



***INFLUENCIA DE BIOESTIMULANTES  
SOBRE LA ACCESIBILIDAD  
MICROBIANA DE HIDROCARBUROS  
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS***

Memoria que presenta

M<sup>a</sup> del Carmen Tejeda Agredano

para optar al título de Doctora en Química

Sevilla, Diciembre de 2011



# **INFLUENCIA DE BIOESTIMULANTES SOBRE LA ACCESIBILIDAD MICROBIANA DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS**

Visado en Sevilla, a      de Diciembre de 2011.

## **LOS DIRECTORES**

Director Dr D. José Julio Ortega Calvo	Co-director Dr. D. Manuel Cantos Barragán
Investigador científico del CSIC	Científico titular del CSIC
Departamento de Agroquímica y Conservación de Suelos del IRNAS	Departamento de Biotecnología Vegetal del IRNAS

## **EL TUTOR**

Dr. D. Antonio Jordán López  
Profesor contratado doctor  
Departamento de Edafología y Química  
Agrícola de la Facultad de Química,  
Universidad de Sevilla

Memoria que presenta: D. M<sup>a</sup> del Carmen Tejeda Agredano para optar al      grado  
de Doctora en Química



DOCTOR D. Jose Manuel Pardo Prieto DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada "***Influencia de bioestimulantes sobre la accesibilidad microbiana de hidrocarburos aromáticos policíclicos.***", presentada por D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> del Carmen Tejeda Agredano para optar al grado de Doctor en Química, ha sido realizada en el Departamento de Agroquímica y conservación de suelos, bajo la dirección de los Drs. D. José Julio Ortega Calvo y D. Manuel Cantos Barragán reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

En Sevilla, a      de Diciembre de 2011.



El presente trabajo se ha realizado en el marco del proyecto CGL2007-64199 del Plan Nacional de I +D (CYCIT), dentro del Programa Nacional de Formación de Personal Investigador (FPI).





# *Agradecimientos*

Quisiera expresar mis agradecimientos a todos los que de una forma más o menos directa, han contribuido a la realización de mi *Tesis Doctoral*.

Muchísimas gracias al Dr. José Julio Ortega Calvo por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y poder desarrollar mis conocimientos en este ámbito. Gracias por su labor como director de esta tesis y por saber transmitir sus conocimientos tan necesarios para mi formación. Sinceramente, gracias.

Al Dr. Manuel Cantos Barragán por co-dirigir esta *Tesis Doctoral*. Gracias por su apoyo, tanto por sus correcciones como por sus charlas. Muchas gracias por introducirme en su grupo, al cual también le quiero hacer partícipe de mis agradecimientos. A María del Mar y Javier, siempre me acordaré del congreso en Murcia.

Gracias al Dr. Antonio Jordán López por aceptar ser el tutor de esta *Tesis Doctoral* y facilitarme en todo momento el desarrollo de la misma.

Debo de agradecer también al Dr. D. José Manuel Pardo Prieto, director del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla por las facilidades prestadas para realizar esta Tesis.

Agradecer a Philipp Mayer, por hacer posible mis estancias en su centro, en NERI, Roskilde (Dinamarca). Muchas gracias por introducirme al apasionante mundo del passive dosing, gracias por su calidad humana y la de su grupo de investigación por acogerme y tratarme como uno más. Muchas gracias a Marguit, Kilian, Stin, Geoffrey, Tina, Tea, Naja y sobre todo a Varvara. También a ti, Eli que te conocí allí y hemos pasado unos momentos inolvidables junto a Maria y Almu.

Gracias tanto a la Dra. Magdalena Grifoll como a su grupo de investigación de la Universidad de Barcelona, Departamento de Microbiología, gracias a Sara y Kim por vuestra colaboración.

También a mis compañeros del Irnas. A los que ya no están, como José Luis, espero que te vaya bien en tu nueva vida. A Nadine y José Luís (el rubio), aunque fue un corto paso por el laboratorio, nos dejasteis huella. A mis compis de la cuarta, ¡¡esa cuarta buena!! Os voy a nombrar a todos los que han sido partícipes de nuestro pequeño saloncito-comedor, perdonadme si se me escapa alguno: A Carmen, Rosa, Bea, Mari Ángeles, Anabel, Marian, Felipe, Torres, Alfonso, Celia, Sherin, Montero, Maite, Cristina..., chicos tengo que ser breve, así que, gracias por los buenos momentos, por esas largas tertulias durante el almuerzo y fuera del Irnas.

En especial a mis compis de laboratorio (Celia, Eleonora y Rungroch) con los que me llevo genial, gracias por haberos conocido y compartido estos momentos tan intensos durante la elaboración de nuestras Tesis, ha sido un largo camino pero: We can do it.

Gracias a mis amigos tanto a mi pandilla piñera de Córdoba (nombraros a todos sería como escribir otra tesis, vosotros sabéis quienes sois), como a mis amigos cordobeses adoptados en Plasencia (Carlos y Mónica), como a mis compis de la carrera (Tejera, de la Torre y María del Mar especialmente). Gracias chicos por aguantarme, tanto en los momentos más tensos como en los de risas y alegría colectiva.

Quiero hacer una especial mención a mi familia: a mis padres, José y Magdalena, que les debo todo lo que soy y lo que tengo. Gracias por enseñármelo todo en la vida. Os quiero. Gracias a mis hermanos mayores, Rocío y José F<sup>co</sup>, habéis sido un buen ejemplo a seguir. Gracias por estar a mi lado incluso en la distancia y gracias por darme esos sobrinos que me dan la vida cuando los veo. Os quiero a todos.

Gracias a los padres de Dani, Maribel y Antonio, tanto por el cariño como por el apoyo recibido. Gracias a Alvaro y Elena por esos ratitos

buenos jugando al trivial entre otros. Gracias de corazón, este pasito será algo más para celebrar juntos.

Y por último, pero no el menos importante, a mi compañero de toda la vida. Gracias Dani por formar parte de mi mundo, por saber apoyarme en cualquier momento, eres mi pilar, la base de los cimientos que estamos construyendo en este largo caminar. Juntos hemos conseguido nuestros sueños y conseguiremos muchísimos más, entre los dos sabemos que podemos. Por estar siempre a mi lado, tanto en los buenos como en los malos momentos, gracias por hacerme ver las cosas más sencillas. Gracias por ser mi isla perdida (José Saramago). Nos espera un futuro lleno de ilusión porque nos tenemos el uno al otro. "Together we are invincible" (Muse). TQM.

¡Gracias a todos!



# *Prefacio*

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son contaminantes orgánicos clasificados como tóxicos, mutagénicos y cancerígenos que normalmente se encuentran acumulados en suelos que han sido contaminados con petróleo, creosota o alquitrán de hulla. Los HAPs con 4 o menos anillos de benceno pueden ser utilizados como fuente de carbono y de energía por un amplio rango de microorganismos, mientras que la degradación de HAPs de alto peso molecular (más de 4 anillos) es normalmente a través de cometabolismo. No obstante, la baja solubilidad en agua de todos ellos y su gran capacidad de adsorción limitan su accesibilidad microbiana y restringen su biodegradación en suelos.

En esta tesis se plantean varias estrategias para mejorar la accesibilidad microbiana de los HAPs en diferentes escenarios basándonos en tratamientos de bioestimulación. Para cada escenario se utilizó un bioestimulante diferente porque para que se produzca una biorremediación exitosa, cada técnica o método de mejora ambiental se tiene que adaptar a las necesidades del emplazamiento o acuífero a descontaminar.

El primer bioestimulante estudiado en esta tesis fue un fertilizante oleofílico de liberación lenta, conocido como S-200. Este fertilizante oleofílico se utilizó para la biorremediación del vertido de fuel ocasionado por el accidente del petrolero Prestige en las costas gallegas (2002). Existen numerosos artículos que confirman que debido a la presencia de estos bioestimulantes oleofílicos, la biodegradación de los HAPs aumenta pero pocos de ellos explican los mecanismos de actuación de estos bioestimulantes, y en concreto, cómo afectan estos bioestimulantes a la accesibilidad microbiana. Por esta causa se estudiaron tanto su efecto sobre la biodegradación de HAPs presentes en NAPLs (fases no acuosas) como la interacción NAPL-bioestimulante-

microorganismo para el aumento de la bioaccesibilidad como primera línea de investigación en la elaboración de esta tesis.

Uno de los componentes principales que forman el S-200 es el ácido oleico que es un ácido graso. Los ácidos grasos son compuestos que suelen estar presentes en los exudados de las raíces de las plantas y se han escrito numerosos artículos donde se ha demostrado que la presencia de estas sustancias producen una mejora en la degradación de HAPs, por lo que se decidió estudiar la influencia de exudados de plantas como bioestimulantes para la biodegradación de suelos contaminados por creosota. Se empleó tanto la producción artificial de exudados de raíces de plantas *in vitro* como experimentos en invernadero para conocer los mecanismos de actuación del conjunto formado por las raíces y sus exudados sobre la accesibilidad microbiana de los microorganismos autóctonos del suelo contaminado.

