

Títol del treball:

Estratègies de bioremediació en vessaments massius de petroli: aplicació en un cas hipotètic a Catalunya

Estudiant: Dante Maschio Gastelaars

Grau en Ciències Ambientals

Correu electrònic: dante.maschio@isf.es

Tutor: Xavier Vila Portella

Cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Xavier Vila Portella

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): xavi.vila@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 26 de maig de 2017

1.	Introducció	1
1.1.	El petroli	1
1.1.1.	Naturalesa i composició	1
1.1.2.	Derivats del petroli.....	2
1.1.3.	Components principals i majoritaris	2
1.2.	Vessaments massius de petroli	4
2.	Research objectives and methodology	5
3.	Resultats.....	5
3.1.	La bioremediació del petroli.....	5
3.1.1.	Factors ambientals	6
3.1.2.	Biodisponibilitat, bioestimulació i bioaugment.....	7
3.1.3.	Microorganismes i processos biològics de biodegradació	7
3.1.4.	Bioremediació en el medi marí	10
3.1.5.	Bioremediació en sòls i aigües subterrànies	11
3.2.	Estratègies de bioremediació aplicades a casos reals.....	12
3.2.1.	Exxon Valdez, Canadà.....	12
3.2.2.	Prestige, Espanya.....	15
3.2.3.	BP Deepwater Horizon, Estats Units d'Amèrica	18
3.2.4.	Delta del Níger, Nigèria	21
4.	Discussions	22
4.1.	Discussions generals.....	22
4.2.	Propostes per a un cas hipotètic de vessament de petroli a Catalunya	24
4.2.1.	Proposta de protocol proactiu	25
4.3.	Consideracions finals.....	27
5.	Conclusions.....	27
	Bibliografia.....	28

Abstract

Bioremediation is an efficient technique to restore areas which have been contaminated by large oil spills. This method bases on the ability of microorganisms to oxidize the main oil compounds; hydrocarbons. While it is not a definitive solution, bioremediation allows us to some extent find an affordable balance between human beings and the environment.

The goal of this study is to determine which bioremediation strategies could be applied in Catalonia in the hypothetical case of a large oil spill. The methodology of this research work consists of a primary research of literature sources based on general aspects of bioremediation and also the strategies applied in real oil spills.

The effectiveness of bioremediation depends both on abiotic and biotic factors and its results differ in a maritime and soil environments. Biotic factors are made up by the presence of hydrocarbon degrading microorganisms. On the other hand, abiotic factors are constituted, by environmental parameters regarding bioavailability and oxidation of pollutants, temperature, pH and redox potential. The main challenge to bioremediation in oceans and seas is the dynamics of the water. In contrast, in soil environments, the matrix heterogeneity and porosity are the most prevalent challenges.

The efficacy of bioremediation is dependent upon the chemical composition of the oil. In the case of the Gulf of Mexico accident, with a lighter oil, the bioremediation rate was higher than in the case of heavier oils such as Exxon Valdez and Prestige. Weather conditions also affects bioremediation and destination of pollutants. Through supporting case studies, this paper will conclude that bioaugmentation is not a useful strategy and less frequent, whereas, biostimulation from fertilizers and dispersants can significantly improve bioremediation of oil.

The characteristics of the Mediterranean climate and sea suggest that the implementation of bioremediation would be quick and efficient in the case of an oil spill in Catalonia. The strategy would be based on biostimulation with dispersants and fertilizers, discarding bioaugmentation. Finally, the low-scale application of ex situ bioremediation techniques and the lack of strategies that address the real needs of large oil spills would require the drafting of a proactive procedure proposal able to manage an oil pollution accident in Catalonia.

Resum

La bioremediació és una eina eficient per dur a terme la restauració d'espais contaminats per vessaments massius de petroli. Es basa en la capacitat dels microorganismes de metabolitzar la matèria orgànica del petroli: els hidrocarburs. Tot i que no és una solució que ataca l'arrel del problema, permet conciliar en certa mesura la relació de l'ésser humà amb la natura d'un mode econòmicament viable.

L'objectiu d'aquest treball consisteix en determinar quines estratègies de bioremediació es podrien aplicar a Catalunya davant d'un hipotètic cas de vessament massiu de petroli. La metodologia d'aquest treball es basa en una recerca bibliogràfica sobre informació general de bioremediació i estratègies aplicades en vessaments reals de petroli.

L'eficàcia de la bioremediació depèn de factors biòtics i abiòtics, i difereix en el medi marí i en els sòls. Els factors biòtics són la presència de microorganismes degradadors d'hidrocarburs, mentre que els abiòtics són els paràmetres ambientals que afecten a la biodisponibilitat i biodegradació dels contaminants, com la temperatura, el pH i el potencial redox. En oceans i mars la dificultat ve donada per la dinàmica de les aigües, mentre que en sòls per la heterogeneïtat de la matriu i la seva porositat.

La bioremediació del petroli depèn de la seva composició química. Petrolis més lleugers com el de l'accident del Golf de Mèxic afavoreixen la bioremediació en comparació amb els petrolis pesants com el del Prestige o Exxon Valdez. Les condicions climàtiques també afecten a la bioremediació i destí dels contaminants. Amb els casos analitzats es conclou que la bioaugmentació no és una estratègia útil ni freqüent, mentre que la bioestimulació a partir de fertilitzants i dispersants pot afavorir significativament la bioremediació del petroli.

Les característiques del clima i mar Mediterrani suggereixen que la bioremediació seria ràpida i eficient davant d'un vessament de petroli a Catalunya. Les estratègies es basarien en la bioestimulació amb dispersants i fertilitzants, descartant la bioaugmentació. Per últim, la poca aplicació a escala real de les tècniques *ex situ* de bioremediació i la inexistència d'estratègies que atenguin a les necessitats reals dels vessaments massius de petroli, porten a elaborar una proposta de protocol proactiu per actuar de manera eficient i sostenible en cas d'accident per contaminació de petroli a Catalunya.

Resumen

La biorremediación es una herramienta eficiente para restaurar espacios contaminados por vertidos masivos de petróleo. Se basa en la capacidad de los microorganismos de metabolizar la materia orgánica del petróleo: los hidrocarburos. A pesar de no ser una solución que ataque la raíz del problema, permite conciliar en cierto modo la relación del ser humano con la naturaleza de un modo económicamente viable.

El objetivo de este trabajo consiste en determinar qué estrategias de biorremediación se podrían aplicar en Cataluña ante un hipotético caso de vertido masivo de petróleo. La metodología de este trabajo se basa en una investigación bibliográfica sobre información general de biorremediación y estrategias aplicadas a vertidos reales de petróleo.

La eficacia de la biorremediación depende de factores bióticos y abióticos, que difieren en el medio marino y los suelos. Los factores bióticos son la presencia de microorganismos degradadores de hidrocarburos, mientras que los abióticos son los parámetros ambientales que afectan la disponibilidad y la biodegradación de los contaminantes, como la temperatura, el pH y el potencial redox. En océanos y mares la dificultad viene dada por la dinámica de las aguas, mientras que en los suelos, por la heterogeneidad de la matriz y su porosidad.

La biorremediación del petróleo depende de su composición química. Petróleos más ligeros como el del accidente del Golfo de México favorecen la biorremediación en comparación a los petróleos pesados como el del Prestige o Exxon Valdez. Las condiciones climáticas también afectan a la biorremediación y el destino de los contaminantes. Con los casos analizados se concluye que la bioaumentación no es una estrategia útil ni frecuente, mientras que la bioestimulación a partir de fertilizantes y dispersantes puede favorecer significativamente la biorremediación del petróleo.

Las características del clima y mar Mediterráneo sugieren que la biorremediación sería rápida y eficiente ante un vertido de petróleo en Cataluña. Las estrategias se basarían en la bioestimulación con dispersantes y fertilizantes, descartando la bioaumentación. Por último, la poca aplicación a escala real de las técnicas *ex situ* de biorremediación y la existencia de estrategias que atiendan las necesidades reales de los vertidos masivos de petróleo llevan a elaborar una propuesta de protocolo proactivo para actuar de manera eficiente y sostenible en caso de accidente por contaminación de petróleo en Cataluña.

1. Introducció

El 2016 el consum mundial de petroli va augmentar 1,9 milions de barrils per dia (British Petroleum p.l.c., 2016). Ens agradi o no, el sistema energètic actual encara es basa en els **combustibles fòssils**. El poder energètic d'aquestes fonts ha permès, des de la revolució industrial, l'avenç tecnològic que ens caracteritza com a societat moderna. No obstant això, les conseqüències d'aquest desenvolupament sempre esdevenen problemes mediambientals. Segons els interessos econòmics i polítics, en algunes ocasions, tard o d'hora, aquests problemes s'intentaran solucionar. Una de les eines aplicades a solucionar els problemes de contaminació és la **bioremediació**. A diferència dels tractaments biotecnològics dels residus industrials i urbans, la bioremediació actua un cop els contaminants arriben a l'ambient. Es basa en la utilització de processos biològics per remeiar la contaminació introduïda al medi per les activitats extractives, industrials i qualsevol altre activitat antropogènica que introdueixi contaminants. La bioremediació, doncs, permet afrontar la restauració de manera viable i econòmicament competitiva, essent la tècnica de remediació més barata de totes (Philp, Bamforth, Singleaton i Atlas, 2005). La majoria dels processos de bioremediació es basen en els **microorganismes**, els quals presenten un seguit d'avantatges (Bordons i Constantí, 1999):

- Existeixen molts tipus diferents de microorganismes. Presenten tots els metabolismes que es coneixen al planeta Terra.
- Són de creixement ràpid, de tipus exponencial en els unicel·lulars com bacteris i llevats.
- Molts es reproduïxen fàcilment en substrats econòmics i poden realitzar reaccions interessants des del punt de vista industrial en condicions ambientals suaus.

Les principals estratègies per afavorir la bioremediació es basen en la **bioaugmentació i bioestimulació**. La primera consisteix en afegir poblacions de microorganismes que metabolitzen els components del petroli, majoritàriament a partir de soques industrials d'alt rendiment (Bordons i Constantí, 1999). La segona estratègia consisteix en incidir sobre les condicions ambientals de les poblacions autòctones, amb l'objectiu de beneficiar-les. Aquesta última és més eficient en la majoria de casos, ja que s'evita la competència i el seguit de factors poc controlables de la bioaugmentació, que cultiva microorganismes amb condicions ambientals diferents a les del medi on s'inoculen (Baldrian, 2008).

Són moltes les fonts emissores de petroli al medi, tals com el transport, vessaments urbans, filtracions naturals, aigües residuals, refineries, etc. Aquest treball es basa en la bioremediació de **vessaments massius de petroli**, que representen menys del 5% del total de fonts emissores (Bordons i Constantí, 1999). Tanmateix, les estratègies de bioremediació només són factibles en vessaments massius o regions localitzades, per la mera incapacitat humana de controlar la infinitat de diferents punts emissors i la dispersió de la contaminació. En els casos de contaminació difusa només queda confiar en les accions preventives que, a través de l'educació ambiental, la societat ha d'adquirir.

1.1. El petroli

1.1.1. Naturalesa i composició

El petroli és un recurs natural no renovable, que es troba en forma de líquid negre i viscos de composició complexa. Com a combustible és la principal font d'energia primària al món (Bulon, 2013). La composició del petroli és diferent en funció del lloc d'extracció i del tractament que se li aplica (Kenney, Kutcherov, Bendeliani i Alekseev, 2002). Els composts orgànics predominants del petroli són els hidrocarburs, que es poden classificar en dos grups: els alifàtics i aromàtics. Dintre dels alifàtics, que poden arribar fins a 60 unitats de carboni, hi predominen els alcans i cicloalcans, seguit dels alquens i alquins (Lladó, 2012). Els aromàtics són els compostos que presenten un o més anells benzoics (Araqués i Fontcuberta, 2006), essent monocíclics els que en presenten un i policíclics els de dos o més.

El petroli també està format per altres compostos de diferent polaritat que es poden classificar en 6 categories segons Botello (2005):

- **Compostos amb sofre:** acostumen a representar l'1% de la composició total del petroli.
- **Compostos amb nitrogen:** en forma bàsica i forma no bàsica.
- **Porfirines:** compostos formats per complexos organometàl·lics que contenen nitrogen procedent de la clorofil·la.
- **Compostos amb oxigen:** poden representar el 2% de la composició total del petroli. Compostos tals com el fenol, cetones, èters i altres.
- **Asfaltens:** poden representar el 20% de la composició total del petroli (figura 1). Són compostos d'elevat pes molecular que formen la part més sòlida del petroli, ja que no es dissolen en solvents alifàtics.
- **Metalls pesants:** els més abundants són el níquel i el vanadi, que es poden trobar tant en forma lliure com formant complexos orgànics.

1.1.2. Derivats del petroli.

La qualitat del petroli és funció de les característiques dels seus components. Per obtenir els productes desitjats del petroli es realitzen diferents destil·lacions fraccionades, i altres tractaments que s'inclouen en el procés de refinatge. D'aquesta manera, en funció de les normatives tècniques i ambientals, s'obtenen els productes següents del petroli cru (Institut Català de l'Energia, s.d):

- **Productes gasosos:** gasos de refinaria (hidrogen, metà i età) i gasos líquids de petroli (propà i butà). Presenten una temperatura d'ebullició màxima de 0°C.
- **Productes lleugers:** productes tals com la gasolina i les naftes. Punt d'ebullició entre 150 i 300°C, amb cadenes de 4 a 12 àtoms de carboni. Entre aquests productes, els BTEX (benzè, toluè, etilbenzè i xilè) generen una preocupació mediambiental important deguda a la seva toxicitat i relativa elevada solubilitat en l'aigua (Lladó, 2012).
- **Productes intermedis:** productes tals com el querosè i el gasoil, on abunden els cicloalcans. Punt d'ebullició entre 150 i 300°C, i 175 a 400°C respectivament, amb cadenes de 12 a 18 àtoms de carboni.
- **Productes pesants:** productes tals com el fueloil, olis minerals, ceres, asfalts, coc de petroli i creosota, amb diverses aplicacions pràctiques. Depenent del compost, hi abunden els cicloalcans, alcans alifàtics o aromàtics.

Conèixer les diferències entre els hidrocarburs que formen part del petroli és imprescindible per entendre el seu destí ambiental i preveure la dificultat que implicaran els processos de bioremediació (Keith, 2014).

1.1.3. Components principals i majoritaris

Els compostos alifàtics saturats de cadena recta, ramificada o cíclics, són els més abundants del petroli (Zhao, Hong, Fan, Wen i Han, 2014). De tots els compostos del cru es dona èmfasi als alcans i als hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs). Al primer grup se li atribueix gran abundància en la composició del petroli, coneixement científic i analogia amb altres alifàtics sobre els mecanismes de la seva biodegradació. Els PAHs, d'altra banda, són d'especial interès pel seu potencial carcinogen i mutagènic (Araqués i Fontcuberta, 2006). A la figura 1 es poden veure alguns compostos dels grups principals del petroli.

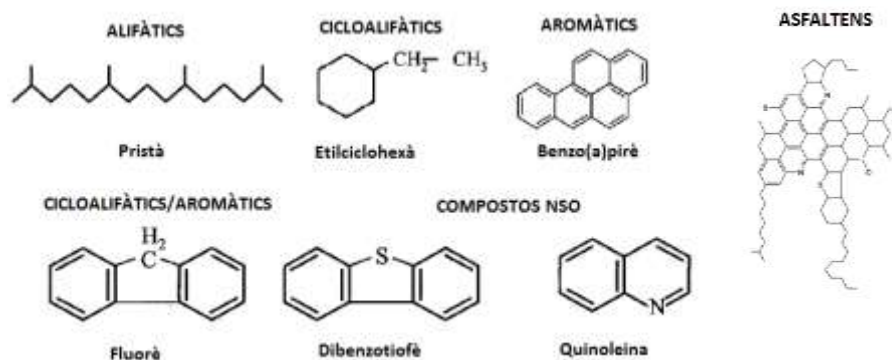


Figura 1. Alguns exemples de compostos que formen part dels grups principals del petroli.

1.1.3.1. Els alcans

Com a norma general, els alcans són compostos menys densos que l'aigua i insolubles en dissolvents polars (Botello, 2005). En general els alcans no es consideren tòxics. No obstant això, els compostos de baix pes molecular poden causar danys per inhalació i acció com a dissolvents (Lladó, 2012). Els d'elevat pes molecular són més resistents a la biodegradació que els de baix pes molecular. Tanmateix, la gran majoria són biodegradables o degradables per mecanismes fisicoquímics (Prince i Atlas, 2005).

1.1.3.2. Els PAHs

Els PAHs són compostos del grup d'hidrocarburs aromàtics amb absència de grups funcionals, i sovint amb substituïts metil o cadenes llargues tipus alquil (Araqués i Fontcuberta, 2006). Poden contenir nitrogen, sofre o oxigen, i són els compostos més tòxics dels hidrocarburs i els més abundants dintre dels aromàtics. Els orígens més destacats són la piròlisi de la matèria orgànica a altes temperatures i la petrogènesis (Menzie, Protoccki i Santodonato, 1992). Existeixen diverses fonts naturals emissores de PAHs, però les més freqüents i importants són les antropogèniques tals com processos de refinatge i crema de combustibles fòssils, entre d'altres (Araqués i Fontcuberta, 2006). Dels milers de PAHs hipotètics existents, s'han identificat i estudiat un centenar (Araqués i Fontcuberta, 2006).

Els PAHs presenten major polaritat que els hidrocarburs alifàtics d'elevat pes molecular, però com a norma general són compostos de baixa solubilitat. No obstant això, els PAHs de pocs anells són força solubles en aigua (Lladó, 2012). Una altra característica que els defineix és la gran estabilitat molecular que presenten, a causa de la presència d'anells benzoics, que els fa força inerts (Botello, 2005).

