 b) 1000 ml de un caldo de cultivo, con un contenido en biomasa celular de 32 g/l, de microorganismos aislados del suelo contaminado y crecidos en un cultivo líquido que contiene 100 ppm de hidrocarburos de petróleo.

60 Después de una homogenización cuidadosa, el material se pone en una pila (biopila) en un entorno con una temperatura entre 15°C y 18°C y se airea mediante volteos mecánicos cada 10 días.

El experimento tuvo una duración total de 45 días.

Como control, se mantuvo una pila que sólo contenía suelo contaminado en paralelo a la biopila tratada.

65 Simultáneamente con cada volteo, tanto la biopila tratada como la pila control se humidificaron con la misma cantidad de agua con el objetivo de asegurar un buen grado de humedad.

ES 2 305 367 T3

El análisis del contenido medio en hidrocarburos llevado a cabo sobre muestras extraídas a tiempo cero y después de 45 días ha dado los resultados presentados en la Tabla I:

TABLA I

ppm en referencia a la sustancia seca				
Días	Hidrocarburos totales		Alquilbencenos	
	Pila control	Biopila tratada	Pila control	Biopila tratada
0	1600	1519	1285	1205
45	1238	70	1010	52

Ejemplo 2

1 m³ de suelo contaminado procedente del Ejemplo 1 se añadió en 1,5 veces a la cantidad de la composición usada en el Ejemplo 1.

Como control, se mantuvo una pila de 1 m³ de suelo contaminado al cual se le había añadido una disolución acuosa que contenía micronutrientes en paralelo a la biopila tratada.

Los resultados obtenidos después de 50 días se presentan en la Tabla II:

TABLA II

ppm en referencia a la sustancia seca		
Días	Hidrocarburos totales	
	Pila control	Biopila tratada
0	1550	1475
50	1190	10

Ejemplo 3

Una muestra de suelo contaminado con una mezcla de metanol y n-butanol en una relación de 30/60 con un nivel de contaminación del orden de 1800 ppm en referencia a la sustancia seca se mezcló con un 3% en v/v de zeolitas granulares y un 25% en v/v de una composición constituida por:

- a) el compost obtenido del compostaje de residuos vegetales (3 partes) y fangos biológicos (1 parte) con un índice de respiración de 530, y
- b) 1500 ml por m³ de compost de un caldo de cultivo, con un contenido en biomasa de 26 g/l, de microorganismos aislados de un suelo contaminado y crecidos en un cultivo líquido que contiene 150 ppm de una mezcla de metanol y n-butanol 30/60.

A continuación el suelo se puso en una biopila y se mantuvo en las mismas condiciones ambientales del Ejemplo 1.

Después de 120 días se observó una reducción del 90% del contenido en contaminación inicial.

Ejemplo 4

Una muestra de suelo contaminado con isopropanol con un nivel de contaminación del orden de 850 ppm en referencia a la sustancia seca se mezcló con un 3% en v/v de zeolitas granulares y un 25% en v/v de una composición constituida por:

- a) el compost obtenido del compostaje de residuos vegetales (1 parte) y la fracción húmeda de residuos urbanos sólidos separados de manera diferencial (1 parte) y con un índice de respiración de 650, y

ES 2 305 367 T3

- b) 3000 ml por m³ de compost de un caldo de cultivo con un contenido en biomasa de 32 g/l de microorganismos aislados de un suelo contaminado y crecidos en un cultivo líquido que contiene 110 ppm de isopropanol.

5 A continuación el suelo se puso en una biopila y se mantuvo en las mismas condiciones ambientales del Ejemplo 1.

Después de 90 días se observó una reducción del 80% con respecto a los valores de contaminación iniciales.

10 Ejemplo 5

Una muestra de suelo contaminado con 650 ppm, en referencia a la sustancia seca, de una mezcla 1:1 de acetato de butilo y acetona se mezcló con un 10% en v/v de zeolita granular y un 30% en v/v de una composición constituida por:

15

- a) el compost obtenido del compostaje de residuos vegetales, y

- b) 4500 ml por m³ de compost de un caldo de cultivo, con un contenido en biomasa igual a 24 g/l, de microorganismos aislados de un suelo contaminado y crecidos en un cultivo líquido que contiene 50 ppm de una mezcla 1:1 de acetato de butilo y acetona.

20

A continuación el suelo se puso en una biopila y se mantuvo a una temperatura entre 15°C y 18°C, con la insuflación de aire a través de la biopila.

25 Después de 50 días, se observó una reducción del 78% del contaminante con respecto a los valores iniciales.

Ejemplo 6

Una muestra de suelo contaminado con 1200 ppm, en referencia a la sustancia seca, de ácido fenilacético se mezcló con un 30% en v/v de una composición constituida por:

30

- a) el compost obtenido del compostaje de residuos vegetales (3 partes) y estiércol bovino (1 parte) y con un índice de respiración de 700, y

- b) 5000 ml por m³ de compost de un caldo de cultivo, con un contenido en biomasa igual a 35 g/l, de microorganismos aislados de un suelo contaminado y crecidos en un cultivo líquido en presencia de 100 ppm de ácido fenilacético.