Después de una búsqueda bibliográfica exhaustiva sobre las especies fitorremediadoras, se decidió producir exudados de tres especies capaces de eliminar contaminantes orgánicos del suelo, que fueron *Festuca arundinacea*, *Lolium perenne* y *Helianthus annuus*. Tras los resultados del contenido de carbono orgánico disuelto obtenidos de los análisis de los exudados de cada una de las especies (como veremos en el desarrollo de esta Tesis Doctoral) y la fácil manipulación del girasol, se eligió esta especie para poder estudiar en profundidad su capacidad sobre la biodisponibilidad de los HAPs presentes en la creosota, así como intentar encontrar una clara visión de los mecanismos que se producen en la rizosfera de esta planta como segunda línea de investigación.

Muchas investigaciones afirman que los contaminantes orgánicos se adsorben a coloides naturales, siendo menos accesibles para los microorganismos por lo que estos compuestos cuando son fuertemente retenidos, presentan una mayor persistencia en el medio ambiente y se trata de un gran desafío para la remediación de suelos contaminados (Alexander, 1999). Por otra parte, existe otra vertiente donde

se demuestra que la adsorción no inhibe sino que mejora aún más la biodegradación de compuestos sorbidos. Esta problemática dio lugar a que los siguientes compuestos en estudio fueran las sustancias húmicas que se encuentran presentes en el suelo, como tercera línea de investigación. En esta línea, se estudió el efecto de la asociación entre el contaminante en su estado puro (evitando mezclas complejas como fuel o creosota) en un medio acuoso saturado y con sustancias húmicas para poder conocer la concentración de contaminante orgánico directamente asimilable por el microorganismo.

Durante el desarrollo experimental de esta tesis se logró combinar ensayos de mineralización y biodegradación con ensayos de reparto entre las fases implicadas.





**ÍNDICE GENERAL**

<i>PREFACIO</i> .....	13
<i>ÍNDICE GENERAL</i> .....	17
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i> .....	22
ÍNDICE DE TABLAS.....	27
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	30
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>33</b>
I.1. INTRODUCCIÓN.....	35
I.2. HAPs: DISTRIBUCIÓN Y TOXICIDAD.....	39
I.3. BIORREMEDIACIÓN: CONCEPTO, TIPOS Y FACTORES LIMITANTES.....	49
I.4. INFLUENCIA DE LOS LÍQUIDOS EN FASE NO ACUOSA (NAPLs) EN LA BIODEGRADACIÓN DE HAPs.....	56
I.5. BIODISPONIBILIDAD, BIOACCESIBILIDAD Y ACTIVIDAD QUÍMICA.....	61
I.6. MÉTODOS DE REPARTO DE HAPs EMPLEANDO POLIDIMETILSILOXANO.....	65
I.7. TÉCNICAS DE BIOESTIMULACIÓN.....	74
I.7.1. Fertilizantes oleofilicos.....	74
I.7.2. Fitorremediación y rizorremediación.....	76
I.7.3. Materia orgánica disuelta: Ácidos húmicos.....	86
<b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS</b> .....	<b>91</b>
<b>CAPÍTULO III. MATERIALES Y METODOLOGÍA</b> .....	<b>95</b>
III.1. REACTIVOS .....	97

III.2. LÍQUIDOS EN FASE NO ACUOSA (NAPLs).....	98
III.3. SUELOS .....	99
III.4. BACTERIAS, MEDIOS, CONDICIONES DE CULTIVO Y PREPARACIÓN DE INÓCULOS.....	101
III.5. ANÁLISIS DE HAPs POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).....	104
III.6. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL FERTILIZANTE OLEOFÍLICO EN LA BIODEGRADACIÓN DE HAPS .....	106
III.6.1. Experimentos de mineralización con el método de la interfase constante.....	106
III.6.2. Experimentos de reparto con el método del área interfásica constante.....	109
III.7. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS RAÍCES DE PLANTAS Y SUS EXUDADOS EN LA BIODEGRADACIÓN DE HAPs .....	110
III.7.1. Producción <i>in vitro</i> de exudados.....	110
III.7.2. Mineralización de pireno en cultivos líquidos en presencia y ausencia de exudados de raíces de girasol.....	115
III.7.3. Ensayo en invernadero .....	116
III.7.4. Extracción de los HAPs del suelo y purificación de la muestra .....	120
III.7.5. Experimentos de mineralización de pireno en suspensiones de suelo contaminado con creosota en presencia y ausencia de exudados de girasol.....	122
III.8. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE ÁCIDOS HÚMICOS EN LA BIODEGRADACIÓN DE HAPS .....	123
III.8.1. Preparación de ácidos húmicos.....	123

III.8.2. Mineralización de pireno y fenantreno en cultivos líquidos en presencia o ausencia de ácidos húmicos .....	123
III.8.3. Experimentos de disolución de pireno en presencia y ausencia de ácidos húmicos. Control de la concentración libre disuelta.....	124
III.9. ENSAYOS CON TÉCNICAS DE DOPAJE PASIVO CON POLIDIMETILSILOXANO.....	127
III.9.1. Preparación de viales con polidimetilsiloxano empleados en dopaje pasivo.....	127
III.9.2. Estudio de la mineralización y disolución de pireno en presencia y ausencia de ácidos húmicos en viales con PDMS128	
III.9.3. Estudio de la difusión de PAHs en presencia de los 3 bioestimulantes empleados en biodegradación.....	130
III.9.4. Ensayos de dopaje pasivo en el estudio de la capacidad extractora de HAPs por los bioestimulantes empleados en biodegradación.....	133
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....</b>	<b>137</b>
IV.1. FERTILIZANTE OLEOFÍLICO .....	139
IV.1.1. Caracterización del fertilizante oleofílico S-200.....	139
IV.1.2. Influencia del fertilizante oleofílico en la biodegradación de los componentes del fuel .....	139
IV.1.3. Estudio del reparto del fenantreno desde los NAPLs	148
IV.1.4. Efecto de las condiciones de agitación y de los nutrientes en la biodegradación.....	155
IV.2. RIZOSFERA Y EXUDADOS DE RAÍZ.....	156
IV.2.1. Caracterización de los exudados de raíz.....	156

IV.2.2. Influencia de la rizosfera de girasol sobre la eliminación de HAPs procedentes de un suelo contaminado con creosota	162
IV.2.3. Influencia de exudados de raíces de girasol sobre la biodegradación de HAPs presentes en un suelo contaminado con creosota.....	168
IV.2.4. Efecto de los exudados de raíces de girasol sobre la biodegradación de pireno .....	173
IV.3. ÁCIDOS HÚMICOS.....	175
IV.3.1. Caracterización de los ácidos húmicos.....	175
IV.3.2. Estudio físico-químico de los HAPs en presencia de ácidos húmicos mediante ensayos de reparto con polidimetilsiloxano.....	176
IV.3.3. Estimación de la velocidad de degradación de fenantreno y pireno en cultivos líquidos en presencia de ácidos húmicos.....	178
IV.3.4. Caracterización de la concentración total y libre disuelta de pireno en presencia de ácidos húmicos.....	185
IV.3.5. Evolución de la concentración de pireno libre disuelta durante su biodegradación en presencia y ausencia de ácidos húmicos.....	190
<b>CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>195</b>
V.1. FERTILIZACIÓN DIRIGIDA DE LA INTERFASE NAPL/AGUA MEDIANTE FERTILIZANTES OLEOFÍLICOS.....	197
V. 2. EFECTO ECOFISIOLÓGICO DE LA RIZOSFERA DEL GIRASOL.....	201
V.3. PAPEL DE LA ACTIVIDAD QUÍMICA EN EL EFECTO BIOESTIMULANTE DE LOS ÁCIDOS HÚMICOS.....	207
V.4. VISIÓN GENERAL Y COMPARACIÓN ENTRE LOS BIOESTIMULANTES UTILIZADOS.....	211

<b>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>217</b>
<b>CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>223</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura I. 1.- Contaminación del suelo en Europa en el año 2006 .....37

Figura I. 2.- Contaminantes presentes en Europa en el año 2006 .....37

Figura I. 3.- Asignación presupuestal del gasto público y privado para la gestión de de emplazamientos contaminados del año 2006.....39

Figura I. 4.- Reparto de los contaminantes hidrófobos desde el NAPL hacia la fase acuosa, en ausencia y presencia de microorganismos.....61

Figura I. 5.- Esquema donde se ilustra la fracción biodisponible y la bioaccesible de un contaminante en el suelo, tal y como se definen estos términos mediante la ubicación física .....63

Figura I. 6.- Esquema de un sistema con varias fases.....675

Figura I.7.- Esquema representativo de la formación de la capa de difusión limitante (UBL) entre la fuente de contaminación y los microorganismos en un medio acuoso.....66

Figura I. 8.- Esquema de los 3 pasos en el proceso de difusión de los PAHs en las microcámaras desde el disco contaminado al disco sin PAHs.....69

Figura I. 9.- Fundamento de la técnica de dopaje pasivo..72

Figura I. 10.- Mecanismos envueltos en la fitorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos.....79