1.1.3.2.1. Toxicitat

Els PAHs són molècules d'especial interès perquè són liposolubles i tòxiques per inhalació, contacte o ingestió (Keith, 2014). Poden causar desordres en la pell, problemes respiratoris, afectació a la sang i fetge, i toxicitat reproductiva (Araqués i Fontcuberta, 2006). Una altra propietat característica dels PAHs és la recalcitrància, que conjuntament amb la liposolubilitat permet la bioacumulació i biomagnificació d'aquests compostos en els teixits greixosos animals. L'acumulació dels PAHs en animals depèn de la capacitat de metabolitzar-los (Zhao et al., 2014). Els de major pes molecular presenten potencial carcinogen i mutagènic. Per aquest seguit d'afectacions al medi ambient i la salut pública, el 1979 la EPA va elaborar una llistat de 16 PAHs que es consideren contaminants d'investigació prioritària. A partir d'aquest moment, i fins a dia d'avui, la majoria d'anàlisis de contaminació per compostos aromàtics policíclics es basa en aquest llistat prioritari (Keith, 2014; US-Environmental Protection Agency, 2009). Aquest llistat presenta avantatges tals com la simplificació i rapidesa d'anàlisi, coneixement científic integrat amb el temps, capacitat

d'investigació focalitzada, creació de lleis que estableixen nivells límit i gran representació industrial. Avui, però, existeixen molts més PAHs i l'avenç científic els permet identificar cada vegada amb més facilitat (Andersson i Achten, 2015). En algunes mostres de petroli la llista prioritària només representa del 5 al 20% del total de PAHs analitzant un total de 40. També s'ha comprovat que hi ha PAHs 10 o 20 vegades més tòxics que el benzo(a)pirè, al qual se li assigna el valor de 1, com els dibenzopirens, benzo(c)fluorè i certs PAHs amb grups alquil (Andersson i Achten, 2015; Meyer et al., 2013). Així doncs, cal considerar aquests compostos esmentats, d'igual manera que els heterocíclics i els PAHs amb heteroàtoms i substituïts (tal com es cita a Andersson i Achten, 2015). És evident que la gran quantitat de derivats i isòmers possibles dificulta el procés de caracterització. No obstant això, tan la millora de les tècniques analítiques com la investigació de les propietats fisicoquímiques dels compostos aromàtics policíclics i els seus derivats han de prosperar (Keith, 2014).

1.1.3.2.2. Marc legal

La directiva 2000/60/CE, de 23 d'octubre, estableix quins són els hidrocarburs que s'han d'analitzar i en quin règim. La normativa nacional referent a la contaminació per hidrocarburs es basa en la llei 22/2011, de 28 de juliol, de residus i sòls contaminats, i la gestió directa recau sobre les comunitats autònomes. A Catalunya es pot trobar informació relativa a la gestió dels hidrocarburs com a contaminants a l'Agència Catalana de Residus (ACR) i l'Agència Catalana de l'Aigua (ACA).

Pel que fa a l'atmosfera, al Real Decret 102/2011 de 28 de gener, relatiu a la millora de la qualitat de l'aire, s'estableix, entre altres regulacions, que a partir de la determinació de la fracció de partícules PM₁₀, el nivell mitjà anual de benzo(a)pirè no pot superar els 0,6 ng/m³ en l'aire. En quant a masses d'aigua, al RD 60/2011, de 21 de gener, sobre les normes de qualitat ambiental en l'àmbit de la política d'aigua, s'estableix que les Normatives de Qualitat Ambiental (NCA) s'apliquen a la concentració total de tots els isòmers. També indica el valor límit per als següents hidrocarburs (essencialment PAHs) en aigües continentals: antracè, benzè, naftalè, benzo(a)pirè, benzo(g,h,i)perilè, indeno(1,2,3-cd)pirè i fluorantè. Pel que fa al sòl, el RD 9/2005 de 14 de gener, dona molta més informació en comparació amb la legislació pel medi aquàtic, relativa a les concentracions màximes permeses de la majoria dels 16 PAHs. També informa sobre la concentració màxima que hi hauria d'haver en els organismes del sòl. Aquest RD considera que un sòl està contaminat quan excedeix dels 50 mg/Kg d'hidrocarburs totals.

1.2. Vessaments massius de petroli

La dependència dels combustibles fòssils suposa un risc tant per la seguretat com per la garantia de subministrament, exercint pressions mediambientals degut al gran trànsit mundial i la neoliberalització del sector. El transport marítim és fonamental per l'actual economia del planeta. El 90% del comerç mundial es transporta per mar, i és de lluny el model més eficient en funció dels costos del transport de mercaderies i matèries primeres en grans quantitats a tot el món (Abenchara i Castro, 2015). El risc d'accident no només es focalitza en els vaixells que transporten petroli, sinó en totes les activitats que tinguin a veure amb l'extracció i processament de petroli. No obstant això, l'entramat de xarxes mundials de transport marítim suposa el major risc d'accident possible. Així doncs, la normativa internacional, nacional, i els òrgans d'actuació es focalitzen en aquest tipus de transport (Bulon, 2003).

A la declaració de Barcelona de 1921, la llibertat de navegació en alta mar fou un principi inclòs en el dret internacional públic. Tot i això, l'augment del tràfic i els accidents marítims han portat als estats a limitar aquestes llibertats. El 1948 es va crear la Organització Marítima Internacional (IMO), organisme de les Nacions Unides fundat per adoptar mesures per la millora de la seguretat del transport marítim

internacional i prevenir la contaminació dels mars. La IMO té la funció d'actualitzar la legislació i vetllar pel compliment dels seus convenis (International Maritime Organization, 2016).

Les costes més perilloses com les gallegues, les franceses i les angleses, adopten normes pròpies per combatre els accidents, basades en potents remolcadors situats en punts estratègics. Tot i això, les directrius promouen la cooperació dels estats per fer front a l'incompliment de la normativa internacional i nacional, i revisar certificats, registres i altres documents obligatoris que acostumen a ser poc transparents (Bulon, 2003). Avui en dia el capità d'un petrolier no té el control absolut del vaixell. Com a treballador a sou d'un armador, al capità se li confien de forma provisional interessos financers considerables, però la seva protecció laboral no està a expenses de la seva voluntat, ja que ha de rendir comptes a l'armador. Per aquest motiu la principal prioritat dels capitans són els empresaris per als qui treballa, i mai prenen decisions que impliquin despeses per l'empresa abans de rebre autorització. Aquesta pràctica moderna, sumada al buit legal associat a les grans transnacionals petroleres, creen un context de risc molt elevat (Bulon, 2003). En efecte, les directius europees animen als estats membres a ratificar els convenis internacionals, sobretot aquells consensuats per la OMI. Es vol establir una política comuna de seguretat marítima, instaurant polítiques que millorin la seguretat dels vaixells, tripulacions, peatges i reducció activa de la contaminació.

Espanya és un dels països capdavanters en quant a legislació i normativa de seguretat marítima, pels diversos accidents ocorreguts a Galícia i les illes Canàries. El 1992 el Govern Espanyol creà la SASE-MAR (Sociedad estatal de Salvamento Marítimo) per garantir la protecció i assistència als vaixells amb dificultat en tot el litoral (Abenchara i Castro, 2015). El punt de referència de la normativa espanyola es basa en la Llei de Ports de l'estat, 27/1992 de 24 de novembre, modificada per la Llei 62/97 de 26 de desembre, i la Llei 41/2010 de Protecció del Medi Marí. Hi ha una extensa llista de lleis, RD i ordres ministerials que dictaminen l'actuació nacional en quant a seguretat i contaminació marina.

2. Research objectives and methodology

The ultimate objective of this research is to determine what bioremediation strategies could be applied in the hypothetical case of a large oil spill in Catalonia. This will be achieved through analysing various real-life situations in which bioremediation has been used to restore polluted environments from large oil spills. By drawing from both the extensive literature on this biotechnological tool generated from the 90s onwards, and the numerous associated tanker accidents, we will be able to critique the application of bioremediation in different real-life situations, and thus, critically assess its viability for application in Catalonia.

The methodology of this research work begins with primary research of literature sources based on general aspects of petroleum hydrocarbons bioremediation in both aqueous and solid matrices. It follows with secondary research of specific cases of large oil spills in which bioremediation has been applied or studied. To carry out this task scientific articles have been consulted, using innovation, prestige and consistency of information as a search filter. Finally, all this information has been synthesized to make it possible to analyze and achieve the research objective.

3. Resultats

3.1. La bioremediació del petroli

Existeixen diferents estratègies de transformació del petroli: volatilització, foto-oxidació, oxidació química, adsorció, bioacumulació, sedimentació i bioremediació (Peláez et al., 2013; Bordons i Constantí, 1999).

Aquesta última ofereix la millor solució per restaurar ambients, tenint en compte el cost econòmic i el temps, factors claus a l'hora d'actuar vers els vessaments massius de petroli.

Un factor que determina la susceptibilitat d'un compost orgànic a l'atac microbià és el temps que porta al planeta Terra i si és natural o no (Bordons i Constantí, 1999). Com els hidrocarburs del petroli porten milers d'anys confinats sota terra, quan entren en contacte amb l'aire i/o humitat, es poden biodegradar gràcies a l'acció dels microorganismes heteròtrofs (Madigan, Martinko, Dunlap i Clark, 2009). Perquè això sigui possible cal que els contaminants estiguin biodisponibles i que un seguit de factors ambientals beneficiïn la oxidació dels components del petroli. Per aquest motiu, la majoria de vegades les estratègies de bioremediació passen per afavorir tant la biodisponibilitat com els factors ambientals.

3.1.1. Factors ambientals

3.1.1.1. El paper de l'oxigen

En condicions aeròbies el rendiment de la bioremediació és major a causa de la importància de l'oxigen com a acceptor final d'electrons (potencial redox molt gran) i el paper clau de les oxigenases en el catabolisme d'hidrocarburs (Lu, Zhang i Fang, 2011; Prince i Atlas, 2005). L'oxigen genera el major gradient de protons possible, i conseqüentment a una major síntesi d'ATP (Madigan et al, 2009). I també actua com a reactiu oxidant per als enzims oxigenases, que catalitzen la incorporació d'àtoms d'oxigen als compostos orgànics. Hi ha dos tipus d'oxigenases: les monooxigenases i dioxigenases. Les primeres catalitzen reaccions de molts hidrocarburs alifàtics, incorporant un àtom d'oxigen normalment al metil terminal, transformant-lo a hidroxil, mentre que l'altre àtom d'oxigen es redueix a aigua (Madigan et al., 2009). Les dioxigenases, en canvi, incorporen tots dos àtoms d'oxigen i s'encarreguen principalment de catalitzar el catabolisme dels aromàtics (Philp et al., 2005).

3.1.1.2. Altres factors ambientals

Per mineralitzar els components orgànics del petroli i fer de la bioremediació un procés eficient, cal conèixer i controlar un seguit de paràmetres (King, Long i Sheldon, 1997).

- 1- **Temperatura.** Cada població de microorganismes tolera un rang de temperatures diferent. Tot i això, molts autors descriuen que les temperatures mesofíliques, al voltant de 20°C, són òptimes per als processos de bioremediació (Csuros, C., i Csuros, M., 1999).
- 2- **pH.** El pH òptim dels microorganismes que oxiden els hidrocarburs es troba entre 6 i 8, segons Madigan i col·laboradors (2009).
- 3- **Potencial redox.** Segons el valor del potencial redox del medi hi haurà disponibilitat d'uns acceptors d'electrons o uns altres, que permetran oxidar els hidrocarburs amb major o menor conservació d'energia. En metabolismes anaerobis o anòxics, per exemple, la oxidació es veu limitada pels baixos valors del potencial redox (Madigan et al., 2009).
- 4- **Salinitat i pressió.** En ambients hipersalins la biodegradació és menor perquè la permeabilitat de les membranes cel·lulars és menor (Bordons i Constantí, 1999). A més pressió, la biodegradació també és menor.
- 5- **Nutrients inorgànics.** La contaminació per hidrocarburs afegeix grans quantitats de carboni al medi, desequilibrant la relació C:N:P i limitant la presència de nitrogen i fòsfor. També s'han de tenir en compte altres nutrients inorgànics, i elements oligo-essencials. La competència amb els altres degradadors de matèria orgànica i fotosintetitzadors també influeix sobre la disponibilitat de nutrients (Philp i Atlas, 2005)

3.1.2. Biodisponibilitat, bioestimulació i bioaugment

Perquè la bioremediació sigui eficient, cal que els contaminants estiguin disponibles per als microorganismes. La naturalesa poc soluble dels hidrocarburs en aigua i les diferents interaccions fisicoquímiques dels components del petroli amb la matriu ambiental fan de la biodisponibilitat un factor limitant de la bioremediació (Prince i Atlas, 2005). Mesurar la partició dels contaminants és un bon mètode per estudiar la biodisponibilitat, ja que descriu la tendència dels contaminants a existir en equilibri en les diferents fases possibles (Philp i Atlas, 2005). És útil, doncs, conèixer la pressió vapor, el coeficient de Henry i el coeficient de partició octanol-aigua en els components del petroli.

En contraposició a l'atenuació natural, les estratègies de bioestimulació pretenen solucionar les limitacions naturals. Com la bioremediació es dona en el medi aquós i gran part del petroli és insoluble, una estratègia freqüent consisteix en utilitzar biosurfactants o dispersants (Philp i Atlas, 2005). Aquests agents industrials imiten els mecanismes naturals d'espècies com *Alcanivorax borkumensis*, bacteri especialista en el catabolisme d'hidrocarburs, que sintetitza glucolípid tensioactius (Madigan et al, 2009). Els gèneres *Alcanivorax*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* i *Corynebacterium* s'han descrit capaços d'alliberar agents glucolípid, lipopèptids i heteropolisacàrids, components dels quals la part apolar té afinitat amb els hidrocarburs i la polar amb la fase aquosa (Haristash i Kaushik, 2016; Prince i Atlas, 2005). Mitjançant aquest mecanisme deformen i redueixen la tensió superficial fins formar emulsions amb major superfície de contacte entre les dues fases, per donar lloc a la biodegradació i solubilització (Haristash i Kaushik, 2016). Els biosurfactants industrials, a més a més, tenen l'afegit d'ésser biodegradables i útils en diverses condicions fisicoquímiques. Tot i això, no influeixen significativament en la degradació dels PAHs, ja que s'han fabricat per respondre a la baixa solubilitat dels alcans (tal com es cita a Prince i Atlas, 2005).

Una altra estratègia per bioestimar la bioremediació és l'addició de nutrients, per compensar la proporció C:N:P (Madigan et al., 2009; Philp i Atlas, 2005). Per últim, i com a estratègia menys aplicada, hi ha la bioaugmentació. Tot i que no és una estratègia apreciada, pot resultar útil en ambients amb condicions climàtiques extremes o davant de compostos molt recalcitrants. Si es decideix dur-la a terme, s'ha de prioritzar l'augment de la diversitat genètica i la introducció d'inòculs extrets del mateix ambient, si és possible, o bé la utilització de consorcis microbians coneguts. Els inòculs aconseguits moltes vegades no sobreviuen perquè creixen amb més substrat del que després es troben al medi, o bé perquè no es té en compte la presència de co-contaminants i les relacions de competència (Prince i Atlas, 2005).

3.1.3. Microorganismes i processos biològics de biodegradació

La bioremediació dels components del petroli es relaciona majoritàriament als procariotes i als fongs, tot i que també s'han descrit cianobacteris, algues i plantes superiors (Lu et al., 2011; Madigan et al., 2009; Philp i Atlas, 2005). Els bacteris són el domini més estudiat, amb gran representació dels bacteris quimioorganòtrofs gramnegatius, i sobretot del filum *Proteobacteria* com a microorganismes bioremediadors del petroli. En els millors dels casos, els bacteris poden oxidar fins al 80% dels components del petroli passat un any (Madigan et al., 2009).

En la bioremediació té molta importància el cometabolisme i el sintrofisme (Madigan et al., 2009; Prince i Atlas, 2005; Bordons i Constantí, 1999). Quan els hidrocarburs no es poden usar com a font d'energia i carboni, i hi ha presència d'altres substrats que actuen com a font d'energia primària, aquests es poden degradar parcial o totalment a través del cometabolisme. És un procés que afavoreix la biodegradació, però genera metabòlits parcials els quals s'ha d'avaluar la seva toxicitat (Lors, Ryngaert, Diels, Damidot i Périe, 2010). En les associacions sintròfiques, d'altra banda, és dona la unió de dos o més microorganismes per degradar una substància i conservar energia. Els sintròfics usen els productes de fermentacions primàries,

com l'hidrogen de la fermentació de l'etanol, que és útil per la metanogènesi, per exemple (Madigal et al., 2009). A diferència del cometabolisme, que es dona en abundància d'oxigen, el sintrofisme és essencial en processos anòxics on l'energia disponible és molt petita (Prince i Atlas, 2005).

En funció de les condicions ambientals hi haurà processos microbiològics i microorganismes implicats diferents. Els metabolismes aerobis són importants per l'elevada taxa de biodegradació que presenten, però els anaerobis són essencials en regions on la presència d'oxigen o acceptors òxics alternatius és limitada.

3.1.3.1. Condicions aeròbies

3.1.3.1.1. Biodegradació d'hidrocarburs alifàtics

El principal mecanisme microbiològic d'atac als alcans és l'oxidació d'un grup metil terminal a un alcohol primari mitjançant la monooxigenasa (figura 2). Els passos següents consisteixen en canvis moleculars per obtenir substrats com l'acil-CoA, que per la β -oxidació es degrada a acetil-CoA, oxidat posteriorment dins el cicle de Krebs (Madigan et al., 2009).