35

A continuación el suelo se puso en una biopila y se aireó volteando cada 10 días. Después de 60 días, se observó una reducción del 69% del contenido del contaminante.

40

45

50

55

60

65

ES 2 305 367 T3

REIVINDICACIONES

1. Una composición para la biorremediación de un suelo contaminado por hidrocarburos y/o disolventes y/o compuestos orgánicos que consta esencialmente de:

a) un compost procedente de materiales lignocelulósicos vegetales, de fangos biológicos, de las fracciones húmedas de residuos urbanos sólidos, de estiércol animal o de sus mezclas y que tiene un índice de respiración comprendido entre 500 y 1000;

b) una asociación de bacterias y/o mohos en un caldo de cultivo líquido o en un caldo de cultivo secado sobre un soporte sólido poroso; dichas bacterias y/o mohos que se han aislado de un suelo contaminado con dichos hidrocarburos y/o disolventes y/o compuestos orgánicos y que se han sometido a un proceso de multiplicación y revitalización mediante las siguientes etapas:

A) toma de muestras del suelo en diferentes áreas del emplazamiento contaminado;

B) el aislamiento de las muestras obtenidas en la etapa A) de una asociación de bacterias y/o mohos adaptados y/o inducidos a metabolizar el(los) contaminante(s) que se desea(n) eliminar del emplazamiento contaminado sobre un medio de cultivo de agar que contiene dicho contaminante(s);

C) la revitalización y multiplicación del consorcio de bacterias y/o mohos aislados en la etapa B) por incubación en un cultivo líquido que contiene el(los) contaminante(s) que se desea(n) eliminar del lugar contaminado a una temperatura que abarca entre 20°C y 30°C hasta que se alcanza un contenido en biomasa húmeda comprendido entre 20 y 40 g/l,

por lo que su capacidad proliferativa se activa y su capacidad para metabolizar el(los) contaminante(s) concreto(s) que se desea eliminar del suelo se mantiene(n) y/o se estimula(n),

c) opcionalmente, gránulos minerales de porosidad elevada;

en la que la cantidad de dicho consorcio de bacterias y/o mohos por m³ de dicha composición corresponde a aquella presente en un volumen comprendido entre 1000 y 5000 ml de un caldo de cultivo que contiene entre 20 y 40 g de biomasa húmeda/litro.

2. Una composición según la reivindicación 1 en la que dicho suelo está contaminado por hidrocarburos de petróleo, alcoholes, ácidos orgánicos y sus derivados, cetonas o sus mezclas.

3. Una composición según la reivindicación 2 en la que dicho suelo está contaminado con metanol, isopropanol, n-butanol, ácido fenilacético, acetato de butilo, acetona o sus mezclas.

4. Una composición según las reivindicaciones 1 a 3 en la que dicho consorcio de bacterias y/o mohos procede del suelo que se desea descontaminar.

5. Una composición según las reivindicaciones 1 a 4 en la que dicho abono procede de materiales lignocelulósicos vegetales y/o fangos biológicos.

6. Una composición según las reivindicaciones 1 a 5 en la que dichos gránulos minerales de porosidad elevada (c) se seleccionan entre zeolitas, montmorillonitas y silicatos complejos.

7. Una composición según las reivindicaciones 1 a 6 en la que dicho consorcio de bacterias y/o mohos se absorbe sobre un soporte sólido poroso.

8. Una composición según las reivindicaciones 1-7 en la que las bacterias y/o mohos se obtienen mediante un proceso en el que en la etapa (C) dichos contaminantes están presentes en el medio de cultivo en cantidades que abarcan entre el 5% y el 20% con respecto a los niveles medios de contaminación de las muestras de suelo de la etapa (A).

9. Un procedimiento para la biorremediación de un suelo contaminado por hidrocarburos y/o disolventes y/o compuestos orgánicos que comprende la mezcla de un suelo contaminado con una cantidad comprendida entre el 1% y 50% en v/v de la composición según las reivindicaciones 1 a 8.

10. Un procedimiento según la reivindicación 9 en el que el suelo contaminado se mezcla con una cantidad comprendida entre el 20% y el 30% en v/v de dicha composición.

11. Un procedimiento según la reivindicación 10 que comprende las siguientes etapas:

1) la excavación de los suelos contaminados;

ES 2 305 367 T3

2) la adición al suelo contaminado de una composición según las reivindicaciones 1 a 8 en una cantidad comprendida entre el 1% y el 50% en v/v y la mezcla hasta obtener una masa homogénea;

5 3) la incubación de la mezcla a una temperatura comprendida entre 10°C y 45°C, una tensión de oxígeno de al menos el 2% y una humedad comprendida entre el 20% y el 65% durante un período de tiempo que abarca entre 30 y 180 días.

10 12. Un procedimiento según la reivindicación 11 en el que en la etapa 2) dicha composición se añade en cantidades que abarcan entre el 20% y el 30% en v/v.

13. Un procedimiento según las reivindicaciones 9 a 12 en el que dicho suelo está contaminado con un hidrocarburo de petróleo, metanol, isopropanol, n-butanol, ácido fenilacético, acetato de butilo, acetona o sus mezclas.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65