Figura I. 11.- Rizorremediación de HAP.....85

Figura I. 12.- Estructura de los ácidos húmicos.....	87
Figura III. 1.- Emplazamiento contaminado con creosota. Fotos de la zona y del muestreo de suelo. ....	100
Figura III. 2.- Tubos de ensayo de 150 x 25 mm de capacidad para el primer ensayo de cultivo <i>in vitro</i> .....	111
Figura III. 3.- Sistema utilizado para la obtención de exudados de girasol <i>in vitro</i> . ....	113
Figura III. 4.- Diseño experimental del ensayo realizado en invernadero .....	118
Figura III. 5.- Esquema del proceso de extracción y cuantificación de HAPs de suelos.....	121
Figura III. 6.- Viales de dopaje pasivo con PDMS fijados en su base para la mineralización de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de pireno por <i>Mycobacterium gilvum</i> VM552 en presencia de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácidos húmicos extraídos de Santa Olalla, Huelva. ....	129
Figura III. 7.- Sección transversal del diseño experimental de las microcámaras empleadas en el estudio del aumento de difusión en presencia de los diferentes bioestimulantes utilizados. ....	131
Figura IV. 1.- Efecto del bioestimulante oleofílico (S-200) sobre la mineralización de (A) fenantreno, (B) pireno, y (C) fluoranteno presente en fuel/HMN por <i>Mycobacterium gilvum</i> VM552.....	141
Figura IV. 2.- Áreas normalizadas con hopano ( $A/A_{\text{HOP}}$ ) de los n-alcenos ( $m/z$ 85) detectados por el análisis GC-MS en el fuel/HMN residual de los controles abióticos (barras de color negro) y con cultivo de <i>Mycobacterium gilvum</i> VM552 (barras con rayas), con S-200.....	143

Figura IV. 3.- Concentraciones de HAPs recuperadas del NAPL de los controles y matraces inoculados, tanto con o sin bioestimulante S-200.....	144
Figura IV. 4.- Cromatogramas típicos con GC-MS del extracto neutro (arriba) y del ácido (abajo) de las fases acuosas de los cultivos con <i>Mycobacterium gilvum</i> VM552 en la presencia de bioestimulantes con los picos identificados .....	145
Figura IV. 5.- Reparto de fenantreno desde el fuel/HMN en presencia y ausencia del bioestimulante oleofílico S-200148	
Figura IV. 6.- Efecto del bioestimulante oleofílico (S-200) sobre la mineralización del fenantreno presente en el NAPL (fuel/HMN) por <i>Mycobacterium gilvum</i> VM552 en presencia del tensioactivo Brij 35.....	150
Figura IV. 7.- Efecto del bioestimulante oleofílico (S-200) sobre la mineralización de fenantreno presente en diferentes NAPLs puros. ....	152
Figura IV. 8.- Efecto del bioestimulante oleofílico (S-200) sobre la mineralización del fenantreno presente en fuel/HMN libremente, con el área interfacial constante (con cilindros) y añadiendo diferentes nutrientes .....	156
Figura IV. 9.- Sistema radicular de <i>Festuca</i> y <i>Lolium</i> .....	157
Figura IV. 10.- Detalle de la calidad del sistema radicular <i>in vitro</i> de <i>Helianthus</i> , <i>Lolium</i> y <i>Festuca</i> .....	159
Figura IV. 11.- Desarrollo del sistema radicular del girasol en una maceta con suelo contaminado.....	163
Figura IV. 12.- Recuento de poblaciones del suelo contaminado con creosota (mezcla, 1:1) con los diferentes tratamientos realizados en el invernadero.....	162



Figura IV. 13.- Abundancia relativa de los grupos filogenéticos de las eubacterias identificados en los diferentes tratamientos realizados en invernadero..... 167

Figura IV. 14.- Mineralización de <sup>14</sup>C-pireno en suspensiones de suelo contaminado con creosota por bacterias autóctonas, en presencia y ausencia de exudados de raíces de girasol169

Figura IV. 15.- Perfil del DGGE de fragmentos del gen 16S rRNA amplificados con PCR de las suspensiones de suelo contaminado con creosota .....172

Figura IV. 16.- Mineralización de pireno puro en presencia y ausencia de exudados de raíces de girasol.....174

Figura IV. 17.- Mineralización de pireno y de fenantreno a una concentración de 50 µg·mL<sup>-1</sup> en presencia de 100 µg·mL<sup>-1</sup> de ácidos húmicos .....180

Figura IV. 18.- Mineralización de pireno a 50 µg·mL<sup>-1</sup> en presencia y ausencia de ácidos húmicos a 10 µg·mL<sup>-1</sup> Diferenciándose los siguientes tratamientos: sin equilibrar, equilibrando y en presencia de PDMS. ....182

Figura IV. 19.- Estudio de la disolución de 50 µg·L<sup>-1</sup> de pireno a 80 rpm y 25°C: A) concentración de pireno total disuelto, B) concentración de pireno libre disuelto y C) concentración de pireno total con dopaje pasivo.....188

Figura IV. 20.- Concentraciones libres disueltas medidas en la biodegradación de pireno en ausencia y en presencia de 10 µg·mL<sup>-1</sup> de ácidos húmicos por espectrofotómetro sincrónico de fluorescencia.. .....191

Figura IV. 21.- Variación de la intensidad de fluorescencia mediante espectrofotómetro de fluorescencia sincrónica de las medidas de biodegradación en cubeta de pireno a 53.4 ng·mL<sup>-1</sup> y en ausencia (A) y presencia (B) de 10 µg·mL<sup>-1</sup> de ácidos húmicos.....193

Figura IV. 22.- Medidas de pireno disuelto en  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante su biodegradación en cubeta de espectrofluorímetro sincrónico durante un ciclo de 20 minutos.....194

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. 1.- Propiedades físico-químicas y estructurales de los PHA prioritarios .....	43
Tabla I. 2.- Cantidades de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en diferentes fuentes .....	45
Tabla I. 3.- Cantidad de HAPs emitidos por actividad en España en 2009.....	46
Tabla I. 4.- Clasificación de las diferentes técnicas empleadas para tratar los suelos contaminados, agrupadas según su naturaleza y forma de aplicación.....	52
Tabla III. 1.- Propiedades físico-químicas de los NAPLs. ...	98
Tabla III. 2.- Composición por litro de los distintos medios utilizados en esta Tesis Doctoral. ....	103
Tabla III. 3.- Gradiente empleado como fase móvil en el análisis de muestras de reparto.....	104
Tabla III. 4.- Programación del detector de fluorescencia.	105
Tabla III. 5.- Límites de detección y de cuantificación de los HAPs expresados en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . ....	106
Tabla IV. 1.- Tiempos de retención (Tr) y los iones fragmento del espectrómetro de masas para identificar los metabolitos detectados en los extractos neutros de los matraces con <i>Mycobacterium gilvum</i> VM552 con fuel, en presencia y ausencia del bioestimulante oleofílico (S-200).....	146
Tabla IV. 2.- (Continuación de la tabla IV. 1). Tiempos de retención (Tr) y los iones fragmento del espectrómetro de masas para identificar los metabolitos detectados en los extractos ácidos de los matraces con <i>Mycobacterium gilvum</i>	

VM552 con fuel, en presencia y ausencia del bioestimulante oleofílico (S-200) .....	147
Tabla IV. 3.- Efecto del bioestimulante oleofílico S-200 sobre el reparto y mineralización de fenantreno.....	149
Tabla IV. 4.- Efecto del bioestimulante oleofílico S-200 en el reparto y mineralización de fenantreno inicialmente presente en NAPLs puros. ....	154
Tabla IV. 5.- Análisis de los exudados producidos en el primer ensayo de producción <i>in vitro</i> . ....	158
Tabla IV. 6.- Evolución del desarrollo de las plantas de girasol en suelo contaminado con creosota (mezcla 1:1) y suelo control (no contaminado) a los 90 días.....	162
Tabla IV. 7.- Efecto del crecimiento de girasol sobre los HAPs residuales ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) contenidos en el suelo contaminado con creosota en invernadero, después de 45 y 90 días.....	164
Tabla IV. 8.- HAPs residuales después de 240 h de incubación en presencia de microorganismos autóctonos y en presencia de <i>Mycobacterium gilvum</i> VM552 inoculada. En esta tabla se observa el efecto de la presencia de exudados de raíces de girasol. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla IV. 9.- Valores de la relación de velocidades de transferencia de masa $\alpha_x/\alpha_{\text{agua}}$ obtenidos para cada disolución en presencia de ácidos húmicos. ....	177
Tabla IV. 10.- Aumento de la capacidad de los ácidos húmicos por captar los HAPs retenidos en la sílica de los viales de dopaje pasivo, $C_{\text{total}}/C_{\text{libre disuelta}}$ . ....	178
Tabla IV. 11.- Efecto de los ácidos húmicos (AH) en la mineralización de fenantreno y pireno a diferentes concentraciones en cultivos líquidos incubados a 25°C y 80 rpm. ....	179

Tabla IV. 12.- Resultados de los experimentos de biodegradación y disolución comparados con los obtenidos utilizando técnicas de dopaje pasivo.....187