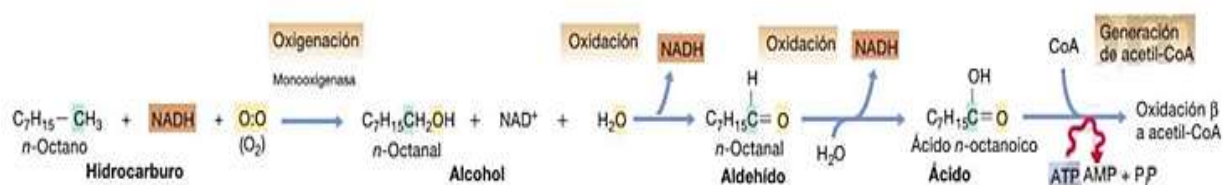


Figura 2. Activitat de la monooxigenasa. Etapes de l'oxidació d'un hidrocarbur alifàtic (Madigan et al., 2009).

Una altra possibilitat de començar la degradació d'alcans és a partir de l'oxidació subterminal, acabant en àcid carboxílic i alcohol. A partir dels àcids grassos també es pot produir la α -oxidació. En tots els casos la molècula resultant final és acetil-CoA, que pot ser incorporat al metabolisme central, via cicle de Krebs o del glicoxilat, acabant en molts casos oxidat a CO_2 (Philp et al., 2005). En quant als alquens, els terminals són fàcilment degradats per molts microorganismes, amb atac al doble enllaç. També poden ser degradats a partir de l'altre extrem metil terminal. Els alquens interns i alquils són normalment hidrolitzats a nivell del doble o triple enllaç, transformant-se en meitat àcid i meitat hidrocarbur (Haritash i Kaushik, 2009).

A les pseudomonadals s'han trobat plasmidis que codifiquen la degradació d'octà i aromàtics com el naftalè, toluè, xilens i altres. S'han creat soques multi-plasmidi que poden induir simultàniament la síntesi d'enzims de diverses rutes metabòliques degradadores, i per tant poden créixer més ràpid en hidrocarburs del petroli (Lladó, 2012). Molts dels gens d'aquests plasmidis es troben en transposons, i per tant la modificació genètica proporciona possibilitats en el camp de la bioremediació. Tot i això, no s'ha explotat prou per la desconexió que tindria la introducció d'organismes genèticament modificats (OMG) al medi (Lladó, 2012; Philp et al., 2005). Cal considerar els criteris ètics i de sostenibilitat que impliquen els OMG.

3.1.3.1.2. Biodegradació d'hidrocarburs aromàtics

El catabolisme dels PAHs s'inicia principalment amb la formació de catecol o un compost relacionat estructuralment amb l'acció dels enzims oxigenases (figura 3). Els compostos de només un anell, com el catecol o protocatecuat, són els anomenats compostos de partida, que posteriorment es poden biodegradar a succinat, acetil-CoA i piruvat (compostos del cicle de Krebs). Alguns dels gèneres més coneguts per la biodegradació de compostos fenòlics són *Pseudomonas*, *Rhodococcus* i *Kurthia* (Lu et al., 2011; Philp et al., 2005). Els compostos de partida estan preparats pel trencament de l'anell aromàtic,

catalitzat per l'acció de les dioxigenases. El trencament dels anells hidroxilats per acció enzimàtica no tenen la necessitat d'unir-se a un cofactor. Això fa que la degradació dels PAHs sigui força ràpida (Lu et al., 2011).

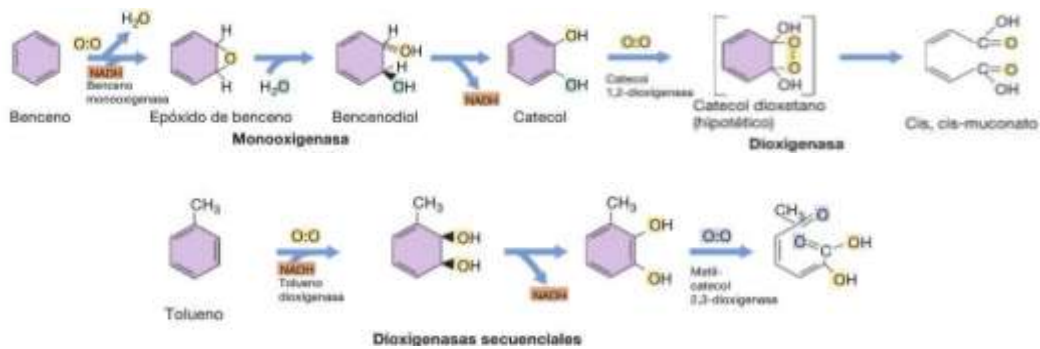


Figura 3. Funcions de les oxigenases en el catabolisme del benzè i toluè (Madigan et al., 2009).

La majoria d'aquestes vies acaben resultant en fenols o difenols que es poden biodegradar mitjançant els sistemes lignolítics de molts fongs, actinomicets, micobacteris i pseudomonas, ja que presenten anells benzoics com la lignina. Així doncs, aquests sistemes poc específics poden biodegradar molts PAHs, tal i com fa el fong *Phanerochaete chrysosporium* (fong de la podridura blanca), que és considerat agent de bioremediació de molècules xenobiòtiques, per l'acció de les seves peroxidases i monooxigenases (Baldrian, 2008). Tanmateix, aquests sistemes lignolítics es poden inhibir amb nivells elevats de nutrients inorgànics (tal i com es cita a Philp i Atlas, 2005).

3.1.3.2. Condicions anaeròbies

La oxidació anaeròbia es dona mitjançant acceptors d'electrons alternatius a l'oxigen, tals com Fe^{3+} , NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , S i CO_2 . Els bacteris que catalitzen aquestes reaccions són els bacteris desnitrificants i els reductors del sofre, i en menor proporció fotòtrofs i organismes fermentatius (Madigan et al, 2009).

3.1.3.2.1. Biodegradació d'hidrocarburs alifàtics

Els hidrocarburs alifàtics saturats de fins a 20 carbonis es biodegraden fàcilment, tot i que com més curtes són les cadenes alifàtiques l'eficiència de la bioremediació és més elevada (Haritash i Kaushik, 2009). El mecanisme de degradació anòxica dels alifàtics s'ha estudiat mitjançant el metabolisme de l'hexà a partir de bacteris desnitrificants. L'hexà s'uneix al fumarat i forma un intermediari que conté àtoms d'oxigen i es pot catabolitzar de forma anaeròbia (figura 4 A). Després d'afegir el coenzim, es produeixen reaccions d'oxidació i regeneració del fumarat.

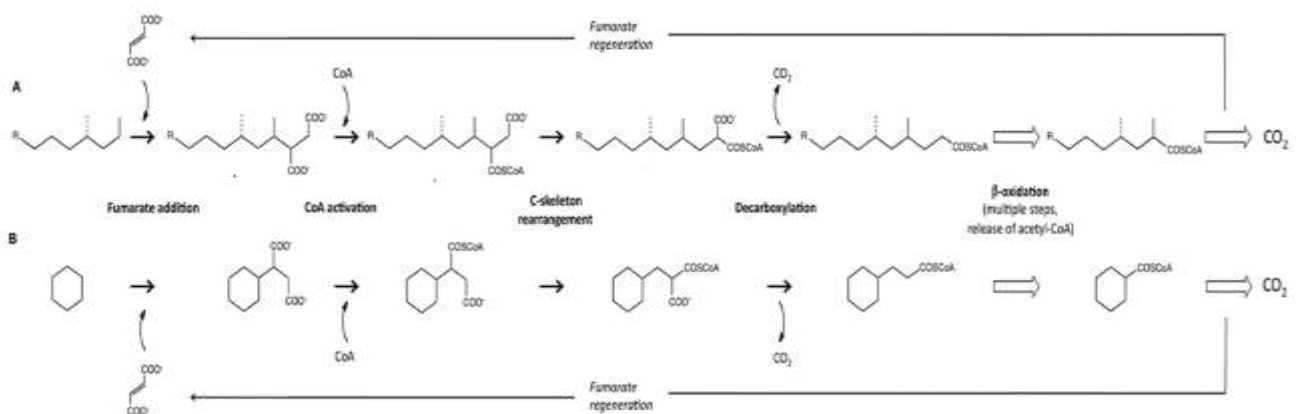


Figura 4. Rutes anaeròbies de la biodegradació (A) d'alifàtics i (B) aromàtics (Agrawal i Gieg, 2013).

3.1.3.2.2. Biodegradació d'hidrocarburs aromàtics

Per el catabolisme anòxic del toluè, molt semblant al del benzè, l'oxigen s'afegeix a partir del fumarat (figura 4 B). Finalment es produeix benzoil-CoA, amb posterior reducció de l'anell alliberant un àcid gras o un àcid dicarboxílic que es poden catabolitzar en intermediaris del cicle de Krebs. En el catabolisme del naftalè, l'addició d'oxigen es produeix gràcies al CO₂, formant un derivat de l'àcid carboxílic.

3.1.4. Bioremediació en el medi marí

El gran desavantatge de la bioremediació en el medi marí ve donat per la dificultat de monitoritzar els paràmetres en un medi tan dinàmic. Quan s'escull la bioremediació com a estratègia de restauració cal caracteritzar els contaminants per elaborar l'estratègia. Tot i la heterogeneïtat del medi marí, és molt difícil calcular la quantitat de petroli que hi ha, el seu destí i els requeriments d'actuació, tals com addició de nutrients i/o dispersants (Prince i Atlas, 2005). Una mesura que pot ajudar a caracteritzar de manera genèrica el petroli és la gravetat específica, que s'utilitza comercialment per classificar el petroli a través del paràmetre *American Petroleum Institute* (API). És una mesura de la densitat que, en comparació amb l'API de 10⁰ graus de l'aigua, permet precisar si un petroli és lleuger o pesant (Beggs i Robinson, 1975). Els components que suren sobre l'aigua tenen índexs API més grans i, generalitzant, són més propensos a la biodegradació.

La major part del petroli d'un vessament es troba a la superfície del mar i a les costes, ja que els hidrocarburs suren damunt l'aigua i poden afectar el litoral a causa dels moviments hidrodinàmics. Tot i les desavantatges citades anteriorment, les condicions aeròbiques s'atribueixen a aquestes zones, i per tant, la bioremediació serà ràpida i possible (Lu et al., 2011). D'altra banda, les fraccions del petroli que s'enfonsen o queden atrapades s'oxidaran majoritàriament per vies anaeròbiques. Aquestes últimes són comunes per biodegradar PAHs de baixa solubilitat, que s'oxiden per l'acció de bacteris reductors del sofre, nitrat, ferro i metanogènics (Madigan et al., 2009). Un altre avantatge del medi marí és la fracció mineral de l'aigua de mar, que forma microagregats amb els components del petroli, potenciant la dispersió i consegüentment la bioremediació (Prince i Atlas, 2005). Aquest fet és beneficiós ja que pot evitar la pavimentació posterior en la costa.

Hi ha tres maneres d'actuar davant dels vessaments massius de petroli al mar: l'atenuació natural, la bioaugmentació i la bioestimulació. Les estratègies més freqüents consisteixen en tècniques *in situ* de bioestimulació, afegint nutrients i/o dispersants (Azubuiké, Chikere, i Okpokwasili, 2016). Les tècniques *ex situ* només són viables en sediments costaners arenosos on l'atenuació natural és molt lenta. Tanmateix, la complexa logística que implica fa que no sigui una estratègia molt freqüent. A la taula 1 es resumeixen les diferents característiques i actuacions típiques en funció de la matriu ambiental.

Taula 1. Principals característiques i estratègies de bioremediació en les diferents matrius ambientals del medi marí. Font: elaboració pròpia.

	Atenuació natural ⁽¹⁾	Aigües obertes	Platges	Aigües estancades
<i>In situ/Ex situ</i>	<i>In situ</i>	<i>In situ</i>	<i>In situ/Ex situ</i> ⁽⁵⁾	<i>In situ</i> ⁽⁷⁾
Limitació d'oxigen	no	No	Sí/no	Sí
Limitació de nutrients	no	Sí ⁽²⁾ /no	Sí ⁽²⁾ /no	Sí ⁽²⁾ /no
Estratègia típica (bioestimulació)	cap	Dispersants ⁽³⁾ i nutrients ⁽⁴⁾	Dispersants ⁽³⁾ , nutrients ⁽⁴⁾ i irrigar ⁽⁶⁾	Dispersants ⁽³⁾ i nutrients ⁽⁴⁾

⁽¹⁾Dóna per suposat que les condicions ambientals no limiten la biodegradació i per tant, la bioremediació és un procés espontani on no cal intervenir.

⁽²⁾S'ha d'anar amb compte amb el perill d'eutrofització, anòxia i toxicitat per elevades concentracions de nitrogen (Gallego et al., 2006).

⁽³⁾Acostumen a ser biodegradables, per activar la biodegradació i evitar contaminació. S'acostuma a afegir del 5 al 10% del volum del petroli (Prince i Atlas, 2005).

⁽⁴⁾Els fertilitzants acostumen a ser oleofílics i d'alliberació lenta. Les corrents d'aigua i onades poden provocar l'efecte del rentat de nutrients. En alguns casos es recomana la utilització d'alternatives d'alliberació ràpida i fórmules més resistents en zones amb elevat hidrodinamisme.

⁽⁵⁾*Ex situ* quan és viable extreure la primera capa arenosa i tractar-la amb tècniques típiques de bioremediació en sòls, o bé portar-la a abocador (Azubuike et al, 2016).

⁽⁶⁾Per proporcionar humitat i oxigen, i evitar la pavimentació del petroli a les roques costaneres (Philp i Atlas, 2005).

⁽⁷⁾La intrusió humana per tractar els sediments *ex situ* pot un gran impacte ambiental sobre els fràgils ecosistemes d'aiguamolls i deltes (Prince i Atlas, 2005).

3.1.5. Bioremediació en sòls i aigües subterrànies

L'estructura heterogènia i la mescla de fases del sòl fan de la bioremediació una eina complexa en quant al disseny i monitorització. Els paràmetres que més influencien són la porositat i la capacitat d'intercanvi catiònic (Azubuike et al, 2016; Philp i Atlas, 2005). La presència de PAHs en el sòl ha de preocupar, ja que són dels hidrocarburs més lleugers que es poden infiltrar i arribar al nivell freàtic (González-Rojas, 2011), augmentant el risc de toxicitat de les aigües subterrànies. En general, els contaminants romanen molt més temps en el sòls que en les aigües obertes (Philp i Atlas, 2005). No obstant les particions dels contaminants amb les diferents fases del sòl, la component més estàtica dels contaminants i la logística d'operació fan que hi hagi un major ventall de possibilitats d'estratègies de bioremediació en aquesta matriu ambiental, sobretot tècniques *ex situ* (González-Rojas, 2011).

El factor ambiental més limitant en el sòl és l'oxigen. Així doncs, una estratègia típica de bioremediació consisteix en aportar aire al sòl. Com aquesta operació pot resultar complexa per la baixa solubilitat de l'oxigen i porositat del sòl, és important considerar els catabolismes anaerobis. Així doncs, el sòl també es pot provenir de nitrats, sulfats i altres acceptors d'electrons per estimular els bacteris desnitrificants i reductors del sofre, essent alguns d'ells més solubles que l'oxigen i de vegades inclús més econòmics (Azubuike et al, 2016). Tractar les aigües subterrànies i aqüífers és un handicap, per això normalment s'acostuma a extreure els contaminants i tractar-los *ex situ* si l'actuació és ràpida (Philp i Atlas, 2005). La vulnerabilitat d'un aqüífer a la contaminació depèn de la susceptibilitat d'infiltració de la seva àrea de recàrrega (Prommer i Barry, 2005). Així doncs, aqüífers confinats i profunds presenten un risc menor per contaminació d'hidrocarburs provinents del petroli.

L'avantatge principal de les tècniques *ex situ* rau en la capacitat de control dels diferents paràmetres que influeixen en la taxa de biodegradació. De tècniques *ex situ* n'hi ha 4 de diferents (Azubuike et al, 2016; González-Rojas, 2011). Totes elles poden comptar amb sistemes d'irrigació, nutrients i homogeneïtzació.

- **Biopiles:** Consisteix en extreure el sòl contaminat per tractar-lo en un emplaçament impermeabilitzat i amb tractament de lixiviats, normalment de forma trapezoïdal. Les biopiles presenten sistemes de ventilació i s'acostumen a cobrir per no perdre humitat.
- **Fileres de compostatge:** Mateix tractament anterior, però en aquesta tècnica s'afegeixen additius orgànics i altres materials per generar calor i augmentar així la solubilitat i conseqüentment la taxa de biodegradació. La superfície necessària és major que en el tractament de biopiles.
- **Landfarming:** Consisteix en habilitar un espai, impermeabilitzat o no, per cobrir-lo amb sòl contaminat. Requereix de molt espai, ja que la tècnica es basa en augmentar al màxim la superfície de

contacte. Hi ha disputa entre la comunitat científica en relació a la seva eficiència, donat que contribueix tant a la biodegradació com a la volatilització dels contaminants. En climes càlids la volatilització pot suposar el 40% de l'eliminació total dels compostos contaminants. Els paràmetres més crítics són la quantitat d'aire i aigua que necessita (hi ha gran superfície de contacte). Amb el *landfarming* s'eliminen molt bé la majoria de compostos de petroli, però no es recomana per càrregues contaminants de més de 150 grams/Kg de sòl sec (tal i com es cita a Philp i Atlas, 2005).

- **Bioslurry:** Consisteix en un tractament controlat del sòl barrejat amb aigua i incorporat en un reactor. Tot i la gran eficiència del control de paràmetres, la despesa d'aigua i energia és molt gran.

Les tecnologies *in situ* acostumen a ser la més econòmiques de totes, fomentant el creixement de microorganismes autòctons de la zona saturada del subsòl. S'aplica en funció dels criteris ponderats, com els econòmics o bé el rendiment d'eliminació desitjat. Se solen aplicar quan els processos de bioremediació es donen en molta fondària, on les tècniques d'excavació no són possibles (). Els paràmetres que, en major o menor mesura, eren controlables en les tecnologies *ex situ*, difícilment ho seran en les tecnologies *in situ*. En aquests casos la permeabilitat i conductivitat hidràulica, relacionades amb la porositat del sòl, seran els factors més importants a tenir en compte. Existeixen tres tècniques *in situ* diferents (Azubuike et al, 2016).

- **Bioventing:** Consisteix en introduir aire en la zona no saturada del sòl per estimular la concentració d'oxigen i la biodegradació aeròbia. És una tecnologia molt recomanada per eliminar PAHs, gasolines i altres tipus de petrolis no molt pesants (els compostos lleugers i insolubles en aigua *Light Non-Aqueous Phase Liquid*, LNAPLs). La seva eficiència s'ha comprovat en diversos casos, essent molt útil en regions fredes. S'utilitzen baixos cabals d'aire per evitar l'evaporació de la fracció volàtil.
- **Biosparging:** Variant del bioventing on s'injecta aire a la zona saturada. L'objectiu és tractar els *Dense Non-Aqueous Phase Liquid* (DNAPLs) i els solubles que han arribat a la zona saturada, transportant-los a través de les bombolles d'aire cap a la zona no saturada, on seran biodegradats o recuperats per extracció.
- **Bioslurping:** Consisteix en utilitzar el buit per extreure l'aire del sòl, afavorint l'entrada de nou aire que estimularà la bioremediació. Quan s'extreu aire també s'extreu aigua provinent de l'aqüífer o zona capil·lar. D'aquesta manera, es poden extreure els hidrocarburs menys densos de l'aigua (LNAPLs) que es troben flotant sobre el nivell freàtic o aigua capil·lar.

3.2. Estratègies de bioremediació aplicades a casos reals

3.2.1. Exxon Valdez, Canadà

El 24 de març de 1989 el petrolier Exxon Valdez va alliberar més de 30.000 tones de petroli a les aigües àrtiques de Canadà. La catàstrofe comesa per un seguit d'errors tècnics entre guardacostes, el capità i l'armador van acabar afectant a més de 1.000 Km de les costes de Prince William Sound (Atlas, 2011). Fou el primer vessament massiu en el qual es van aplicar els primers projectes de neteja i bioremediació als EEUU, que avui es valoren exitosament (Schmidt, 2012). Part del petroli es va extreure de la superfície de l'aigua mitjançant mecanismes físics, però les emulsions formades amb l'aigua van dificultar aquesta operació per culpa de les pluges. Com a mesura d'actuació immediata també es van aplicar dispersants, que no van resultar molt efectius davant la gran emulsió formada sobre la superfície del mar. Un cop el petroli va arribar a la costa, la neteja física amb aigua calenta es va considerar una bona opció per retornar el petroli a l'aigua, i extreure'l mitjançant equips de succió. L'aplicació de dispersants a la costa es va desestimar per la toxicitat dels dispersants comercials disponibles (Bulon, 2003).

A partir de les propostes realitzades per part de la comunitat científica, l'estratègia de bioremediació escollida es va enfocar a l'aplicació de fertilitzants, descartant mesures d'inoculació, ja que en aquella

època hi havia poc coneixement dels processos microbiològics d'oxidació d'hidrocarburs. Així doncs, es va optar pel fertilitzant Inipol EAP22, líquid oleofílic d'alliberació lenta mitjançant grànuls, compostat per àcid oleic, urea i lauril fosfat. Es va aplicar un total de 48.500 Kg durant els tres estius que va durar el projecte (Atlas i Bragg, 2009). No obstant això, la decisió d'escollir aquest fertilitzant no es va fonamentar en les necessitats tècniques de l'accident, atenent a criteris de la ratio C:N:P, eficiència i toxicitat, sinó que es va basar en criteris econòmics, ja que l'Inipol fou desenvolupat a gran escala per solucionar problemes d'altres vessaments anteriors (Bulon, 2003). A l'inipol se li atribueixen tres problemes: conté massa àcid oleic, incrementant la proporció C:N; conté compostos tòxics; i per últim, quan entra en contacte amb l'aigua forma una emulsió que allibera la urea i es perd, la font principal de nitrogen (Ron i Rosenberg, 2014).

Tanmateix, Venosa, Campo i Suidan (2010) han comprovat l'efecte positiu del fertilitzant a 4 illes de Prince William Sound (PWS), observant una disminució significativa amb addició de nutrients inorgànics en el percentatge d'hidrocarburs provinents de les restes del petroli de l'Exxon Valdez que no s'havien degradat i es troben enterrats en els sediments de les platges (figura 5). En aquest experiment s'estableix que per assolir el màxim de biodegradació es necessiten 0,04 g N/g de sòl i 3 g d'O₂/g de sòl, concentracions que el sòl no presentava anteriorment al tractament amb fertilitzant. En aquest experiment s'ha calculat la biodegradació dels PAHs normalitzada amb l'hopà, hidrocarbur que es considera indicador biològic de bioremediació per la seva baixa taxa de biodegradació. També es conclou que 19 anys després de l'accident, mitjançant un mètode informàtic de monitoreig de 316 punts entre 2001 i 2003, més del 70% del petroli de l'Exxon Valdez fou degradat. Les limitacions principals són la concentració de nitrogen i oxigen (Venosa et al., 2010).

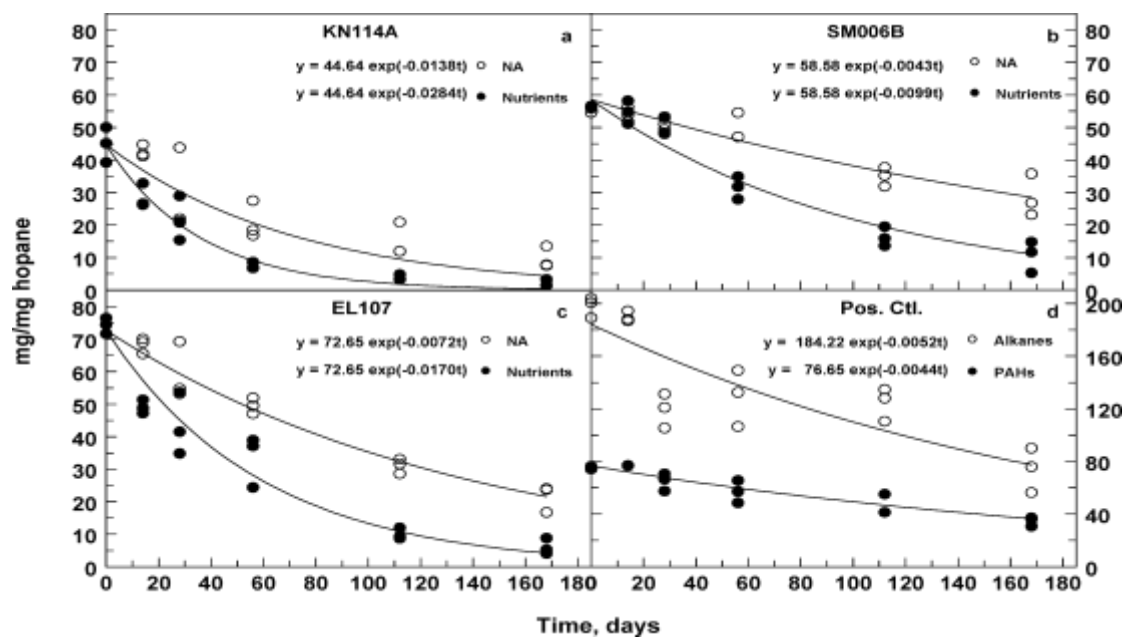


Figura 5. Biodegradació de la concentració total de PAHs normalitzada amb la concentració d'hopà, en funció del temps en diferents tractaments a les illes Knight (a), Smith (b), Elenor (c) i mostra control d'Elenor (d). NA: atenuació natural (Venosa, Campo i Suidan, 2010).

Atlas i Bragg (2009) també han demostrat l'eficiència de la bioremediació i l'atenuació natural a PWS 18 anys després de l'accident. D'un total de 346 mostres de sediment analitzades, només el 21,8% presentaven nivells baixos de contaminació per petroli i traces subterrànies, i el 2,6% mostraven indicis clars de contaminació greu causada per residus de petroli subterrànies (figura 6).

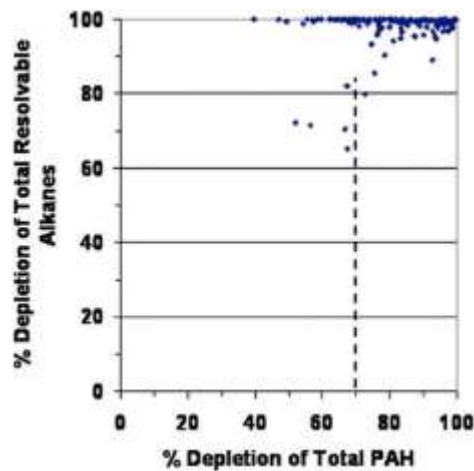


Figura 6. Eliminació d'alcans de les mostres de sediment mostrejades durant el 2002 i 2007, en funció de l'eliminació dels PAHs analitzats. Alcans totals: linears C₉-C₄₀, i pristà i fità. Com la majoria de mostres han perdut més del 70% dels PAHs, en aquest estudi s'escull aquesta xifra com a llindar indicatiu de l'eficiència de la bioremediació (Atlas i Bragg, 2009).

El 80% de tots els PAHs analitzats en experiments realitzats amb residus del petroli enterrat a les costes de PWS es van degradar en menys de 6 mesos amb addició de nutrients i oxigen, però llavors els més pesats romanen molt més temps (Boufadel, Geng, i Short, 2016). Aquests residus tendeixen a acumular-se en els sediments. Així doncs, després de 21 anys de l'accident, el problema de contaminació per hidrocarburs del petroli roman en els sediments costaners de la regió submareal (Boufadel et al., 2016; Venosa et al., 2010), on les condicions anaeròbies són freqüents i alenteixen la bioremediació. Guo, Li, Boufadel i Liu (2014) van estudiar els moviments hidrogeològics a les costes gravenques de PWS i van concloure que durant les mareas baixes els residus del cru que no s'han degradat passen a la capa poc permeable, on queden confinats per forces capil·lars. Aquest patró hidrogeològic es repeteix a tota la zona afectada per l'Exxon Valdez, on la permeabilitat de la capa de sota és dos ordres menys permeable que la de sota (Torlapati i Boufadel, 2014). L'efecte de les mareas i l'aigua dolça provinent de rius creen un efecte de rentat dels nutrients que s'afageixen als tractaments. Per tant, la bioestimulació en aquestes costes no contribueix a la degradació de les restes del petroli de l'Exxon Valdez (Guo et al., 2014). En aquests ambients menys permeables la falta d'oxigen i aigua són factors limitants. D'aquesta manera, l'addició de fertilitzant en forma de nitrat pot afavorir els catabolismes anaerobis i subministrar una font de nutrients necessària (Atlas i Bragg, 2009). Tot i això, l'aplicació d'additius des de la superfície difícilment arribarà a la capa inferior. En aquests casos es poden considerar tipologies tipus *bioventing* o *landfarming* si la fondària on es troben els contaminants no és molt gran i l'excavació és possible. Altres autors, però, argumenten que l'efecte del confinament es pot considerar com una mena d'harmonització, per la qual cosa no cal preocupar-se per aquest tipus de contaminació (Schmidt, 2011; Venosa et al., 2010). Per contra, Atlas i Bragg (2009) defensen que calen aplicar estratègies de bioestimulació a través de la injecció directa de químics en la capa poc permeable (Boufadel et al., 2016; Li i Boufadel, 2011; Atlas i Bragg, 2009). Boufadel i col·laboradors (2016) comproven l'eficiència de la bioremediació mitjançant injeccions de peròxid d'oxigen i nitrat, on el primer any de tractament es redueix d'un 30 a un 70% la quantitat de PAHs, i incrementa significativament el contingut d'oxigen en més del 60%. També incrementa el contingut i consum de nutrients, més de 60% en el segon any de tractament. L'augment d'oxigen suggereix que la injecció ajuda a instaurar les condicions aeròbies, augmentant així la taxa de biodegradació. Tanmateix, s'ha d'anar en compte amb l'impacte ambiental que poden generar les mesures d'injecció a gran escala, així com el seu cost econòmic. Sota condicions controlades i tenint en compte els riscos ambientals associats, els experiments d'injecció hidràulica demostren que s'obren nous canals irreversibles a causa de les noves fractures hidràuliques, amb una gran àrea d'influència i sense el perill de dilució que es pateix a la capa superficial (Boufadel i Bobo, 2010). Per tant, la bioestimulació via injecció de químics cap a la zona no permeable és lògicament factible (Guo et al., 2014).

3.2.2. Prestige, Espanya

El 13 de novembre de 2002 el petrolier Prestige va patir una fractura per culpa d'una tempesta. Sis dies més tard es va partir per la meitat, enfonsant-se a 3800 metres de profunditat i alliberant aproximadament 63.000 tones de petroli rus. 53.000 tones a la deriva del mar es van recollir durant el mes següent, mentre que la resta es va escampar pels 1000 km de costa atlàntica espanyola i part de francesa (Bulon, 2003). Tot i les operacions de 2003 realitzades per REPSOL amb l'objectiu de segellar el vaixell, i altres posteriors el 2004 per extreure'n el cru, finalment es va optar per afegir fertilitzant al petrolier i així afavorir la biodegradació. No obstant això, el 2007 REPSOL confirmava que s'alliberaven al mar entre 13 i 20 litres de cru per dia, i el 2011 encara s'observaven taques i restes de petroli al mar (Bernabeu et al., 2013).

Un dels principals desavantatges per la bioremediació i restauració del vessament fou la composició química del petroli rus (30% saturats, 53% aromàtics, 12% resines i 12% asfaltens), de caràcter pesant i poc biodegradable. Les resines i asfaltens presents en aquest petroli es consideren compostos recalcitrants que limiten la biodegradació, ja que s'acumulen en la matriu polar orgànica dels sòls reduint la seva biodisponibilitat (Fernández-Álvarez et al., 2006). El petroli del Prestige té una classificació API de 26⁰, per la presència de PAHs alquilats i alcans ramificats de cadena llarga com a components majoritaris, indicant així el baix potencial de biodegradació (Gallego et al., 2006). En efecte, la sedimentació i altres mecanismes físics foren importants en el destí del petroli, on la bioremediació fou minoritària (Acosta-González et al., 2015). Les condicions climàtiques tampoc jugaven a favor, sinó que l'efecte dels forts temporals i les dues marees diàries van escampar la marea negra fins al nivell supralitoral. Així doncs, la tasca d'eliminació física del petroli per part de voluntaris immediatament després de l'accident va ser imprescindible (Bulon, 2003). Aquesta tasca va ajudar a evitar la pavimentació del petroli en les costes rocoses. Gallego i col·laboradors (2006) han comprovat en un seguit d'experiments a les costes de Cuño que la biodegradació s'alenteix com més profunda és la capa de petroli que s'analitza d'una roca contaminada. Les capes més externes foren més propenses a la biodegradació durant el primer estiu, on les altes temperatures van reduir la viscositat del petroli i afavorir el creixement microbiològic (Gallego et al., 2006).

Tots els estudis realitzats a les costes de Galícia conclouen que la gran heterogeneïtat de les matrius sòlides dificulta establir conclusions generals sobre la bioremediació del petroli del Prestige. No obstant això, la matriu sorrenca presenta els valors de contaminació per hidrocarburs més baixos a causa de l'escassa penetració del petroli viscos en aquest tipus de sòl. També juga a favor l'elevada porositat d'aquesta matriu i, conseqüentment, la concentració d'oxigen disponible en els porus, de 2 mg/L de mitjana, que és prou alta com per afavorir la bioremediació (Fernández-Álvarez et al., 2007). D'igual manera passa amb la temperatura, essent de 10 a 17°C (Fernández-Álvarez et al., 2006), propera al rang òptim descrit per King i col·laboradors (1997) i Csuros (1999). Tanmateix, aquestes condicions només es donaven a l'estiu. A grans trets, la heterogeneïtat de les costes i els seus micro-ambients hostils foren importants limitacions de la bioremediació del Prestige (Fernández-Álvarez et al., 2007; Gallego et al., 2006).

L'èxit de la bioremediació depèn de l'habilitat d'establir i mantenir condicions que afavoreixin la bioremediació, tals com la concentració de nutrients i presència de microorganismes biodegradadors d'hidrocarburs (Lladó, 2012). A les costes gallegues s'ha comprovat a nivell experimental que la bioaugmentació no té efectes significatius sobre la bioremediació del petroli del Prestige, mentre que l'addició de nutrients i surfactants sí que accelera significativament la taxa de biodegradació durant les primeres setmanes de l'experiment (Acosta-González et al., 2015; Fernández-Álvarez et al., 2007; Gallego et al., 2006). Aquest efecte és interessant si el temps és considerat un factor clau per restaurar emplaçaments contaminants. Tanmateix, Gallego i col·laboradors (2006) adverteixen del perill d'eutrofització que es deriva de l'aplicació de fertilitzants en platges on no es té en compte la càrrega de nutrients dels efluent agrícoles. Tot i aquesta suposició, en els experiments realitzats per els mateixos autors es conclou que l'addició de 100g/m² del fertilitzant industrial S200 (usat en grans quantitats durant l'accident del Prestige), mescla saturada d'urea en àcid oleic amb esters fosfats, afavoreix la biodegradació dels hidrocarburs del

petroli (figura 7). El fertilitzant S200 no és tan eficient amb els alcans de 17 a 33 carbonis, com les ceres. Aquests últims compostos probablement interfereixen amb la llarga cadena dels compostos oleics del fertilitzant. Acosta-González i col·laboradors (2015) van observar un increment significatiu en la quantitat de microorganismes capaços de metabolitzar hidrocarburs durant el tractament amb S200, representant del 20% al 40% del total de la població de microorganismes. Tot i l'eficiència del fertilitzant S200, Gallego i col·laboradors (2006) i Fernández-Álvarez i col·laboradors (2007) comproven que l'aplicació de l'agent oleofílic durant l'estiu no persisteix durant el següent hivern o primavera a causa de l'efecte de rentat de l'aigua de mar i rius, per la qual cosa s'hauria d'haver aplicat amb més freqüència aquest fertilitzant.