## **LISTA DE ACRÓNIMOS**

AC: Aumento de la Capacidad

AF: Ácidos Fúlvicos

AH: Ácidos Húmicos

ATSDR: Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de Estados Unidos

BTEX: Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno

CEE: Comunidad Económica Europea

CFU: Unidades Formadoras de Colonias

CO: Carbono Orgánico

COD: Carbono Orgánico Disuelto

COH/s: Compuestos Orgánicos Hidrofóbico/s

COT: Carbono Orgánico Total

DEHP: di-2-etilhexil-ftalato

DGGE: Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante

DNAPLs: Fases líquidas No Acuosa Densas

DV: Medio Vid

EEA: European Environment Agency

EPA: Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos

ERG: Exudados de raíces de Girasol

ESD: Equilibrium Sampling Device

HAP/s: Hidrocarburos Aromáticos Policíclico/s

HD: Hexadecano

HMN: 2,2,4,4,6,8,8- heptametilnonano

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

$K_{oc}$ : Coeficiente de reparto sólido-Agua

$K_{ow}$ : Coeficiente de reparto octanol-Agua

MM: Medio de Mineralización

MMNA: Medio de Mineralización Ajustado con Nitrógeno

MOD: Materia Orgánica Disuelta

MSB: Minimal Salts Medium

$\mu_{max}$ : Velocidad específica de crecimiento máxima de los microorganismos

NERI: National Environmental Research Institute

NMP: Técnica del Número Más Probable

NCP: National Oil and Hazardous Substances Pollution Contingency Plan from EEUU

NAPLs: Fases líquidas No Acuosas

OMS: Organización Mundial de la Salud

OTVM: Oficina Técnica de Vertidos Marinos Accidentales

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDA: Partitioning Driven Administering

PDMS: Polidimetilsiloxano

PRTR-España: Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes de España

SH: Sustancias Húmicas

SPME: Microextracción en Fase Sólida

SW: Medio Suiza

Tr: Tiempos de Retención

TSA: Agar, Soja y Triptona

UBL: Ustirred Boundary Layer



# CAPÍTULO I

## *Introducción*

- *“Los imposibles de hoy  
serán posibles mañana”.*

**Konstantin Tsiolkovsky**  
(1857-1935).



## I.1. INTRODUCCIÓN

A través del desarrollo industrial en todo el mundo podemos hacernos idea de la generación de un amplio número de compuestos naturales y sintéticos perjudiciales para el medio ambiente debido a negligencias realizadas en el tratamiento de residuos, vertederos ilegales de desechos industriales provocados tal vez, por ignorancia o falta de recursos y derrames accidentales. Como consecuencia de la producción de estos contaminantes, existen numerosos sitios que requieren una limpieza de estos residuos tanto en suelos, como en lodos o aguas superficiales. Sólo en Estados Unidos se ha calculado alrededor de 1.7 trillones de dólares invertidos en los últimos 30 años para tratar estos lugares contaminados (Yu, 2006).

Por todo ello, se ha desarrollado una conciencia social para establecer una legislación adecuada que reduzca la producción de residuos contaminantes y prevenir el escape de los mismos al medio circundante. Algunos accidentes han supuesto un elevado impacto ambiental como el vertido de combustible del Exxon Valdez, la liberación de productos radiactivos tras el accidente de la central nuclear de Chernobil, la rotura de la presa de Aznalcóllar o la catástrofe ecológica producida por el vertido del petrolero Prestige frente a las costas gallegas. Más recientemente, se ha tenido constancia del derrame de petróleo de uno de los pozos de la empresa British Petroleum (BP) en el Golfo de México y la crisis nuclear en la central de Fukushima tras el terremoto y tsunami en Japón, todos estos desastres ecológicos han puesto de manifiesto la justificada preocupación y alarma que estos temas suscitan en el conjunto de la población y lo mucho que queda por hacer para prevenir o resolver adecuadamente este tipo de situaciones.

El empleo de la biorrecuperación o biorremediación, es decir, la recuperación de terrenos y acuíferos contaminados mediante procesos biológicos, en el tratamiento de residuos peligrosos supone un concepto relativamente nuevo que se está convirtiendo en una tendencia importante y de rápido

crecimiento dentro de la legislación ambiental. Desde 1970, en la gran mayoría de los países industrializados se ha venido dando una gran importancia al tratamiento de emplazamientos contaminados y se ha comprobado que los tratamientos biológicos son más económicos que los procedimientos químicos o físicos (Eweis y col. , 1998).

El campo de actuación para la biorremediación es bastante amplio. Por ejemplo, de las setecientas cincuenta mil instalaciones de depósitos subterráneos de almacenamiento existentes en Estados Unidos, más de trescientas mil han tenido fugas y se producen aproximadamente treinta mil nuevas emisiones cada año. Más de la mitad de estas instalaciones se destinan al almacenamiento de hidrocarburos derivados del petróleo, contaminantes que se han comprobado que son biodegradados con relativa facilidad (Nikolaou y col. , 2009).

Actualmente no se conoce con exactitud el número de emplazamientos tratados mediante biorrecuperación. Se sabe que en California los depósitos de almacenamiento subterráneo con fugas constituyen la mayor fuente de terrenos y aguas subterráneas contaminados. Hasta el 1 de enero de 1991, se ha ubicado más de diecisiete mil de estos depósitos (Wosika, 1991). La gran mayoría de los emplazamientos de los depósitos de almacenamiento subterráneo con fugas eran de productos derivados del petróleo.

La contaminación del suelo en Europa afecta a casi doscientos cincuenta mil espacios, y se espera que continúe creciendo. Se estiman actividades potencialmente contaminantes en cerca de 3 millones de emplazamientos en toda la Unión Europea (UE), muchos de los cuales es preciso seguir investigando para establecer el daño y si se requiere la recuperación del suelo (proceso de limpieza). A pesar de los esfuerzos que se han realizado en algunos países, pasarán décadas para limpiar el legado de la contaminación del suelo. Durante los últimos 30 años, aproximadamente ochenta mil

emplazamientos se han tratado en aquellos países que disponen de medidas de recuperación (Figura I.1).

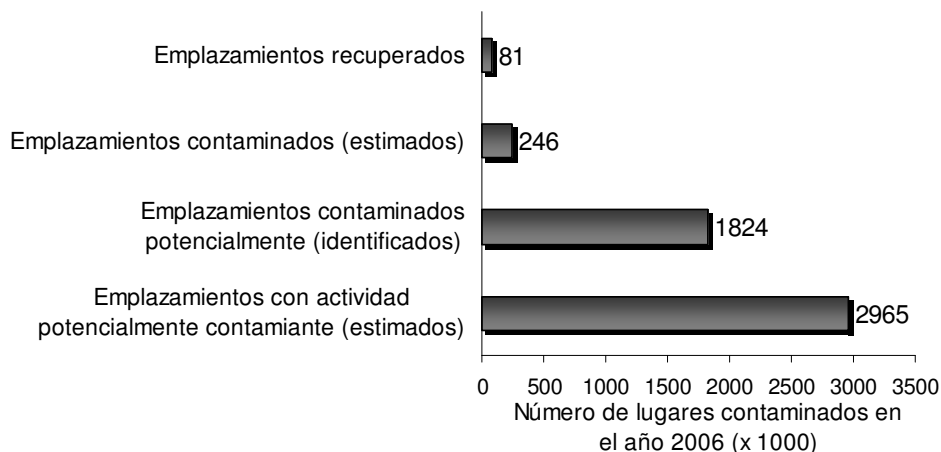


Figura I. 1.- Contaminación del suelo en Europa en el año 2006 (European Environment Agency, 2006).

La Agencia Europea de Medio Ambiente (EEA, siglas en inglés de European Environment Agency) proporcionó datos del 2006 afirmando que los contaminantes más frecuentes encontrados en el suelo son los metales pesados y aceites minerales que son obtenidos en el proceso de refinación del petróleo, siendo estos últimos junto a los hidrocarburos clorados los más frecuentes en aguas subterráneas. Otros contaminantes presentes fueron hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), BTEX (que es el acrónimo de benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) y fenoles (Figura I.2).

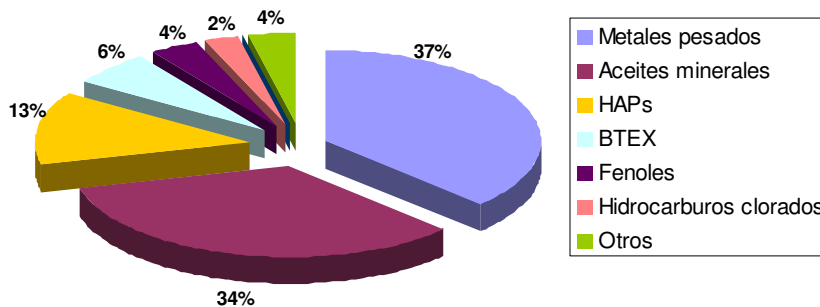


Figura I. 2.- Contaminantes presentes en Europa en el año 2006 (European Environment Agency, 2006).

La limpieza de emplazamientos contaminados es una actividad costosa. Sin embargo, en los países donde las estimaciones son posibles, el gasto anual sigue siendo relativamente pequeño, con promedio del 2% de los costos estimados necesarios para la gestión global de los espacios contaminados. Aunque la mayoría de los países de Europa tienen una legislación para la gestión de emplazamientos contaminados, donde se aplica que "quien contamina paga", se siguen utilizando grandes sumas de dinero público para financiar las actividades de remediación, con un promedio del 35% del gasto total. Esto se debe principalmente al alcance limitado de la legislación, especialmente en el caso de la remediación de la contaminación histórica, donde muchos de los responsables de la contaminación legalmente ya no existen, no pueden ser identificados o son insolventes. Según NICOLE (las siglas en inglés de Network for Industrially Contaminated Land in Europe) se ha destinado para la recuperación de zonas contaminadas a través de los Fondos Estructurales Europeos, un presupuesto total de dos mil doscientos cincuenta millones de euros para los años 2005 al 2013 (Network for Industrially Contaminated Land in Europe, 2009).

Lamentablemente ésta es una tendencia común en toda Europa. La proporción de los fondos públicos utilizados para recuperar emplazamientos contaminados oscila entre el 100% en la República Checa, ex República Yugoslava de Macedonia y en España, siendo un mínimo del 7% en Francia, donde una gran proporción de los fondos proviene del sector privado (Figura I.3). Pero al igual que muchos aspectos de la información del suelo, sólo los datos aproximados sobre el gasto público están disponibles, mientras que la información sobre el gasto privado sigue siendo irregular.

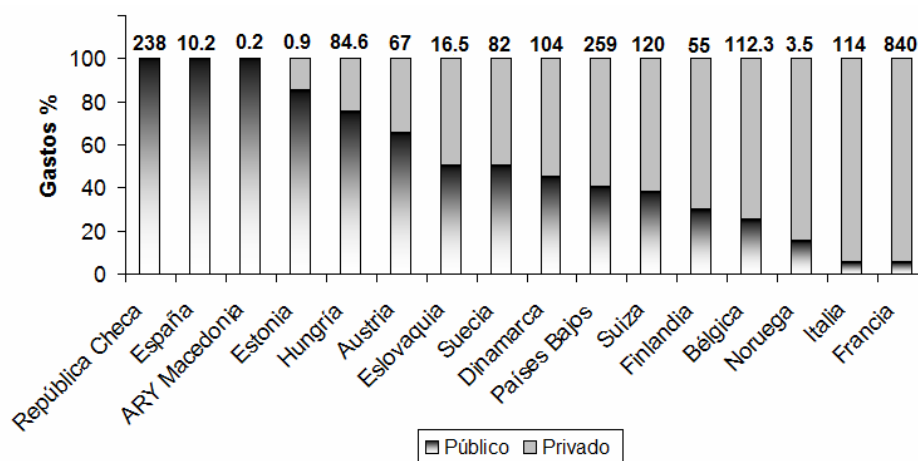


Figura I. 3.- Asignación presupuestal del gasto público y privado para la gestión de de emplazamientos contaminados del año 2006 (European Environment Agency, 2006).

Para reducir los gastos en la recuperación de suelos contaminados, se han estado desarrollando y mejorando técnicas de biorremediación. La mayoría de los HAPs, como por ejemplo, naftaleno, fenantreno, fluoranteno, antraceno, pireno, benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno han sido descritos como una fuente energética de carbono, o bien son degradados cometabólicamente por diversos grupos de bacterias (Miyata y col. , 2004). La biodegradación es una herramienta significativa para eliminar estos contaminantes del medio ambiente, pero su baja disponibilidad hace que sean necesarios estudios centrados en este factor limitante.

## I.2. HAPs: DISTRIBUCIÓN Y TOXICIDAD

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son producidos en diversas operaciones industriales a altas temperaturas tales como el refinado de petróleo, producción de coque y conservación de maderas, también pueden ser sintetizados por algunas plantas o por formación natural durante fuegos en bosques o praderas. Son contaminantes comunes en este tipo de industrias (Wilson y Jones, 1993) y en vertederos incontrolados de residuos peligrosos. También

se pueden encontrar en la atmósfera, medios acuáticos, en el suelo, en la biota, en comidas, etc. (Eiroa y col. , 1998).

Este grupo de compuestos consisten en dos o más anillos de benceno condensados, dispuestos en diferentes configuraciones, pero siempre con la presencia exclusiva de carbono e hidrógeno. Los HAPs raramente suelen encontrarse de manera individual, sino que normalmente se encuentran en forma de mezclas complejas con otros hidrocarburos, lo cual dificulta aún más su eliminación del suelo (Nikolaou y col. , 2009). Son termodinámicamente estables debido a la energía de resonancia asociada a la deslocalización de los electrones  $\pi$  en los anillos bencénicos frente a otros compuestos no aromáticos (Mastandrea y col. , 2005). Estos compuestos aromáticos son el mayor constituyente de la creosota (alrededor del 85% es su contenido en PAHs), que es un producto típico utilizado en la preservación de la madera (Eweis y col. , 1998) y cuyo uso y comercialización se prohibió en España al entrar en vigor la nueva normativa europea (Directiva 2001/90/CE, el 30 de junio de 2003). Esta nueva normativa prohibió el uso y comercialización de maderas tratadas con creosota por el daño que este producto puede ocasionar tanto al medio ambiente como a la salud humana.

Debido a su baja solubilidad y alta hidrofobicidad, los HAPs tienden a adherirse a la superficie de partículas como las constituidas por la materia orgánica del suelo, haciendo que estos compuestos tengan una importante persistencia en condiciones naturales (Bamforth y Singleton, 2005). La adsorción de los HAPs en el suelo se ve afectada por varios factores, de los cuales, los más importantes son las propiedades del compuesto contaminante (estructura molecular y solubilidad en agua) y las propiedades del terreno (contenido en arcillas y materia orgánica, pH, humedad y temperatura).

Organismos oficiales de prestigio científico internacional, incluyendo la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), aseveran la peligrosidad de estos



compuestos, y recomiendan su control, reducción y a ser posible su eliminación. Existe una lista confeccionada por la EPA en la que figuran los 129 compuestos orgánicos que deben ser monitorizados en los vertidos industriales y municipales, dentro de la cual hay recogidos 16 HAPs, que serían los más peligrosos para la salud. Además, son considerados por la EPA, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comunidad Económica Europea (CEE), como contaminantes prioritarios debido a sus efectos carcinogénicos. El benzo(a)pireno está incluido como uno de los 12 compuestos diana en una estrategia de la EPA para controlar la persistencia y bioacumulación de contaminantes tóxicos (Renner, 1999).



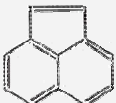


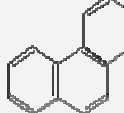
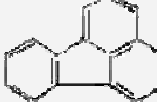
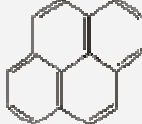
En la Tabla I. 1 aparecen las propiedades físico-químicas y estructurales de 16 HAPs prioritarios, donde se observa la disminución de la volatilidad y la solubilidad en agua a medida que aumenta el peso molecular (Wilson y Jones, 1993). El aumento del número de anillos hace que estos compuestos orgánicos sean menos solubles en agua y se incremente su resistencia a la degradación biológica. El coeficiente de reparto octanol-agua ( $K_{ow}$ ) es una forma de medir la hidrofobicidad de los compuestos químicos orgánicos. Los HAPs tienen un coeficiente relativamente alto, lo cual indica que tienen una afinidad mayor por las partículas orgánicas del suelo que por el agua. El coeficiente de reparto sólido-agua ( $K_{oc}$ ) es un factor a tener en cuenta para saber la tendencia de estos compuestos a ser relativamente inmóviles y persistentes en el suelo. En general, los HAPs de bajo peso molecular (como el naftaleno) son más volátiles, solubles en agua y menos lipofílicos que los compuestos de alto peso molecular. Estas características físicas y químicas determinan en gran medida su comportamiento en el ambiente.

Los HAPs de bajo peso molecular al ser más volátiles, se encuentran principalmente en la fase de vapor en el aire, donde son susceptibles a la descomposición (fotoquímica y térmica), lo que restringe sus tiempos de residencia en la atmósfera a un par de días. Los que no son degradados, son transferidos a aguas superficiales o a suelos por deposición

húmeda o seca en donde también serán más susceptibles a la degradación, sobre todo los HAPs más ligeros.

En el suelo la mayoría de los HAPs quedan fuertemente adsorbidos a la materia orgánica del mismo, y si además tiene un alto contenido en arcilla, este tipo de suelos suelen ser más cohesivos, tener una gran capacidad de retención de agua y una permeabilidad baja. Estas características son un factor limitante en la biorremediación de estos compuestos (Ortega-Calvo y Saiz-Jimenez, 1998; Lahlou y Ortega-Calvo, 1999) porque reducen su biodisponibilidad tanto para ser biodegradados, como para ser absorbidos por las plantas y lixiviados al acuífero. Para cambiar este comportamiento de adsorción, se espera que la solubilidad de HAPs presentes en mezclas de compuestos orgánicos líquidos sea muy diferente de la solubilidad expresada en la forma sólida pura. Las leyes de Raoult pueden predecir adecuadamente la solubilidad de PAHs en mezclas de compuestos orgánicos como diesel, gasolina, alquitrán de hulla y creosota. La solubilidad de los HAPs basada en las leyes de Raoult ha servido como modelo para estudiar con éxito el estado estacionario de las disoluciones de HAPs de mezclas complejas en fase líquida no acuosa (NAPLs) (Rogers y col. , 2002).