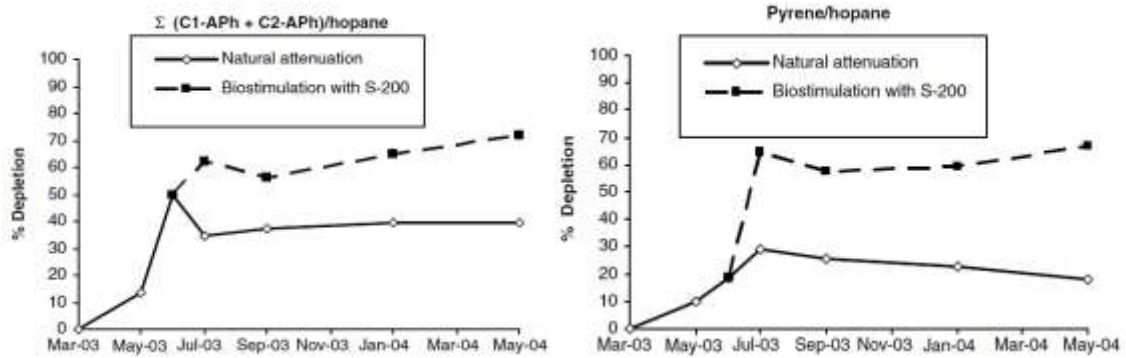


Figura 7. Percentatge de disminució mesurat a Moreira (Galícia) durant 1 any amb tres aplicacions de S200 (juny, juliol i agost 2003). C1-APh: metil antracens i fenantrens; C2-APh: dimetil antracens i fenantrens. (Gallego et al., 2006).

En general s'observa una ràpida degradació de tots els hidrocarburs durant els 2 primers mesos, però després la bioremediació s'alenteix i, per exemple, tarda més de dos anys a establir la concentració de PAHs a nivells inferiors del 50% (Gallego et al., 2006). Acosta-González i col·laboradors (2015) argumenten que la degradació dels PAHs és funció del seu pes molecular.

La circulació d'aigua dolça provinent de terra afavoreix la bioremediació (Fernández-Álvarez et al., 2007), ja que possibilita l'establiment de consorcis microbians (Gallego et al., 2006). En presència d'humitat, nutrients i circulació d'aigua dolça, s'han aïllat i estudiat fongs i bacteris de les costes de Galícia que cooperen amb cianobacteris. Aquests últims subministren oxigen, facilitant la bioremediació i augmentant la biomassa de 10^5 a 10^8 CFU/g (Gallego et al., 2006). A la figura 8 s'observa que les mostres que estan en contacte amb l'aigua dolça presenten concentracions menors d'hidrocarburs expressades com a proporció entre diferents hidrocarburs objectius i l'hopà com a marcador biològic de bioremediació. L'activitat microbiana es manté amb un flux lleu d'aigua dolça, que a més a més, debilita l'adhesió del petroli i augmenta la seva biodegradació. Quan no hi ha circulació d'aigua la foto-oxidació pren un paper rellevant en la degradació dels hidrocarburs del petroli (Acosta-González et al., 2015).

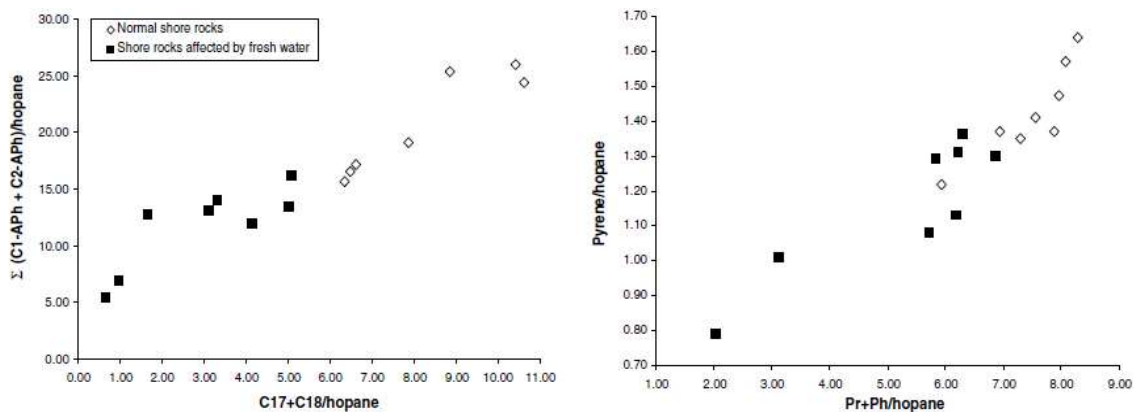


Figura 8. Relació de disminució de la proporció d'aromàtics lleugers amb alifàtics (esquerra), i aromàtics pesants amb alcans ramificats (dreta) en platges amb roques tacades de petroli amb i sense circulació d'aigua dolça. Pr: pristà; Ph: fità; C1-APh: metil antracens i fenantrens; C2-APh: dimetil antracens i fenantrens. (Gallego et al., 2006).

Sense aquest coneixement científic exposat anteriorment i davant la dificultat d'eliminar les capes olioses de les roques durant el 2002 i principis de 2003, les autoritats van decidir utilitzar més de 1.000.000 m² d'aigua calenta a pressió per netejar les platges, estratègia molt criticada per la despesa d'energia i aigua, i generació de residus. Una alternativa més econòmica és la utilització de biodièsel local com a agent oleofilic dispersant i estimulador de la bioremediació. Aquest ester metílic vegetal forma emulsions amb el petroli que incrementen la superfície de contacte amb la fase aquosa i afavoreixen la biodisponibilitat dels hidrocarburs per als microorganismes. Fernández-Álvarez i col·laboradors (2006) van comprovar que amb una dosi mensual de 100g/m² de biodièsel d'oli de gira-sol s'estimula la neteja de les capes de petroli més resistents adherides a les roques del litoral galleg (figura 9), sense provocar grans cabals de residu de biodièsel i restes de petroli. El biodièsel incrementa la solubilitat i consegüentment la bio-disponibilitat d'aromàtics (Fernández-Álvarez et al., 2006).

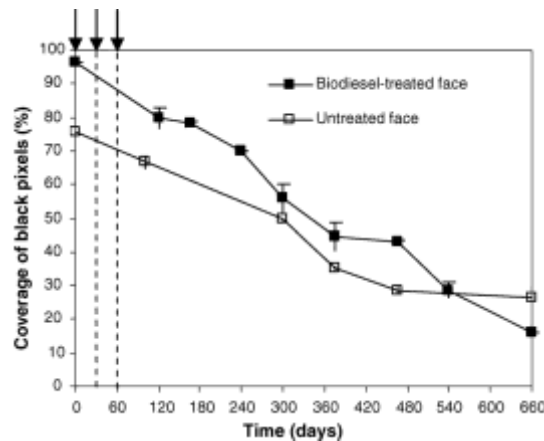


Figura 9. Percentatge de superfície recoberta amb petroli residual en els experiments realitzats amb biodièsel a la platja de Sorrizo (A Coruña) en roques situades en la zona intermareal. Les fletxes indiquen els dies d'aplicació de biodièsel (Fernández-Álvarez et al., 2006).

L'aplicació d'aquest dispersant és interessant des del punt de vista econòmic i toxicològic. Sueiro, Garrido i Araujo (2011) observen que l'aplicació de biodièsel a la mateixa platja que els experiments anteriors redueix el potencial mutagènic en la zona supralitoral contaminada amb el petroli del Prestige després de 60 dies de la seva aplicació. Tot i això, l'increment de resposta mutagènica al principi de l'experiment en comparació amb el control suggereix que no es pot considerar com un agent estimulador totalment segur.

Tot i la baixa biodisponibilitat del petroli del Prestige, la freqüència de vessaments de petroli a la costa gallega va permetre la proliferació de comunitats autòctones capaces de realitzar la bioremediació del petroli (Acosta-González et al., 2015). Acosta-González i col·laboradors (2015) van detectar que els nivells de diversitat microbiana disminueixen amb l'entrada del petroli del Prestige al medi, a causa de la dominància del filum *Proteobacteria*, amb major representació de les classes alfa i gamma a la zona supra i intermareal, i delta i gamma als sediments marins. Els bacteris aïllats de la superfície són bàsicament degradadors d'alcans mentre que els dels sediments degraden majoritàriament compostos aromàtics i altres més recalcitrants. A nivell d'espècie es destaca la presència de l'actinobacteri *Mycobacterium spp.*, capaç de mineralitzar PAHs de 3 o 4 anells i *Cycloclasticus spp.*, que ocupa el lloc d'*Alcinovarax spp.* quan aquest últim no hi és present (Acosta-González et al. et al., 2015). En els sediments marins el catabolisme anaerobi d'hidrocarburs és representat majoritàriament pels reductors del sulfat del grup *Deltaproteobacteria*. En aquesta regió el paper dels consorcis microbians és fonamental, d'igual manera que la presència del gènere *Citricella* i *Pseudomonas* (Mulet et al., 2011). Aquest últim gènere fou detectat àmpliament en el vessament del Prestige: 29 filo-espècies entre les quals hi ha *P. stutzeri*, *P. putida*, *P. anguilliseptica*, *P. oleovorans* i *P. alcaligenes*, i també desnitrificants com *P. marincola* i *P. nitroreducens* (Mulet et al., 2011). *Pseudomonas* és un gènere interessant des del punt de vista de l'enginyeria genètica, ja que és capaç de transferir els gens que codifiquen la degradació a la resta de comunitats (Lladó, 2012; Mulet et al., 2011).

Bernabeu i col·laboradors (2013) van estudiar les etapes finals de la bioremediació del Prestige, conclouent que després de 9 anys de l'accident, les condicions climàtiques i hidrodinàmiques causaven l'aflorament de boles de quitrà que romanien enterrades en els sediments del mar i de les platges. Aquest aflorament suggereix que hi ha acumulació de petroli en la zona submareal que es transporta a la costa per acció de les ones. La baixa capacitat de biodegradació d'aquests residus de petroli apunta a la necessitat d'establir programes de seguiment i restauració (Acosta-González et al., 2015).

3.2.3. BP Deepwater Horizon, Estats Units d'Amèrica

L'abril de 2010 la plataforma Deepwater Horizon (DH), propietat de British Petroleum, va patir un seguit d'explosions que van acabar per destruir el pou d'explotació situat a 1500 metres de profunditat. Els gairebé dos mesos d'operacions per tancar el pou i aturar la fuga de petroli van causar el major desastre per vessaments d'hidrocarburs als EUA (Scoma, Yakimow i Boon, 2016). Es van vessar un total de 500.000 tones de cru al mar del Golf de Mèxic, classificat amb un API de 36^o, essent molt més biodegradable i menys viscos que el petroli del Prestige i l'Exxon Valdez (Atlas, 2011). Les anàlisis químiques informen que el petroli estava format per 74% alifàtics saturats, 16% aromàtics (majoritàriament mono-aromàtics), 10% compostos polars, i 24% gas (Scoma et al., 2016).

Les actuacions davant aquest accident van consistir en incineració, extracció de petroli amb posterior decantació per eliminar l'aigua, aplicació de barreres mecàniques, i en certa mesura, estratègies de bioremediació. Per la complexa logística i cost elevat del tractament de bioremediació *ex situ* es va optar per estratègies *in situ* d'atenuació natural i bioestimulació amb dispersants (Liu, Bacosa i Liu, 2017). Es van afegir al medi un total de 3.000.000 L de Corexit, un dispersant comercial usat en menor mesura a l'accident de l'Exxon Valdez. Aquest dispersant es va aplicar majoritàriament en fondària per evitar que el petroli ascendís (Scoma et al., 2016), ja que a la seva lleugera química se li atribuïa inflamabilitat.

Brakstad, Nordtug i Throne-Holst (2015) han provat la bioestimulació del Corexit a les aigües del Golf de Mèxic amb el mateix petroli de l'accident (Macondo), afegint una variable a l'estudi que influencia en la taxa de degradació de manera significativa: la mida de les gotes de dispersant. La superfície de contacte de les gotes de 10µm és el doble que les de 30µm. Aquest fet repercuteix en la colonització i conseqüentment, en el coeficient de biodegradació, essent major en les gotes més petites (Brakstad et al., 2015). Les diferències són més rellevants en els alcans de menys de 21 carbonis, amb coeficients de degradació que segueixen el model cinètic de primer ordre són majors en les dispersions de gota petita (figura 10). Aquest resultat suggereix que els PAHs lleugers característics del petroli Macondo es dissolen i/o s'evaporen amb més facilitat que els alcans, essent la seva biodegradació conseqüentment més ràpida. D'aquesta manera, l'addició de grans quantitats de Corexit potser va ser innecessària si l'objectiu era afavorir la biodegradació dels PAHs. Kleindienst i col·laboradors (2015) recolzen aquesta última idea, observant que l'aplicació de Corexit en fondària inhibeix el creixement d'alguns microorganismes degradadors d'hidrocarburs del petroli.

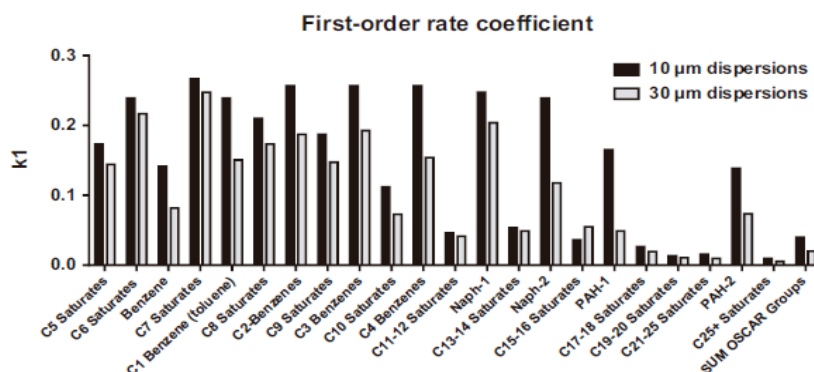


Figura 10. Coeficients de primer ordre de l'equació cinètica de biodegradació per els diferents components del petroli Macondo, al Golf de Mèxic, en dispersions amb gotes de 10µm i 30µm. (Brakstad et al., 2015).

Les condicions climàtiques del Golf de Mèxic van contribuir positivament en la degradació del petroli (Bacosa, Erdner i Liu, 2015). La intensa radiació solar del Golf de Mèxic incrementa la degradació de PAHs de 4 i 5 anells en un 70% i de PAHs alquilats de 3 i 4 anells en un 36% (figura 11). Per als alcans la contribució de la foto-oxidació no és tan important com la bioremediació (Bacosa et al., 2015).

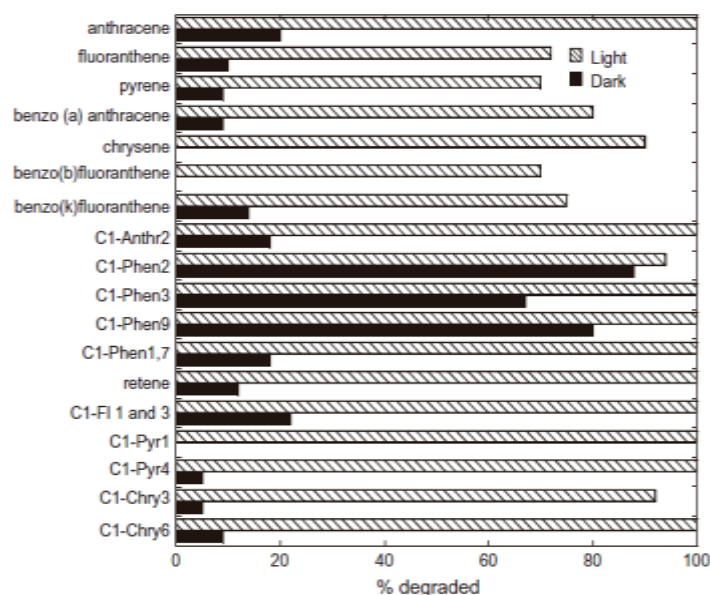


Figura 11. Contribució de la foto-oxidació (experiment amb llum) i la biodegradació (experiment a la foscor) a la degradació dels components del petroli Macondo. Les barres representen el percentatge de degradació de PAHs i alguns alquilats, durant 36 dies amb control de temperatura (Bacosa et al., 2015).

Beudoin i col·laboradors (2016) defensen la postura de no afegir nutrients al medi, mentre que Warr i col·laboradors (2016), i Horel, Mortazavi i Sobecky (2014), en canvi, defensen que els nutrients són un factor limitant de la bioremediació al Golf de Mèxic. Warr i col·laboradors (2016) han comprovat l'eficiència de l'aplicació d'argiles autòctones amb fertilitzant per estimular la biodegradació. La plasticitat i baixa permeabilitat de l'argila evita l'evaporació de molts components del petroli de Macondo, concentrant i mantenint els nutrients i evitant així la dispersió i dissolució d'aquests últims. Les argiles tractades amb fertilitzant redueixen de 6 a 10 vegades la concentració d'alcans i alguns PAHs (Warr et al., 2016). Amb els PAHs la concentració no es redueix tant, ja que la majoria del petroli de Macondo són monoaromàtics i per tant solubles o bé evaporables (Liu et al., 2012). En les proves control s'observa que l'argila és capaç d'absorbir els PAHs, reduint la seva biodisponibilitat. En controls sense fertilitzant i amb tractament estèril les argiles són capaces d'absorbir del 23 al 43% de tots els hidrocarburs, amb una àrea específica al voltant de 80 m²/g (Warr et al., 2016). L'efecte de les argiles, però, pot resultar contraproductiu si l'objectiu és augmentar la biodisponibilitat i posterior biodegradació. Tanmateix, si interessa inferir en la taxa d'evaporació, reducció de concentració total d'hidrocarburs en el medi i efecte rentat dels nutrients, la seva aplicació és interessant. D'altra banda, com els fertilitzants químics poden induir problemes d'eutrofització i augment del pH, Horel i col·laboradors (2014) han estudiat l'eficiència de fertilitzants orgànics tals com restes vegetals i animals de les platges del Golf de Mèxic, en estudis amb una concentració de petroli de 4 g/Kg de sòl. La planta augmenta la taxa de biodegradació en un 25%, mentre que el peix ho fa en un 123%. Es conclou que el mètode és eficient, sobretot amb l'aplicació de restes de peix (*Chloroscombrus chrysurus*), ja que l'alliberació és més ràpida i la biodegradació més efectiva si es té en compte l'efecte rentat de les ones i el temps com a factor clau en la bioremediació (Horel et al., 2014).