Tabla I. 1.- Propiedades fisico-químicas y estructurales de los PHA prioritarios (LaGrega y col. , 1994).

<b>HAP/ Abreviatura/ CAS</b>	<b>Estructura/ Fórmula empírica/PM (g/mol)</b>	<b>Punto de Fusión (°C)</b>	<b>Solubilidad en agua (mg/L)</b>	<b>P° Vapor (Pa)</b>	<b>Log K<sub>ow</sub></b>	<b>Log K<sub>oc</sub></b>
NAFTALENO/ Nap/ 91-20-3	 C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> (128)	81.0	31.69	10.4	3.37	3.11
ACENAFTENO/ Ace/ 83-32-9	 C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> (154)	95.0	3.42	2.9·10 <sup>-1</sup>	4.00	3.65
ACENAFTILENO / Acy/ 208-96-8	 C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> (152)	93.0	3.93	8.9·10 <sup>-1</sup>	3.7	3.4
ANTRACENO/ Ant/ 120-12-7	 C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> (178)	216.4	0.045	8.0·10 <sup>-4</sup>	4.45	4.15
FLUORENO/ Flu/ 86-73-7	 C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> (166)	115/295	1.69	8.0·10 <sup>-2</sup>	4.18	3.86
FENANTRENO/ Phe/ 85-01-8	 C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> (178)	100.5	1.18	1.6·10 <sup>-2</sup>	4.46	4.15
FLUORANTENO/ Fla/ 206-44-0	 C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> (202)	108.8	0.206	1.2·10 <sup>-3</sup>	4.9	4.58
PIRENO/ Pyr/ 129-00-0	 C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> (202)	150.4	0.13	6.0·10 <sup>-4</sup>	4.88	4.58

Continuación Tabla I. 1.

<b>HAP/ Abreviatura/ CAS</b>	<b>Estructura/ Fórmula empírica/PM (g/mol)</b>	<b>Punto Fusión (°C)</b>	<b>Solubilidad en agua (mg/L)</b>	<b>P° Vapor (Pa)</b>	<b>Log K<sub>ow</sub></b>	<b>Log K<sub>oc</sub></b>
CRISENO/ Cry/ 218-01-9	 C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> (228)	253.8	1.8·10 <sup>-3</sup>	8.4·10 <sup>-5</sup>	5.61	5.30
BENZO(a)- ANTRACENO/ BaA/ 56-55-3	 C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> (228)	160.6/400	5.7·10 <sup>-3</sup>	2.8·10 <sup>-5</sup>	5.60	6.14
BENZO(b)- FLUORANTENO/ BbF/ 205-99-2	 C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> (252)	168.3	0.014	6.7·10 <sup>-5</sup>	6.06	5.74
BENZO(k)- FLUORANTENO/ BkF/ 207-08-9	 C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> (252)	215.7	4.3·10 <sup>-3</sup>	1.3·10 <sup>-8</sup>	6.06	5.74
BENZO(a)- PIRENO/ BaP/ 50-32-8	 C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> (252)	178.1	3.8·10 <sup>-3</sup>	7.3·10 <sup>-7</sup>	6.06	6.74
DIBENZO(a,h)- ANTRACENO/ DahA/ 563-70-3	 C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> (278)	266.6	5·10 <sup>-4</sup>	1.3·10 <sup>-8</sup>	6.8	6.52
INDENO(1,2,3- cd)PIRENO/ Ind/ 193-39-5	 C <sub>22</sub> H <sub>12</sub> (276)	163.6	5.3·10 <sup>-4</sup>	1.3·10 <sup>-8</sup>	6.5	6.2
BENZO(g,h,i)PE RILENO/ BghiP/ 101-24-2	 C <sub>22</sub> H <sub>12</sub> (276)	278.3	2.6·10 <sup>-4</sup>	1.4·10 <sup>-8</sup>	6.51	6.2

En la tabla I. 2 se muestran algunas fuentes de HAPs en el ambiente y las cantidades que emiten. Las cantidades emitidas en cada proceso dependen en gran medida de los materiales y de la tecnología de combustión. Un proceso dado en condiciones de combustión predeterminadas producirá una cantidad específica e invariable de HAPs.

Tabla I. 2.- Cantidades de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en diferentes fuentes (Fernández-Bremauntz y col. , 2004).

<b>Fuente de emisión</b>	<b>Combustible</b>	<b>Cantidad total de HAPs</b>	<b>HAPs predominantes</b>
Vehículos	Gasolina sin plomo	Vapor: 221 $\mu\text{g}\cdot\text{km}^{-1}$ Partículas: 30.7 $\mu\text{g}\cdot\text{km}^{-1}$	Flu, Phe BaA, BaP
Generación de energía	Carbón Petróleo	41.9 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 157 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Pyr, Phe Phe
Calefacción	Madera	355 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 1-370 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Pyr, BaA, Cry
Incineración	Residuos Neumáticos	3.9 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ 240 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Flu, Pyr, BaA
Quema agrícola	Rastrojo y paja	352 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Pyr, BaA, Cry
Colillas de cigarro	Tabaco	0.26-0.74 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	Flu, Pyr

En España entró en funcionamiento el Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes (PRTR-España) a partir del 1 de enero de 2008. Este registro es la continuación natural de EPER-España, al cual sustituye de acuerdo con la nueva normativa europea y española (Reglamento (CE) 166/2006 y RD 508/2007), por el que se regula el suministro de información sobre emisiones del Reglamento E-PRTR y de autorizaciones ambientales integradas. Estas normas se encuadran dentro del marco del Convenio Aarhus y del Protocolo CEPE/ONU PRTR del cual España es parte. En este registro se pone a disposición del público información sobre las emisiones y transferencias de residuos fuera del emplazamiento de todos aquellos complejos industriales que realizan alguna de las actividades contempladas en el Reglamento Europeo o en la legislación española, siempre que se superen los umbrales de información establecidos.

Según el PRTR-España en España se encuentran registrados 6087 complejos que producen HAPs mediante 18 tipos de actividades diferentes en el 2010 (Tabla I. 3).

Tabla I. 3.- Cantidad de HAPs emitidos por actividad en España en 2010 (Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes de España, 2010).

<b>Actividad emisora</b>	<b>Atmósfera (t/año)</b>	<b>Agua (t/año)</b>
Refinerías de petróleo y gas	1.19	0.029
Instalaciones de combustión > 50 MW	-	0.04856
Coquerías	0.314005744	-
Producción de fundido o aceros brutos (capacidad > 2.5 t/h)	0.27054	0.0351
Laminado en caliente (capacidad > t acero bruto/h)	-	0.0426
Fundiciones de metales ferrosos (capacidad producción > 20 t/día)	0.696078	-
Producción de metales en bruto no ferrosos	26.14	0.0166
Tratamiento de superficie por procedimiento electrolítico o químico (volumen de cubetas o líneas completas > 30 m <sup>3</sup> )	-	0.02354
Fabricación de cemento o clínker en hornos rotatorios (capacidad superior a 500 t/d)	1.35085	-
Fabricación de cal en hornos rotatorios (capacidad superior a 50 t/d)	0.256	-
Fabricación hidrocarburos simples	-	0.0733087
Fabricación hidrocarburos oxigenados	-	0.08475
Fabricación tensioactivos y agentes de superficie	0.354	-
Fabricación de no metales, óxidos metálicos u otros comp. inorgánicos	0.39	-
Procedimiento químico o biológico para fabricación de medicamentos de base	-	0.0445
Valorización o eliminación de residuos peligrosos (capacidad > 10 t/día)	-	0.0664
Mataderos (cap. producción canales > 50t/día)	-	7.01
Fabricación de carbono o grafito	0.441	-
<b>Total</b>	<b>31.5</b>	<b>7.47</b>

Los efectos que estos compuestos orgánicos hidrófobos producen en los seres vivos se detallan a continuación:

- Al ser los HAPs altamente liposolubles, se absorben rápidamente en el tracto intestinal de los mamíferos y otros organismos. Están fácilmente distribuidos en una amplia

variedad de tejidos con una marcada tendencia para localizarse en tejidos adiposos. Los HAPs por sí mismos son compuestos químicos relativamente no reactivos con respecto a macromoléculas biológicas en condiciones fisiológicas por lo que requieren activación metabólica para manifestar genotoxicidad, incluyendo mutagenicidad y carcinogenicidad (O'Connell y col. , 1997). Una vez que han entrado al cuerpo, el sistema de defensa celular trabaja para eliminar estas sustancias extrañas mediante el metabolismo. El metabolismo de los HAPs en los mamíferos se da principalmente en el hígado y es catalizado por el sistema enzimático del citocromo P450, aunque otras enzimas metabólicas también están implicadas.

Iniciado el metabolismo, los HAPs se convierten en moléculas más polares y solubles en agua, susceptibles de ser excretadas fuera del organismo. Sin embargo, el metabolismo de algunos HAPs también genera intermediarios reactivos que son capaces de formar enlaces covalentes (aductos) con ácidos nucleicos, resultando de esta manera genotóxicos (Yu, 2002).

La toxicidad (aguda y subletal) de los HAPs, se puede incrementar significativamente si los organismos son expuestos a la irradiación UV (fototoxicidad). Debido a su estructura química, los HAPs absorben la luz en el visible (400-700 nm) y en la región del ultravioleta (UV, 280-400 nm) y son especialmente sensibles a los efectos fotoquímicos de la radiación UV (Arfsten y col. , 1996), formándose especies reactivas que pueden dañar los constituyentes celulares, resultando en un proceso de toxicidad aguda o genotoxicidad. La fototoxicidad inducida de los HAPs ha sido observada en diferentes especies, incluyendo peces, zooplancton, anfibios, células humanas y plantas; sin embargo, la respuesta fototóxica de los animales de laboratorio es dictada por la dosis de radiación UV, la concentración de HAPs y probablemente otros factores como la edad y la susceptibilidad genética (Arfsten y col. , 1996). Este fenómeno es afectado por factores físicos, químicos y biológicos; lo que hace que la relevancia ecológica de la fototoxicidad de las HAPs sea incierta.

- Para los seres humanos, La Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de Estados Unidos (ATSDR por sus siglas en inglés) explica que podemos exponernos a los HAPs respirando aire contaminado si se trabaja en fábricas que producen coque, alquitrán y asfalto, plantas donde se fabrican productos ahumados y en instalaciones donde quemen residuos municipales. También respirando aire del humo de cigarrillos, humo de madera, emisiones del tubo de escape de automóviles, caminos de asfalto, o humo de la combustión de productos agrícolas, a través del contacto con aire, agua o tierra cerca de sitios de residuos peligrosos; comiendo carnes preparadas en la parrilla, cereales, harina, pan, hortalizas, frutas, alimentos en escabeche o tomando leche de vaca o agua contaminadas. Las madres que lactan y que viven cerca de sitios con residuos peligrosos pueden transmitir los HAPs a los niños a través de la leche (ATSDR, 1995).

El naftaleno, miembro del grupo de HAPs prioritarios, es un contaminante común en el agua potable. El envenenamiento agudo con naftaleno en humanos puede dar como resultado anemia hemolítica y nefrotoxicidad. Adicionalmente, se han observado cambios dermatológicos y oftalmológicos en trabajadores expuestos a naftaleno en el ambiente ocupacional. El fenantreno es conocido por ser un fotosensibilizador de la piel humana, un alérgeno moderado y mutagénico para sistemas bacterianos en condiciones específicas (Mastrangelo y col. , 1996). Hay poca información disponible para otros HAPs como el acenafteno, fluoranteno y fluoreno, respecto a su toxicidad en mamíferos. Sin embargo, la toxicidad del benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, dibenzo(a,h)-antraceno e indeno (1,2,3-cd)pireno ha sido muy estudiada y existe suficiente evidencia experimental para demostrar que son carcinogénicos (Mastrangelo y col. , 1996).



### **I.3. BIORREMEDIACIÓN: CONCEPTO, TIPOS Y FACTORES LIMITANTES**

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de microorganismos degradadores (fundamentalmente bacterias, pero también hongos y levaduras) para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples, poco o nada contaminantes, como dióxido de carbono, agua y biomasa celular.

Esta tecnología puede realizarse en condiciones aerobias y anaerobias y se puede emplear para limpiar terrenos o aguas contaminadas. En condiciones aerobias, los microorganismos degradadores disponen de oxígeno atmosférico como aceptor de electrones, mientras que, en condiciones anaerobias, la actividad biológica está respaldada por la presencia de otros aceptores de electrones. A veces durante el proceso aerobio o anaerobio, los productos intermedios que se forman son menos, igual o más tóxicos que el contaminante original de partida.

Entre las posibles técnicas de tratamiento aplicables para la descontaminación de un determinado espacio natural, merecen especial atención los procesos de degradación biológica ya que son útiles para muchos tipos de residuos orgánicos. Son procesos naturales que no suponen un impacto adicional significativo sobre los ecosistemas y que se pueden realizar a un bajo coste. En muchos casos, pueden llevarse a cabo en el sitio donde se ha producido la contaminación, con lo cual se elimina la necesidad de transportar materiales peligrosos.

El resultado final de un tratamiento de biorremediación depende en gran medida de la toxicidad y la concentración inicial de los contaminantes, su biodegradabilidad, las propiedades del suelo contaminado y el sistema de tratamiento seleccionado. Entre los contaminantes tratados habitualmente por estos métodos se encuentran los compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles no halogenados

y los derivados del petróleo cuyos componentes prioritarios son los HAPs. Cuando la contaminación se debe a altas concentraciones de metales, compuestos orgánicos con alta proporción de cloro o sales inorgánicas, la eficacia del tratamiento se reduce debido a la toxicidad de estos compuestos para los microorganismos.

Como es evidente, el proceso biológico para tratar los compuestos tóxicos debe competir con los métodos existentes en términos de economía y eficiencia. Los procesos biológicos tienen las ventajas de requerir inversiones de capital moderadas, bajo consumo de energía, ser ambientalmente seguros y no generar residuos. En los últimos años, se han creado una serie de empresas para desarrollar y comercializar tecnologías de biodegradación. La existencia de estas compañías se justifica desde el punto de vista económico por el aumento del coste de los tratamientos tradicionales y del rechazo social a los mismos, así como por el endurecimiento de la normativa en materia de residuos y medio ambiente. El desarrollo futuro de las técnicas de recuperación biológica de espacios contaminados, requiere la adecuada integración de microbiología molecular e ingeniería de sistemas. El tratamiento de recuperación biológica fue ya ensayado a gran escala, con motivo de la contaminación por petróleo ocasionada por el vertido al mar del buque petrolero Exxon Valdez en Alaska (Gallego y col. , 2006).

Muchos microorganismos pueden producir tensioactivos, que pueden emulsionar los aceites en el agua y facilitar su eliminación. A diferencia de los tensioactivos químicos, los de origen microbiológico son inocuos y biodegradables. También se han utilizado, en ocasiones, fertilizantes para incrementar la tasa de crecimiento de las poblaciones autóctonas capaces de degradar compuestos derivados del petróleo, por ejemplo en el desastre ocasionado por el petrolero Exxon Valdez en Alaska, donde se aplicaron fertilizantes oleofílicos como el INIPOL o el S-200, utilizado en esta tesis, y del que se hablará más detenidamente en el apartado I.7.1.

El uso de microorganismos no está restringido únicamente al tratamiento de compuestos orgánicos. En algunos casos, los organismos seleccionados pueden también reducir los cationes tóxicos de los metales pesados (como el selenio), a la forma elemental menos soluble y menos tóxica. Por lo tanto, el tratamiento biológico puede también aplicarse a las aguas superficiales contaminadas por metales pesados.

Para realizar la recuperación de un espacio contaminado, podemos realizar diferentes estrategias (Conde, 2000) que, en general, se pueden agrupar en tres categorías: confinamiento, limpieza y estrategia de respuesta.

El **confinamiento** tiene como finalidad el aislamiento de la fuente contaminante, evitando la salida de líquidos (lixiviados), polvo o gases; es decir controlando la dispersión de la contaminación. Es el tratamiento que se aplica habitualmente en el caso de contaminaciones provocadas por los vertederos incontrolados de residuos industriales. Las medidas que incluye generalmente este tipo de actuación son: recubrimiento, revegetación, control de aguas de escorrentía superficial y control de lixiviados y aguas subterráneas.

La **limpieza** incluye la aplicación de una o varias tecnologías para eliminar los contaminantes del suelo. Se distinguen tres tipos de tratamiento: 1) tratamiento *in situ* del suelo contaminado, 2) excavación del emplazamiento contaminado, retirada del suelo afectado y tratamiento *ex situ* del mismo y por último, 3) excavación, retirada y depósito en vertedero controlado. En el primer caso, la contaminación se trata en el lugar en el que se ha producido y en el segundo caso hay que proceder a una excavación del suelo contaminado o a un bombeo del agua contaminada antes de proceder a su tratamiento. En general, el tratamiento *in situ* es menos costoso y permite que se utilice el espacio durante el mismo, por lo que se aplica cada vez con más frecuencia a pesar de que habitualmente requiere largos períodos de tiempo (Roote y col. , 1997).

La **estrategia de respuesta** es un tratamiento a largo plazo que incluye actuaciones diversas y modificables en función de una primera evaluación de la situación y de la evolución de la misma durante el tratamiento. Se suele elegir cuando las aguas subterráneas ya se han contaminado. Las aguas contaminadas pueden tratarse mediante: a) extracción por bombeo seguida de tratamiento en el propio emplazamiento, por técnicas convencionales aplicables a aguas residuales industriales, b) tratamiento *in situ* mediante muros de tratamiento y c) dilución o desvío de la contaminación, mediante inyección de agua limpia utilizando sistemas de pozos.