Les comunitats microbianes implicades en la biodegradació del petroli Macondo són molt diverses i variades, i responen a la complexitat de l'accident (Beaudoin et al., 2016; Brakstad et al., 2015; Horel et al., 2014). La major part del petroli que es trobava en suspensió per l'efecte dels dispersants a una profunditat de 1000 m va acabar precipitant en forma de boles de quitrà, per l'acció de la degradació química i hidrodinamisme del mar. Aquestes boles han acabat enterrades i dipositades sobre els sediments del fons

del mar i/o de la costa. Liu i col·laboradors (2017) han estudiat les diferències entre les comunitats presents als sediments marins, sediments de les platges i a la superfície del mar, tots ells contaminats pel petroli Macondo. A la superfície, a 24°C, hi ha dominància de *Oleibacter*, *Thalassobius*, *Phaeobacter*, mentre que als sediments marins, a 4°C, hi dominen *Cycloclasticus* i *Pseudoalteromonas*. La biodegradació d'alcans fou més ràpida a la superfície que no pas als sediments, amb especial èmfasi als gèneres *Colwellia*, *Cycloclasticus* i a l'ordre *Oceanospirillales*. Pels PAHs la degradació fou més ràpida als sediments, suggerint l'especificitat dels metabolismes anaerobis (Liu et al., 2017). En aquest experiment també s'ha analitzat la contribució de la temperatura, la comunitat inicial, el petroli i l'aigua de mar a la variació total mitjançant una anàlisi de redundància (RDA). Es conclou que el 57% del tota la variació l'explica la temperatura, seguit d'un 19% la comunitat inicial, 14% el petroli i només un 10% el tipus d'aigua (figura 12).

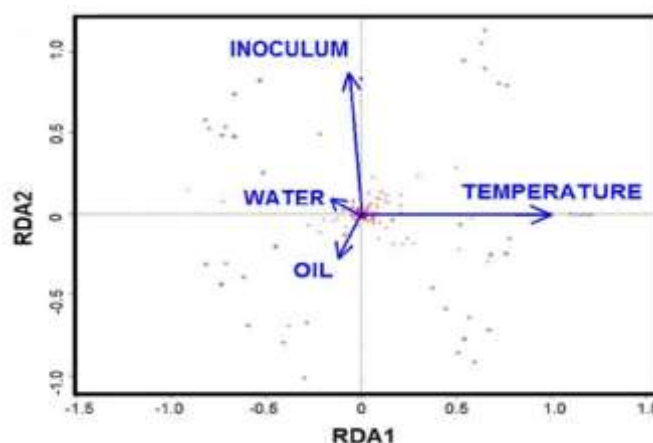


Figura 12. Diagrama biplot de l'anàlisi RDA d'una comunitat microbiana, en funció a la presència de petroli, la temperatura, nutrients i la comunitat inicial (Liu et al., 2017).

Brakstad i col·laboradors (2015) van identificar ràpidament el creixement de bacteris associats a la biodegradació d'hidrocarburs en aigües fredes, tals com *Oceanospirillaceae*, *Pseudomonas*, *Cycloclasticus*, *Colwellia*, *Pseudoalteromonas* i *Methylophaga*. Aquests bacteris es van aïllar prop del pou d'exploració, on la temperatura de l'aigua era de 5°C. D'altra banda, als sediments costaners s'han aïllat ascomicets i basidiomicets que fan servir mecanismes enzimàtics intracel·lulars com el citocrom P450 monooxigenases (enzim clau per degradar anells aromàtics), nitroreductases i transferases, i altres d'extracel·lulars com lacasses i peroxidases (Simister et al., 2015). Aquests fongs eliminen molt bé els alcans de cadena curta, degradant entre un 90 i 99% els de menys de 18 carbonis. En menor mesura poden degradar alcans de cadena llarga (C₁₉-C₃₆) i PAHs, d'un 7-87% i 42-84%. No obstant s'hagin identificat diferents espècies, cal seguir investigant la contribució dels fongs marins a la bioremediació, ja que se sap poc sobre les tendències i necessitats biològiques, i relacions ecològiques (Simister et al., 2015). Passa el mateix amb el coneixement dels protistes i la seva contribució a la degradació d'hidrocarburs (Beaudoin et al., 2016). Hi ha autors que defensen que poden tenir impactes positius, oferint nutrients provinents dels metabòlits secundaris, per exemple. Beaudoin i col·laboradors (2016) van observar que quan s'afegia inhibidors d'eucariotes l'estimulació de la bioremediació era major en comparació a l'addició de nutrients i el control. Aquest fet suggereix que l'absència de protistes disminueix la depredació sobre bacteris, que són els principals catabolitzadors d'hidrocarburs (Beaudoin et al., 2016). Tot i això, s'han aïllat protistes com *Cercomonadida* que contribueixen a la degradació dels alcans (Smister et al., 2015).

El filum de bacteris més freqüent aïllats després del DH, i que poden usar-se com a indicadors de degradació d'hidrocarburs, són els *Proteobacteria* (Horel et al., 2014), amb dominància de la classe Gammaproteobacteria (33% del total) tals com *Alteromonadales spp.* i *Cycloclasticus spp.*, bacteris degradadors de PAHs (Beaudoin et al., 2016), i *Colwellia spp.* i *Rhodobacteraceae spp.* (Scoma et al., 2016). De la classe Betaproteobacteria domina l'ordre *Burkholderiales*, i de la classe Alphaproteobacteria, dominen els *Sphingomonadales* i *Xanthomonadales* (Horel et al., 2014).

Un any després de l'accident els compostos que més persisteixen són els alcans d'elevat pes molecular (C8-C38), que es troben enterrats als sediments marins. En aquesta matriu s'han detectat baixos potencials redox, indicant la presència de catabolismes anaerobis per part de bacteris com *Desulfobacterium* (Scoma et al., 2016). A les platges amb elevada concentració d'oxigen, en canvi, hi predominen *Alcanivorax spp* i *Marinobacter spp.*, especialistes en la degradació d'hidrocarburs (Scoma et al., 2016).

3.2.4. Delta del Níger, Nigèria

A diferència dels casos anteriors, aquest és un episodi de contaminació continua del sòl. Des que Shell i Chevron, el 1956, es van instal·lar al Delta del Níger en la reserva més gran de petroli i gas d'Àfrica, les comunitats natives es van veure desplaçades i el conflicte socio-polític i ambiental començà. La tensió sociopolítica i els desastres ambientals derivats de les activitats extractives van promoure la creació de grups militars que cometien vandalisme de canonades i pous de petroli (Obiakalaje, Makinde i Amakoromo, 2015). S'estima que ens últims 50 anys s'han alliberat al delta del Níger entre 10 i 13 tones de petroli (Zabbey, Kabari i Adaugo, 2017). Aquest desastre ecològic també es diferencia de la resta de casos analitzats per la poca preocupació mundial respecte a la neteja mitjançant projectes de remediació. No obstant això, des de 2011 pren més atenció gràcies a l'Avaluació Ambiental d'Ogoni (Nigèria), que forma part del Programa de les Nacions Unides per al Medi Ambient (Zabbey et al., 2017).

Tot i les desavantatges socio-polítics per fer front a la bioremediació, les condicions climàtiques del delta del Níger són idònies per la biodegradació d'hidrocarburs en sòls i aiguamolls. El pH del sòl de 5-7,8 (Ejechi i Ozochi, 2015) es troba en el rang òptim, i les temperatures mesofíliques del sòl 28-35°C també (Zabbey et al., 2017). La humitat fluctua molt, però les constants precipitacions fan que no sigui un factor limitant. Els únics paràmetres limitants de la bioremediació són la proporció N:P:K i la baixa capacitat d'intercanvi catiònic (CIC) del sòl, que demostra que hi ha dominància de sòls arenosos (Ejechi i Ozochi, 2015), poc relacionats amb la bioremediació (figura 13).

Així doncs, Ejechi i Ozochi (2015) han comprovat que la bioremediació és factible utilitzant gallinassa i fems de vaca com a fertilitzants orgànics en sòls contaminants per petroli al Delta del Níger, quan s'estimula l'aeració mitjançant l'homogeneïtzació de la terra en experiments *ex situ*. Aquests fertilitzants són barats i afavoreixen el creixement d'heteròtrofs, sobretot de desnitrificants en condicions anaeròbies. Ezenne i col·laboradors (2014) demostren que la gallinassa aporta els nutrients necessaris per la biodegradació de PAHs quan s'aplica al 10-25% de la massa del sòl. Els fems d'ovella també estimulen significativament la biodegradació (Obiakalaje et al., 2015). Segons Nwankwegu, Orji i Onwosi (2016) l'addició de compost orgànic també estimula la biodegradació per part de bacteris i fongs. En aquests experiments *in situ* la velocitat de la biodegradació dels hidrocarburs del petroli amb el compost s'adequa al model cinètic de segon ordre, mentre que per l'atenuació natural el model de primer ordre s'adequa millor.

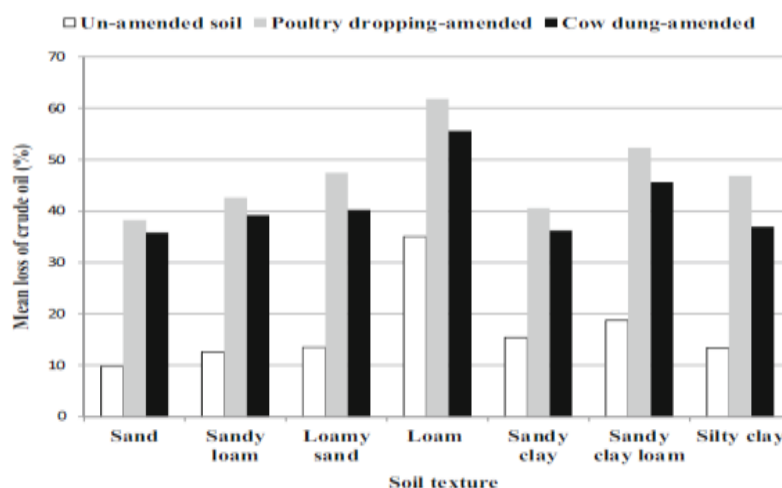


Figura 13. Eliminació de petroli després de 30 dies amb estimulació per fems de vaca, gallinassa i control (Ejechi i Ozochi, 2015).

Brown i col·laboradors (2017) han dut a terme un projecte pilot de *landfarming* amb sòls contaminats del Delta del Níger, on han comprovat com contribueixen diferents additius (fertilitzants químics, orgànics, bio-carbó, ramnolípid i enzims) a la bioremediació. Conclouen que tots els tractaments són capaços de reduir més del 53% del contingut d'hidrocarburs en 16 setmanes, però que els millors tractaments que estimulen significativament la bioremediació són el bio-carbó (absorbeix compostos de carboni) i ramnolípid (biosurfactant). Tanmateix, l'aplicació d'aquests dos agents fa que el *landfarming* deixi de ser una estratègia adequada pel delta del Níger, ja que el cost incrementa i el país no és capaç de fer front a aquesta despesa (Brown et al., 2017). La feblesa política i financera del govern de Nigèria porten a Sam, Coulon i Prpich (2017) a analitzar les diferències de la política ambiental de Nigèria, EUA, i el Regne Unit. Conclouen que per facilitar la introducció de projectes de bioremediació cal establir una política amb definició de sòls i aigües contaminades, amb capacitat de gestió i estructura de regulació, finançament, coneixement tècnic i divulgació de la informació. D'aquesta manera es podran establir zones prioritàries i valorar amb propietat les iniciatives de bioremediació.

4. Discussions

4.1. Discussions generals

En la gran majoria de casos la **bioremediació** és una eina útil per dur a terme la restauració d'ambients contaminats per vessaments massius de petroli. L'anàlisi del marc teòric permet veure que aquesta eina depèn d'un seguit de factors biòtics i abiòtics, que fan que s'apliqui de manera diferent en les situacions reals. Els **factors biòtics** són els organismes descomponedors que biodegraden els components del petroli, amb dominància dels bacteris i fongs. La majoria de bacteris pertanyen al filum *Proteobacteria*, del qual s'han descrit bacteris molt específics com *Cycloclasticus pugetii* (Acosta-González et al., 2015), degradador de compostos aromàtics en sediments marins o *Pseudomonas alcaligenes* en condicions aeròbies (Mulet et al., 2011). També s'han aïllat bacteris Hidrocarbonoclàstics Obligats (BHCO) tals com *Alcanivorax Borkumensis*, bacteri indicador de bioremediació en condicions aeròbies (Scoma et al., 2016; Madigan et al., 2009). Tot i l'eficiència dels sistemes lignolítics poc específics de molts fongs capaços de biodegradar hidrocarburs del petroli semblants a la lignina com els de *Phanerochaete chrysosporium* (Baldrian, 2008). no s'han aïllat ni descrit tantes espècies ni vies metabòliques en comparació amb els bacteris. Tant la descripció de fongs biodegradadors d'hidrocarburs del petroli com el camp de l'enginyeria genètica ha de prosperar, ja que ofereixen possibilitats en quant a noves estratègies de bioremediació. La introducció de OMG necessita controlar les variables ambientals i socials, com la modificació de la diversitat poblacional i acceptació per criteris ètics, que fan que no sigui una estratègia a escala real tot i la creació de soques multiplasmidi del gènere *Pseudomonas* que codifiquen la síntesi d'enzims específics de diferents rutes metabòliques degradadores d'hidrocarburs del petroli (Mulet et al., 2011; Philp et al., 2005).

En funció de la matriu ambiental hi haurà uns **paràmetres ambientals** o uns altres que caldrà controlar per afavorir la bioremediació. Els principals són la temperatura, el pH, el potencial redox i la concentració de nutrients inorgànics. Els microorganismes biodegradadors del petroli són mesòfils i creixen en condicions de pH de de 5-8 (Madigan et al., 2009; King et al., 1997). La introducció de grans quantitats de petroli al medi augmenten la quantitat de carboni en relació amb els nutrients inorgànics. Així doncs, la majoria de vegades caldrà afegir fertilitzants orgànics o inorgànics per compensar la proporció CNP, inclús la CNPK i altres micronutrients (Prince i Atlas, 2005). **L'oxigen** és el millor acceptor d'electrons possible, i a més a més, és substrat per els enzims oxigenases i dioxigenases. Les necessitat d'aquestes u'times d'incorporar dos àtoms d'oxigen i el paper clau que tenen en la biodegradació dels PAHs fa de les condicions anaeròbies les millors per la bioremediació dels hidrocarburs del petroli. Tanmateix, en regions on l'oxigen no hi és ni es pot estimular la seva entrada, els catabolismes anaerobis d'hidrocarburs del petroli són imprescindibles.

L'estratègia de bioremediació que s'escull ha d'atendre al cost de la tecnologia, al seu rendiment i objectius de restauració, i característiques de l'emplaçament. No obstant això, les tècniques *in situ* són les més

freqüents en vessaments massius de petroli. Les tecnologies *ex situ* es donen en casos localitzats de vessaments petits o continus en sòls. En aquestes situacions l'estratègia de biopiles i landfarming són les més utilitzades i econòmiques. L'hidrodinamisme del medi marí fa que la contaminació del petroli es dispersi de tal manera que la complexa logística de tractament *ex situ* es desestimi en la majoria de casos. Això també pot passar amb els sòls molt compactats i poc permeables. Tanmateix, les tècniques *ex situ* resolen la limitació del sòl que ve donada per l'heterogeneïtat i la baixa permeabilitat.

Per reduir l'impacte sobre la salut humana i el deteriorament ambiental que causa la contaminació per petroli, les estratègies més comunes són el **bioaugment** i la **bioestimulació**. A cap dels casos d'estudi es va aplicar el bioaugment com una estratègia de bioremediació al camp. Tanmateix, Acosta-González i col·laboradors (2015) en els experiments a la costa gallega afectada pel Prestige van provar la inoculació de bacteris. Els resultats demostren que la inoculació de bacteris no afecta significativament a la biodegradació. L'èxit de l'Exxon Valdez també reforça aquest argument, ja que fins i tot en condicions climàtiques força extremes l'atenuació natural i la bioestimulació dels microorganismes autòctons fou suficient (Venosa et al., 2010; Atlas i Bragg, 2009). La introducció de microorganismes pot crear competència pels recursos, i en cas que no sigui així, és difícil assegurar la seva supervivència per les diferències entre les condicions de cultiu i les reals.

La segona estratègia, en canvi, ha estat àmpliament estudiada i utilitzada amb èxit. La bioestimulació es pot donar tant per la introducció de nutrients com de dispersants. Al Delta del Níger, per exemple, s'ha estudiat l'eficiència de diferents **fertilitzants** orgànics locals que atenen a les limitacions per nitrogen i fòsfor, i permeten que la bioremediació sigui una estratègia viable per l'economia del país. Tot i això, la majoria de fertilitzants usats en els vessaments massius com al Prestige i Exxon Valdez foren industrials. Aquest tipus de fertilitzant, com l'Inipol EAP22 i el S200, no van atendre a la proporció CNP dels respectius vessaments ja que ve donada pel fabricant. En contraposició, els fertilitzants orgànics eviten la possible toxicitat química dels industrials i el major potencial d'eutrofització, que augmenta com menys resistents siguin els fertilitzants a l'efecte rentat de l'aigua.

Els **dispersants** atenen a la limitació de la biodisponibilitat dels hidrocarburs del petroli. La **biodisponibilitat** depèn de la **naturalesa química del petroli** i de la interacció amb la matriu ambiental (taula 2). Majoritàriament s'utilitzen dispersants industrials que trenquen la tensió superficial entre la fase aquosa i la de la fase insoluble del petroli, augmentant així la superfície de contacte i facilitant l'atac dels microorganismes. L'Inipol, per exemple, fou usat àmpliament per solubilitzar i augmentar la biodegradació del petroli Macondo del Golf de Mèxic. Tanmateix, la utilització de dispersants naturals i alternatius també ha estat estudiada per atendre a la toxicitat de certes fórmules industrials (Fernández-Álvarez et al., 2007). Altres fórmules que es proposen per reduir els efectes tòxics o nocius dels contaminants del petroli es basen en absorbents com l'argila o el bio-carbó (Brown et al., 2017; Warr et al., 2016), que absorbeixen els contaminants del petroli disminuint així la biodisponibilitat, però evitant els efectes de dispersió que són molt freqüents en els vessaments massius de petroli.

Així doncs, es pot concloure que per cada accident la bioremediació depèn de la composició química del petroli, de la matriu ambiental on es diposita, de les condicions ambientals que es donen i dels microorganismes presents. A la taula 2 es poden veure les diferències entre l'accident de l'Exxon Valdez a Canadà i el de la plataforma BP Deepwater Horizon al Golf de Mèxic.

Taula 2. Comparació entre l'accident de l'Exxon Valdez i el BP Deepwater Horizon.

	Exxon Valdez	BP Deepwater Horizon
càrrega vessada	30.000 tones	500.000 tones
caracterització del petroli	API 29 ⁰ , petroli pesat semblant al de Prestige. Amb alcans ramificats de cadena llarga i PAHs alquilats	API 35'2 ⁰ , petroli lleuger amb monoaromàtics, molts volàtils i alifàtics

tipus de vessament	en superfície, a prop de la costa	a 1500 m. Part del petroli ascendeix, precipita i també arriba a la costa
Condicions climàtiques durant el vessament	Tempesta. La marea negra afecta al litoral	Calma
temperatura	7°C a la superfície i 6°C a l'aire (regió subàrtica)	25°C a la superfície i 5°C en fondària (regió subtropical)
Estratègia (bioestimulació)	Fertilitzant Inipol EAP22	Dispersant Corexit en fondària

Les condicions climàtiques van fer que no es pogués aplicar dispersant en l'Exxon Valdez. Així doncs, les estratègies de bioremediació van passar per l'addició de fertilitzants, focalitzades a la bioremediació de les costes, ja que la marea negra es va escampar fins al supralitoral rocós i hostil. En canvi, en l'accident del BP DH es van utilitzar grans quantitats de dispersant en fondària per evitar l'ascens del cru inflamable i poc pesant. Tant la temperatura com la composició química del BP DH van afavorir en major mesura la bioremediació al Golf de Mèxic en comparació a la bioremediació a PSW. Aquest exemple demostra la complexitat de paràmetres que s'han de tenir en compte a l'hora d'avaluar quina estratègia de bioremediació és viable. També és molt important la consideració social i la capacitat econòmica de finançar aquests projectes. Els casos de contaminació del delta del Níger són exemple de la ineficiència de la bioremediació a gran escala, tenint en compte el cost del projecte i la situació econòmica de la regió.

4.2. Propostes per a un cas hipotètic de vessament de petroli a Catalunya

Davant d'un hipotètic cas de vessament massiu de petroli a Catalunya, les estratègies de bioremediació seran diferents en funció de la matriu ambiental. De l'anàlisi dels casos d'estudi es conclou que el major risc de vessament massiu de petroli es dona al medi marí. La mar Mediterrània no es caracteritza ni pels forts temporals ni per marees de gran amplitud, a causa del clima mediterrani i la situació de gairebé mar interior (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2005). Les temperatures de l'aigua de mar són bastant constants durant l'any i en fondària (Institut d'Estadística de Catalunya, 2017). La temperatura més freda de 2016 fou de 13,8°C al febrer i a la superfície del mar, amb un descens de només 0,1°C a 20 i 50 metres de fondària. La temperatura més càlida registrada el 2016 fou de 23°C a la superfície de mar, 21,5°C i 16,4°C a 20 metres i 50 de fondària respectivament (Idescat, 2017). La poca variació i la proximitat al rang òptim de temperatures on la biodegradació d'hidrocarburs del petroli és òptima, fan que les condicions climàtiques del mar de Catalunya es considerin favorables per donar lloc a la bioremediació en vessaments de petroli. Les marees de poca amplitud facilitarien la logística dels projectes de bioremediació a la costa, ja que la marea negra no sobrepassaria el supralitoral. En comparació amb l'accident del Prestige i l'Exxon Valdez, no hi hauria afectació al supralitoral sec, hostil i rocós, on la bioremediació s'alenteix si no hi ha cap corrent d'aigua dolça o bé additius com fertilitzants.

La bioaugmentació no es consideraria una estratègia de bioremediació viable, ja que les condicions climàtiques i ambientals són adequades per al creixement de microorganismes degradadors d'hidrocarburs. Els indicis de contaminació per hidrocarburs del petroli al mar Mediterrani suggereix la presència de bacteris i fongs biodegradadors d'hidrocarburs. Per comprovar aquesta hipòtesi es podrien realitzar experiments als sediments costaners i matrius sòlides de Tarragona, en l'àrea de les instal·lacions de Repsol. Aquesta àrea està formada per dues refineries a nivell de terra, i una plataforma marina anomenada Casablanca, que es troba a 53 Km de la costa tarragonina (Repsol, 2017). El pou d'extracció es troba a 161 metres sota el nivell del mar, i transporta el petroli per oleoductes que van arran del fons marí. S'hauria de caracteritzar la composició química del petroli del pou d'explotació, per fer experiments en fondària i determinar si caldria l'aplicació de dispersants en fondària, com va passar en l'accident del Golf de Mèxic.

Les estratègies de bioestimulació si que serien freqüents per tractar les aigües contaminades pels hidrocarburs del petroli. Tanmateix, en funció de les característiques de l'accident s'avaluarà com s'haurien d'aplicar. La proporció i quantitat de fertilitzant que s'hauria d'afegir és funció de les característiques químiques i la quantitat de petroli que s'allibera al medi. Com en alguns experiments en l'accident del Prestige, seria útil utilitzar models matemàtics per calcular la superfície recoberta per petroli (Gallego et al., 2006). D'aquesta manera es podria estimar la quantitat de fertilitzant que caldria aplicar. Per avaluar la necessitat d'aplicar dispersants també caldria conèixer la composició química del petroli, que definirà el seu destí i interacció amb l'aigua de mar i sediments. S'haurien de considerar els assajos de toxicitat dels fertilitzants i dispersants escollits, per no causar un impacte no desitjat al medi.

A les zones pantanoses, d'aiguamolls i deltaïques els projectes de bioremediació hauran de tenir en compte l'impacte d'intrusió a l'hora de ponderar els criteris per decidir quina estratègia de remediació s'aplica. En aquestes zones, amb elevada presència d'afluents agrícoles i altes càrregues de nutrients, també s'ha de tenir en compte el potencial d'eutrofització que poden causar les estratègies de bioestimulació mitjançant l'addició de nutrients (Gallego et al., 2006). La fragilitat d'aquest tipus d'ecosistemes suggereix que l'atenuació natural seria una estratègia viable de bioremediació.

A grans trets, el clima continental de Catalunya és d'hiverns amb temperatures suaus i estius calorosos i secs, de tipus mediterrani; amb l'excepció del clima atlàntic de la Vall d'Aran. Les temperatures d'estiu són força homogènies, situades al voltant dels 25°C, mentre que les de l'hivern són de 5°C a l'interior i 10°C al litoral costaner. La humitat relativa mitjana anual es troba entre el 70 i 75%. Al litoral és força homogènia i a l'interior hi ha un pic de màxim a l'hivern i mínim a l'estiu. Aquestes condicions són favorables per la bioremediació, tot i que durant els períodes hivernals les baixes temperatures podrien influir en la taxa de biodegradació. El clima de muntanya i atlàntic són menys favorables per la bioremediació, però en aquesta zona el perill potencial d'accident massiu de petroli és gairebé nul (figura 14). Els episodis de sequera i glaçades també disminuiran l'eficiència de les estratègies de bioremediació. Tanmateix, els tractaments *in situ* permetrien fer front a les condicions climàtiques que disminueixen l'eficiència de la bioremediació, ja sigui cobrint els emplaçaments per evitar l'evaporació, irrigant aigua i additius, drenant lixiviats i homogeneïtzant la matriu.

A causa de la heterogeneïtat de la matriu és difícil predir quines estratègies de bioremediació s'utilitzarien. Cal considerar els paràmetres generals que afecten a la bioremediació dels sòls: la permeabilitat i la CIC (Ejechi i Ozochi, 2015). La permeabilitat es relaciona amb la conductivitat hidràulica, i conseqüentment amb el perill d'infiltració dels contaminants del petroli cap a les aigües subterrànies i aqüífers. En els casos en els que els contaminants del petroli migren cap al nivell freàtic, com poden ser els PAHs més solubles, caldrà plantejar estratègies *in situ* tals com el *bioventing*, per exemple. Aquesta tècnica permetria injectar aire per afavorir condicions aeròbies, i també nutrients si es dóna el cas que hi ha limitació. És important caracteritzar el desplaçament del petroli en sòls, ja que els aqüífers de Catalunya tenen una gran importància en l'abastament d'aigua potable i subministrament a la indústria i agricultura (Agència Catalana de l'Aigua, 2017). Caracteritzar de manera general el sòls pot resultar útil, ja que valors baixos de CIC s'associen a un baix potencial de bioremediació (Ejechi i Ozochi, 2015), com els arenosos.

4.2.1. Proposta de protocol proactiu

De l'anàlisi dels casos es percep que la majoria de projectes de bioremediació que atenen a vessaments massius de petroli es realitzen sense coneixement rigorós i sense haver realitzat projectes pilot anteriors. D'aquesta manera, es proposa un protocol que s'hauria d'elaborar en un futur pels organismes competents, amb l'objectiu d'aplicar l'ordre lògic d'investigació, que va del laboratori, a prototips i aplicació a escala real. Per indagar en com hauria de ser aquest protocol s'ha consultat el capítol *Suspicious to solutions: Characterizing contaminated land* (49-85).

En quant a sòls, l'estratègia que es proposa en aquest treball passa per identificar els punts potencials de risc, que bàsicament són oleoductes, refineries i estacions de bombeig. A Catalunya hi ha dues refineries

que es troben a La pobla de Mafumet, Tarragona (Repsol, 2017). Una d'elles produeix crus pesats com els asfaltens, mentre que l'altre en fa de lleugers com la benzina. L'estació de bombeig també es troba situada a La Pobla de Mafumet (figura 14), que es dirigeix cap el ramal Tarragona-Lleida-Saragossa i Tarragona-Barcelona-Girona. Aquest últim ramal té dues estacions de derivació, una al Baix Llobregat i una altra al Vallès Occidental. Els oleoductes de la companyia CLH transporten gasolina, gasoil i querosè, i van enterrats a una profunditat mitjana de 1,2 m. Els hidrocarburs es transporten pels dos ramals descrits, amb una derivació cap al port de Barcelona i una altra cap a l'aeroport del Prat. El traçat que dibuixa la figura 14 representaria l'àrea amb major risc de vessament terrestre de petroli a Catalunya.



Figura 14. Xarxa d'oleoductes de Catalunya. Font:

<https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/6380/08.pdf?sequence=9&isAllowed=y>

Es proposa crear un projecte de monitorització dels sòls en l'àrea d'influència dels oleoductes, estacions de bombament i refineries. Aquestes anàlisis han de caracteritzar el sòl, el tipus de hidrocarburi (composició química) i els microorganismes biodegradadors del petroli presents en aquesta zona. Els diferents tipus de petroli que es processen són una dificultat afegida a aquest protocol, ja que s'haurien de realitzar experiments amb els tipus de petroli i inclús provar quin efecte té la seva barreja. Els resultats d'aquest monitoreig permetria formular projectes de bioremediació de manera ràpida i eficient, atenent a les necessitats reals de l'accident, tant biòtiques com abiòtiques.

Per últim, el protocol que s'hauria d'elaborar al mar hauria de tenir en compte els 26 ports que hi ha al litoral català. 18 d'aquests ports tenen titulars de concessions o autoritzacions per el subministrament de carburants a embarcacions. D'aquesta manera, aquests serien els punts amb risc potencial on, d'igual manera que en el protocol terrestre, s'hauria de caracteritzar el tipus d'hidrocarburs, la relació amb la matriu ambiental i els processos biològics implicats. La complexitat afegida del protocol marítim és la xarxa de transport que fa que hi hagi constants entrades i sortides de diferents tipus de petroli. Per atendre a aquest problema es podria plantejar un programa de cooperació entre estats, on els vaixells que transporten petroli haurien d'incorporar un seguit de documents relatius al protocol proactiu de bioremediació, elaborat per l'estat d'on prové el vaixell.

A continuació s'adjunta els passos que se segueixen a EUA i al Regne Unit per abordar els projectes de bioremediació, modificats i adaptats per usar-lo a Catalunya (Barlow i Philp, 2005).

1. **Definició d'emplaçaments contaminats:** Cal establir definicions acotades i coherents de sòls contaminats, amb valors límit de contaminació per hidrocarburs basat en criteris de toxicitat.
2. **Valoració del risc potencial:** s'han d'identificar els punts amb risc potencial, així com valorar la toxicitat, exposició i la probabilitat d'ocurrència d'accidents
3. **Caracterització de l'emplaçament:** crear informació basada en estudis previs i completar-los amb tècniques d'investigació que informen sobre la geologia i hidrogeologia. Es pot basar en guies existents. A Catalunya existeixen diverses guies de l'ACA sobre actuacions en sòls contaminats (ACA, 2017). Si es decideix investigar l'emplaçament perquè la informació anterior no és suficient, es poden

usar tècniques intrusives, basades en perforacions, o tècniques indirectes. En els casos en els que es sospita de contaminació d'aigües subterrània o bé el sòl és molt porós, caldrà monitoritzar la migració dels contaminants a partir de pous de monitorització.

4. **Quantificació del problema:** A través de les determinacions anteriors es podrà quantificar el grau de contaminació de la matriu ambiental, tenint en compte les variables analitzades. En aquest punt són bàsiques les eines legislatives, que determinen si l'emplaçament sobrepasa els límits permesos o no.
5. **Elaboració de propostes:** Amb la informació recollida cal elaborar un informe final relatiu a la caracterització del sòl. Seguidament es realitzaran propostes per dur a terme projectes de bioremediació, que es valoraran en funció dels objectius i costos.
6. **Disseny del projecte de bioremediació:** Cal ponderar l'objectiu del projecte, els impactes ambientals associats, el temps de duració del projecte, l'eficiència (relació cost-efectivitat) i els factors locals tals com l'acceptació i regulacions. Un cop es tiri endavant el projecte, primerament s'ha de comprovar que l'estratègia és viable mitjançant proves pilot.

4.3. Consideracions finals

L'anàlisi dels casos de vessaments massius de petroli permet concloure que el model de globalització en el qual estem immersos té molts riscos associats. El model d'extracció basat en el consum massiu de petroli com a font primària d'energia provoca que grans empreses transnacionals es beneficiïn d'un recurs natural valorat com a font d'ingressos, a costa dels drets humans i ambientals. D'altra banda, la dependència mundial del petroli ha fet que s'estableixin un entramat de xarxes marítimes de transport de petroli, ja que aquesta via és la més econòmica. El risc potencial d'accident que hi ha al medi marí augmenta quan les bases del neoliberalisme també s'introdueixen en la manera de transportar el petroli. Els petrolers són un entramat jurídic i financer poc transparent, on el capità està condicionat per l'armador, que a l'hora forma part de l'empresa petrolera. Resumint, la imposició mundial de l'oligopoli que gestiona els combustibles fòssils fa que els vessaments de petroli siguin quelcom freqüent.

També es conclou que la capacitat política i legislativa de gestió dels programes de bioremediació és clau per fer que aquesta eina sigui eficient. De tots els casos analitzats es pot criticar la falta de coneixement previ a l'accident. Tots els estudis científics consultats són posteriors als vessaments i, conseqüentment, la majoria d'estratègies de bioremediació que es van adoptar no atenen a les característiques de l'accident, sinó que es decideixen en funció del cost final i la rapidesa que comporta un accident massiu de petroli. Per sort o per desgràcia, els diferents accidents mundials han anat generant coneixement i cada vegada les estratègies de bioremediació que es prenen són més coherents i atenen a les necessitats ambientals. No obstant això, la investigació en zones amb risc d'accident ha de prosperar. La utilització de protocols proactius permetrà assolir un ordre lògic d'actuació que aniria de la recerca de laboratori, a proves pilot i finalment projectes de bioremediació a escala real.

5. Conclusions

1. Microorganisms capable of degrading petroleum hydrocarbons need to be present in order for bioremediation to be used.
2. The Mediterranean climate facilitates the growth of microorganisms able to biodegrade hydrocarbons. Therefore, bioaugmentation is dismissed as a viable bioremediation strategy in Catalonia.
3. Abiotic factors such as temperature, pH, redox potential and the concentration of nutrients must be between the optimal levels which microorganisms need to metabolize petroleum hydrocarbons.

4. The chemical properties and the bioavailability will determine the strategies to be applied.
5. The success of bioremediation depends on the ability to establish and maintain favorable conditions for biodegradation.
6. The characterization of contaminated sites is the most important step in order to choose which bioremediation strategy to use when addressing a large oil spill in Catalonia.
7. The factors that determine which bioremediation strategy to use are: cost of technology, the geological characteristics of the site, the chemical characteristics of petroleum compounds and the desired degree of restoration to be achieved.
8. Socio-political willingness is necessary in order for bioremediation strategies to evolve to into an economically sustainable solution.
9. The most effective way to approach a large oil spill in Catalonia is to establish a proactive protocol which meets the following requirement: to characterize the type of oil and environmental needs required to promote biodegradation of petroleum hydrocarbons.

Bibliografia

- Abenchara, M.D., i Castro, M.A. (2015). Derrames de Hidrocarburos en Canarias (treball final de grau). Recuperat de <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/855/Prospecciones%20Petroliferas%20en%20Canarias.pdf?sequence=1>
- Agència Catalana de l'Aigua. (2017). Aqüífers. Recuperat de http://aca-web.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca?_nfpb=true&_pageLabel=P1228454461208201643696
- Agència Catalana de l'Aigua. (2017). Guies tècniques. Recuperat de http://aca-web.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca?_nfpb=true&_pageLabel=P2340032971261653986667&_nfls=false
- Acosta-González, A., Abercron., S.M., Rosselló-Móra, R., Wittich, R. M., i Marqués, S. (2015). The effect of oil spills on the bacterial diversity and catabolic function in coastal sediments: a case study of the Prestige oil spill. *Environmental Science Pollution*, 22, 15200-15214. doi: 10.1007/s11356-015-4458-y.
- Agrawal, A., i Gieg, L.M. (2013). In situ detection of anaerobic alkane metabolites in subsurface environments. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1-11. doi: 10.3389/fmicb.2013.00140.
- Andersson, J.T., i Achten, C. (2015). Time to say goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an up-to-date use of PACS for environmental purposes. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 35(2), 330-354. doi: 10.1080/10406638.2014.991042.
- Araqués, J., i Fontcuberta, M. (2006). *Hidrocarburs aromàtics policíclics en els aliments* (Agència de Salut Pública de Barcelona Informe 03/1627). Recuperat de http://www.aspb.cat/wp-content/uploads/2016/07/hidrocarburs_aromatics.pdf
- Atlas, R.M. (2011). Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. *Environmental Science & Technology*, 45, 6709-6715. doi: 10.1021/es2013227.
- Atlas, R.M., i Bragg, J. (2009). Bioremediation of marine oil spills: when and when not-the Exxon Valdez experience. *Microbial Biotechnology*, 2(2), 213-221. doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00079.x
- Azubuike, C.C., Chikere, C.B., i Okpokwasili, G.C. (2016). Bioremediation techniques-classification base on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 32, 180-198. doi: 10.1007/s11274-016-2137-x
- Bacosa, H. P., Erdner, D. L., i Liu, Z. (2015). Differentiating the roles of photooxidation and biodegradation in the weathering of Light Louisiana Sweet crude oil in surface water from the Deepwater Horizon site. *Marine Pollution Bulletin*, 95, 265-272. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.04.005.
- Baldrian, P. (2008). White-rot fungi in bioremediation: ecology in the soil environment. *4th European Bioremediation Conference*. Recuperat de <http://www.srcosmos.gr/srcosmos/showpub.aspx?aa=11300>.
- Barlow, L.R., i Philp, J.C. (2005). Suspicions to solutions: Characterizing contaminated land. En Atlas, M.R. (ed.), i Philp, J. (ed.), *Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-World* (p. 49-85). Washington: ASM Press.
- Beaudoin, D.J., Carmichael, C.A., Nelson, R.K., Reddy, C.M., Teske, A.P., i Edgcomb, V.P. (2016). Impact of protist on a hydrocarbon-degrading bacterial community from deep-sea Gulf of Mexico sediments: A microcosm study. *Deep-sea Research II*, 129, 350-359. doi: 10.1016/j.dsr2.2014.01.007.
- Beggs, H.D., i Robinson, J.R. (1975). Estimating the Viscosity of Crude Oil Systems. *Society of Petroleum Engineers*, 27, 9-11. doi:10.2118/5434-PA.
- Bernabeu, A.M., Fernández, S., Bouchette, F., Rey, D., Arcos, A., Bayona, J.M., i Albaiges, J. (2013). Recurrent arrival of oil to Galician coast: The final step of the Prestige deep oil spill. *Journal of Hazardous Materials*, 250, 82-90. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.01.057.
- Brakstad, O.G., Nordtug, T., i Throne-Holst, M. (2015). Biodegradation of dispersed Macondo oil in seawater at low temperature and different oil droplet sizes. *Marine Pollution Bulletin*, 93, 144-152. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.02.006.
- British Petroleum p.l.c. (2016). *BP Statistical Review of World Energy 2016*. Recuperat de <https://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/energy-economics/statistical-review-2016/bp-statistical-review-of-world-energy-2016-full-report.pdf>

- Brown, D.M., Okoro, S., Gils, J.V., Spanning, R.V., Bonte, M., Hutchings, T., Linden, O., Egbuche, U., Brunn, K.B., i Smith, J.W.N. (2017). Comparison of landfarming amendments to improve bioremediation of petroleum hydrocarbons in Niger Delta soils. *Science of the Total Environment*, 569, 284-292. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.04.072.
- Bordons, A., i Constantí, M. (1999). *Introducció a al biotecnologia ambiental: solucions als problemes ambientals mitjançant sistemes biològics*. Tarragona: Universitat Rovira i Virgili.
- Scoma, A., Yakimov, M.M., i Boon, N. (2016). Challenging Oil Bioremediation at Deep-Sea Hydrostatic Pressure. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1203-1217. doi: 10.3389/fmicb.2016.01203.
- Botello, A.V. (2005). Características, composición y propiedades fisicoquímicas del Petróleo. En Botello, A. V. (ed.), Rendon Von Osten, J. R. (ed.), Gold-Bouchot, G. (ed.), i Agraz-Hernández, C. (ed), *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias* (2a ed., p. 261-269). México: Universidad Autónoma de Campeche.
- Boufadel, M.C., Geng, X., i Short, J. (2016). Bioremediation of the Exxon Valdez oil in Prince William Sound beaches. *Marine Pollution Bulletin*, 113, 156-164. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.08.086.
- Boufadel, M.C., i Bobo, A.M. (2010). Feasibility of High Pressure Injection of Chemicals into the Subsurface for the Bioremediation of the Exxon Valdez Oil. *Ground Water Monitoring & Remediation*, 31, 59-67. doi: 10.111/j1745-6592.2010.01320.x.
- Bulon, J. (2003). Una visión desde la historia: A costa da Morte. En Fundación Santiago Rey Fernández-Latorre (ed.), *La huella del fuel: Ensayos sobre el "Prestige"* (p. 10-41). A Coruña: Fundación Santiago Rey Fernández-Latorre.
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas. (2005). Mediterráneo: La cuenca mediterránea. Recuperat de <http://www.icm.csic.es/icmdivulgant/antic/es/mediterraneo-mare-nostrum-02.htm>
- Csuros, C., i Csuros, M. (1999). *Micobiological examination of water and wastewater*. USA: Lewis Publishers.
- Ejehi, B., i Ozochi, C.A. (2015). Assessment of the physicochemical and microbiological status of western Niger Delta soil for crude oil pollution bioremediation potential. *Environmental Monitoring Assessment*, 187(369), 1-11 doi: 10.1007/s10661-015-4598-z.
- Ezenne, G.I., Nwoke, O.A., Ezikpe, D.E., Obalum, S.E., i Ugwuishiwu, B.O. (2014). Use of poultry droppings for remediation of crude-oil-polluted soils: effects of application rate on total and poly-aromatic hydrocarbon concentrations. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 92, 57-65. doi: 10.1016/j.ibiod.2014.01.025.
- Fernández-Álvarez, P., Vila, J., Garrido-Fernández, J.M., Grifoll, M., Lema, J.M., i Feijoo, G. (2007). Evaluation of biodiesel as bioremediation agent for the treatment of the shore affected by the heavy oil spill of the Prestige. *Journal of Hazardous Materials*, 147, 914-922. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.01.135.
- Fernández-Álvarez, P., Vila, J., Garrido-Fernández, J.M., Grifoll, M., i Lema, J.M. (2006). Trials of bioremediation on a beach affected by the heavy oil spill of the Prestige. *Journal of Hazardous Materials*, 137, 1523-1531. doi: 10.1016/j.jhazmat.2006.04.035.
- Gallego, J.R., González-Rojas, E., Peláez, A.I., Sánchez, J., García-Martínez, M.J., Ortiz, J.E., Torres, T., i Llamas, J.F. (2006). Natural attenuation and bioremediation of Prestige fuel oil along the Atlantic coast of Galicia (Spain). *Organic Geochemistry*, 37, 1869-1884. doi: 10.1016/j.orggeochem.2006.07.022.
- González-Rojas, E.H. (2011). Concepto y estrategias de biorremediación. *Tendencias en la Ingeniería*, 1, 21-29. Recuperat de <http://csifesvr.uan.edu.co/index.php/ingean/article/view/96>
- Guo, Q., Li, H., Boufadel, M.C., i Liu, J. (2014). A field experiment and numerical modeling of a tracer at a gravel beach in Prince William Sound, Alaska. *Hydrogeology Journal*, 22, 1795-1805. doi: 10.1007/s10040-014-1184-3.
- Haritash, A.K., i Kaushik, C.P. (2016). Degradation of low molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by microorganisms isolated from contaminated soil. *International Journal of Environmental Sciences*, 6(4), 472-482. doi: 10.6088/ijes.6053.
- Haritash, A.K., i Kaushik, C.P. (2009). Biodegradation aspects of PAHs: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169, 1-15. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.03.137.
- Horel, A., Mortazavi, B., i Sobocky, P.A. (2014). Biostimulation of weathered MC252 crude oil in northern Gulf of Mexico sandy sediments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 93, 1-9. doi: 10.1016/j.ibiod.2014.04.025.
- International Maritime Organization. (2016). Introducció a la OMI. Recuperat de <http://www.imo.org/es/about/paginas/default.aspx>
- Institut d'Estadística de Catalunya. (2017). Aigua del mar: Temperatura mitjana a diferents fondàries. Recuperat de <http://www.idescat.cat/pub/?id=aec&n=218>
- Institut Català de l'Energia. (s.d). Petrolis i derivats. Recuperat de <http://icaen.gencat.cat/ca/energia/formes/petroli/>
- Keith, L.H. (2014). The source of U.S.A EPA's sixteen PAH priority pollutants. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 35(4), 147-160. doi: 10.1080/10406638.2014.892886.
- Kenney, J.F., Kutcherov, V.A., Bendeliani, N.A., i Alekseev, V.A. (2002). The evolution of multicomponent systems at high pressures: VI. The thermodynamic stability of the hydrogen-carbon system: The genesis of hydrocarbons and the origin of petroleum. *National Academy of Sciences of the U.S.A*, 99(17), 10976-1098. doi: 10.1073/pnas.172376899.
- Kleindienst, S., Seidel, M., Ziervogel, K., Grim, S., Loftis, K., Harrison, S., Malkin, S.Y., Perkins, M.J., Field, J., Sogin, M.L., Dittmar, T., Passow, U., Medeiros, P.M., i Joye, S.B. (2015). Chemical dispersants can suppress the activity of natural oil-degrading microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (48), 14900-14905. doi: 10.1073/pnas.1507380112.
- King, R. B., Long, G.M., i Sheldon, J.K. (1997). *Practical environmental bioremediation, the field guide*. New York: Lewis Publishers.
- Liu, J., Bacosa, P., i Liu, Z. (2017). Potential Environmental Factors Affecting Oil-Degrading Bacterial Populations in Deep and Surface Waters of the Northern Gulf of Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2131-2145. doi: 10.3389/fmicb.2016.02131.
- Li, H., i Boufadel, M.C. (2011). A tracer study in an Alaskan gravel beach and its implications on the persistence of the Exxon Valdez oil. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 1261-1269. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.03.011.

- Lors, C., Ryngaert, A., Diels, L., Damidot, D., i Périe, F. (2010). Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. *Chemosphere*, 81(19), 1263-1271. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.09.021.
- Lu, X.L., Zhang, T., i Fang, H.H. (2011). Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Applied Microbiology Biotechnology*, 89, 1357-1371. doi: 10.1007/s00253-010-3072-7.
- Lladó, S. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas* (tesi doctoral). Recuperat de <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42417>
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., i Clark, P.D. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos* (12a ed.). Madrid: Pearson.
- Menzie, C.A., Potocki, B.B., i Santodonato, J. (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science Technology*, 26(7), 1.278-1.284. doi: 10.1081/GNC-120016203.
- Meyer, W., Seiler, T.B., Reininghaus, M., Schwarzbauer, J., Püttmann, W., Hollert, H., i Achten, C. (2013). Limited waterborne acute toxicity of native polycyclic aromatic compounds from coal of different types compared to their total hazard potential. *Environmental Science Technology*, 47(20), 11766-11775. doi: 10.1021/es401609n.
- Mulet, M., David, Z., Nogales, B., Bosch, R., Lalucat, J., i García-Valdés, E. (2011). Pseudomonas Diversity in Crude-Oil-Contaminated Intertidal Sand Samples Obtained after the Prestige Oil Spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 1076-1085. doi: 10.1128/AEM.01741-10.
- Nwankwegu, A.S., Orji, M., i Onwosi, C.O. (2016). Studies on organic and in-organic biostimulants in bioremediation of diesel-contaminated arable soil. *Chemosphere*, 162, 148-156. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.07.074.
- Repsol. (2017). Nuestras Instalaciones. Recuperat de https://www.repsol.com/es_es/tarragona/sobre-el-complejo/nuestras-instalaciones/
- Obiakalaje, U.M., Makinde, O.A., i Amakoromo, E.R. (2015). Bioremediation of crude oil polluted soil using animal waste. *International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation*, 3(3), 79-85. doi: 10.12691/ijebb-3-3-2.
- Peláez, A.I., Lores, I., Sotres, A., Méndez-García, C., Fernández-Velarde, C., Santos, J.A., Gallego, J.L.R., i Sánchez, J. (2013). Design and field-scale implementation of an "on site" bioremediation treatment in PAH-polluted soil. *Environmental Pollution*, 181, 190-199. doi: 10.1016/j.envpol.2013.06.004.
- Philp, J.C., i Atlas, R. M. (2005). Bioremediation of Contaminated Soils and Aquifers. En Atlas, M. R. (ed.), i Philp, J. (ed.), *Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-World* (p. 139-236). Washington: ASM Press.
- Philp, J.C., Bamforth, S., Singleaton, I., i Atlas, M.R. (2005). Environmental Pollution and Restoration: a Role for Bioremediation. En Atlas, M.R. (ed.), i Philp, J. (ed.), *Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-World* (p. 1-48). Washington: ASM Press.
- Prommer, H., i Andrew, D.A. (2005). Modeling Bioremediation of Contaminated Groundwater. En Atlas, M.R. (ed.), i Philp, J. (ed.), *Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-World* (p. 108-138). Washington: ASM Press.
- Prince, R., i Atlas, R.M. (2005). Bioremediation of Marine Oil Spills. En Atlas, M.R. (ed.), i Philp, J. (ed.), *Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-World* (p. 269-292). Washington: ASM Press.
- Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental, BOE 219 9805 (2015).
- Real Decreto 102/2011, de 28 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire, BOE 25 9574 (2011).
- Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados, BOE 15 895 (2005).
- Ron, E.Z., i Rosenberg, E. (2014). Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 191-194. doi: 10.1016/j.copbio.2014.02.004.
- Sam, K., Coulon, F., i Prpich, G. (2017). Management of petroleum hydrocarbon contaminated sites in Nigeria: Current challenges and future direction. *Land Use Policy*, 64, 133-144. doi: 10.1016/j.landusepol.2017.01.051.
- Schmidt, C. (2012). Exxon Valdez Vs. Deepwater Horizon: ES&T's Top Feature Article. *Environmental Science & Technology*, 46, 3603-3604. doi: 10.1021/es300714t.
- Simister, R.L., Poutasse, C.M., Thurston, A.M., Reeve, J.L., Baker, M.C., i White, H.K. (2015). Degradation of oil by fungi isolated from Gulf of Mexico beaches. *Marine Pollution Bulletin*, 100, 327-333. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.08.029.
- Sueiro, R.A., Garrido, M.J., i Araujo, M. (2011). Mutagenic assessment of Prestige fuel oil spilled on the shore and submitted to field trials of bioremediation. *Science of the Total Environment*, 409, 4973-4978. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.08.017.
- Torlapati, J., i Boufadel, M.C. (2014). Evaluation of the biodegradation of Alaska North Slope oil in microcosmos using the biodegradation model BIOB. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-15. doi: 10.3389/fmicb.2014.00212.
- United States Environmental Protection Agency, Centers for Disease Control and Prevention. (2009). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Fact Sheet (PAHs)*. Recuperat de <https://www.epa.gov/north-birmingham-project/polycyclic-aromatic-hydrocarbons-pahs-fact-sheet>
- Venosa, A.D., Campo, P., i Suidan, M.T. (2010). Biodegradability of Lingering Crude Oil 19 Years after the Exxon Valdez Oil Spill. *Environmental Science Technology*, 44, 7613-7621. doi: 10.1021/es101042h.
- Warr, L.N., Friese, A., Schwarz, F., Schauer, F., Portier, R.J., Basirico, L.M., i Olsen, G.M. (2016). Experimental study of clay-hydrocarbon interactions relevant to the biodegradation of the Deepwater Horizon oil from the Gulf of Mexico. *Chemosphere*, 162, 208-221. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.07.076.
- Zabbey, N., Kabari, S., i Aداugo, T.O. (2017). Remediation of contaminated lands in the Niger Delta, Nigeria: Prospects and challenges. *Science of the Total Environment*, 586, 952-965. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.075.
- Zhao, Y., Hong, B., Fan, Y., Wen, M., i Han, X. (2014). Accurate analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkylated PAHs homologs in crude oil for improving the gas chromatography/mass spectrometry performance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 100, 242-250. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.10.018.