Los métodos existentes para tratar los suelos contaminados pueden ser de naturaleza física, química o biológica y tanto unos como otros pueden aplicarse en el lugar de la contaminación o como tratamiento *ex situ*, ver tabla I. 4.

Tabla I. 4.- Clasificación de las diferentes técnicas empleadas para tratar los suelos contaminados, agrupadas según su naturaleza y forma de aplicación.

<b>Tratamientos <i>in situ</i></b>	<b>Tratamientos <i>ex situ</i></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Fisicoquímicos:</u></li> <li>a) Extracción con vapor</li> <li>b) Lavado</li> <li>c) Solidificación y estabilización</li> <li>d) Separación electrocinética</li> <li>- <u>Biológicos:</u></li> <li>a) Biorremediación</li> <li>b) Fitorremediación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>Térmicos:</u></li> <li>a) Desorción térmica</li> <li>b) Incineración</li> <li>- <u>Fisicoquímicos:</u></li> <li>a) Extracción con disolventes</li> <li>b) Lavado</li> <li>c) Oxido-reducción</li> <li>d) Deshalogenación química</li> <li>e) Solidificación y estabilización</li> <li>- <u>Biológicos:</u></li> <li>a) Laboreo agrícola</li> <li>b) Biopilas</li> <li>c) Biodegradación en reactor</li> </ul>

El objetivo de las técnicas de biorrecuperación es la creación de las condiciones ambientales óptimas para que los microorganismos se puedan desarrollar adecuadamente y

provocar la máxima descontaminación. La tecnología específica empleada en cada caso depende del tipo de microorganismos de que se trate, de las condiciones del espacio contaminado y de la naturaleza y cantidad de contaminante o contaminantes. Distintos microorganismos degradan diferentes tipos de compuestos y sobreviven en diferentes condiciones.

Debemos recalcar que el tratamiento *in situ* no requiere excavar y retirar el suelo contaminado, por lo cual provoca una menor liberación de polvo y contaminantes, permitiendo descontaminar un volumen mayor de suelo por tratamiento que las técnicas *ex situ*. En este caso, el propio suelo funciona como un reactor biológico. Tiene otros inconvenientes como mayor lentitud, dificultad de mantener las condiciones y dependencia del tipo de suelos, que deben ser permeables si se quiere asegurar un buen rendimiento del proceso.

Para paliar los inconvenientes referidos a la lentitud del tratamiento *in situ* se han desarrollado técnicas como bioestimulación o bioaumento, las cuales se definirán a continuación pero antes se debe definir qué es la atenuación natural o biorremediación intrínseca:

- La **atenuación natural** o **biorremediación intrínseca** se lleva a cabo por microorganismos autóctonos, principalmente bacterias del medio afectado que utilizan los nutrientes y aceptores de electrones del medio, que crecen mineralizando y cometabolizando los contaminantes hasta su desaparición. Tiene una ventaja evidente que es su bajo coste pero necesita una evaluación previa del riesgo. La biorremediación intrínseca puede requerir que la fuente de contaminación sea, en primer lugar, extraída para prevenir una entrada adicional y que se extienda por los alrededores o que exista algún sistema que prevenga la migración de una pluma de contaminación en un acuífero. Se necesita un programa de monitorización a largo plazo para confirmar que la biodegradación se está realizando correctamente y que no se está produciendo el desplazamiento de los contaminantes. Este programa

puede conllevar medidas de contaminantes para demostrar la actividad microbiana, para mostrar que los niveles de O<sub>2</sub> o nitratos disueltos son menores que la concentración inicial de fondo o que los productos de biorremediación están apareciendo.

- **Bioaumentación.** Consiste en introducir microorganismos no autóctonos en el medio a descontaminar con el fin de mejorar la biodegradación. No obstante, estudios recientes han demostrado que la adición de una mezcla comercial de microorganismos degradadores de contaminantes o cultivos enriquecidos por microorganismos autóctonos no aumenta necesariamente la tasa de biodegradación en el medio natural por encima de la lograda mediante la adición de nutrientes (bioestimulación). Los microorganismos no autóctonos parecen no ser capaces de competir con la microflora natural ya que las condiciones ambientales son distintas y dificultan su adaptación al medio donde los microorganismos indígenas están perfectamente aclimatados (Lee y Merlin, 1999). Existen en el mercado productos comerciales, ensayados en el laboratorio que reúnen microorganismos con gran potencial biodegradador, pero la reintroducción de microorganismos autóctonos, aislados del sistema contaminado y cultivados posteriormente, es más efectiva, especialmente cuando se acompaña de un suplemento nutricional y oxígeno.
- La **bioestimulación** radica en la introducción de modificaciones en el medio, mediante el aporte de nutrientes, aireación y otros procesos. En ocasiones será suficiente añadir oxígeno mediante aireación, aunque en otros casos se podría requerir la adición de nutrientes o ajustes de pH. En todo caso estas aproximaciones son válidas siempre y cuando los microorganismos autóctonos sean capaces de degradar el contaminante tras un proceso más o menos largo de aclimatación previa (Nikolopoulou y Kalogerakis, 2008).

En lo que se refiere a la adición de nutrientes, la biorremediación requiere que éstos entren en contacto con el área contaminada y que su concentración sea suficiente para soportar el crecimiento máximo previsto de la población degradadora en el transcurso de las operaciones de remediación.

Estudios experimentales han demostrado que el uso de fertilizantes de liberación lenta de nitrógeno y fósforo ofrece una sólida alternativa para combatir los derrames de petróleo en el medio ambiente y definir la relación óptima de biorremediación de carbono, nitrógeno y fósforo, 100:10:1 (Leys y col., 2005).

En cuanto a los **factores que afectan a la biorremediación** de los HAPs, se conoce que existen muchos ejemplos que consiguen el éxito en la aplicación de tecnologías de biorremediación para descontaminar sitios usando métodos como el compostaje o biopilas. Muchos estudios publicados han investigado la eficacia de la biorremediación a pequeña escala y bajo condiciones ideales en el laboratorio tales como a pH neutro y temperaturas mesofílicas (entre 25°C y 45°C). No obstante, está claro que los factores ambientales que varían de un sitio a otro, tales como el pH del suelo, la disponibilidad de los nutrientes y de los contaminantes, pueden afectar los procesos de biorremediación, inhibiendo el crecimiento de los microorganismos degradadores. Los principales factores que intervienen en la viabilidad de la biorremediación son:

**Temperatura:** Tiene un considerable efecto sobre la capacidad de los microorganismos para degradar los HAPs *in situ*. En general, la mayoría de los lugares contaminados no tienen una temperatura óptima durante todo el año. La solubilidad de los HAPs aumenta con la temperatura, así como la biodisponibilidad de las moléculas de HAPs. Además, la solubilidad del oxígeno disminuye con el aumento de la temperatura, lo que reduce la actividad metabólica de los microorganismos aerobios (Bamforth y Singleton, 2005).

La biodegradación de HAPs puede ocurrir en un amplio rango de temperaturas. En la mayoría de los estudios hay una tendencia a centrarse en temperaturas mesofílicas (entre 25 y 35°C) porque la mayoría de los microorganismos del suelo presentan su actividad óptima en este intervalo de temperatura.

**pH:** Se ha demostrado que el proceso de mineralización de los hidrocarburos es más rápido a valores de pH comprendidos entre 6.5 y 8.0. El ajuste del pH en suelos ácidos y alcalinos dentro de este rango hace que aumente la tasa de degradación por los microorganismos (Morgan y Watkinson, 1989b). El pH influye además en la solubilidad de fósforo, que es uno de los nutrientes de especial importancia para el desarrollo microbiológico, y también afecta en la solubilización y transporte de metales pesados en el suelo.

**Humedad:** Cuando el contenido de agua en suelo se encuentra entre un 50% y 80% de la capacidad de campo, la actividad microbiológica es generalmente óptima. Los poros existentes en el suelo húmedo tienen poco o ningún espacio para los gases, generándose condiciones anaerobias. Los hidrocarburos derivados del petróleo tienden a distribuirse en la fase sólida del suelo, por lo que en la fase acuosa habrá unas concentraciones de contaminantes muy bajas. Debido a que los microorganismos toman nutrientes de la fase líquida, la tasa de biorremediación puede verse limitada por la velocidad con que se produce la desorción, por lo que el agua debe de estar en contacto con los contaminantes y en cantidades que permitan el desarrollo de las comunidades microbianas (Morgan y Watkinson, 1989a). Los valores de humedad óptima para la biorremediación de terrenos no saturados están comprendidos entre 150 y 250 gramos de agua/kg de terreno seco. En la biorremediación de acuíferos contaminados, el mayor problema se debe al suministro de oxígeno a causa de su baja solubilidad en el agua (7.5 y 9 mg·L<sup>-1</sup> en aguas subterráneas).



El oxígeno es, en general, el aceptor de electrones más empleado en la respiración microbiana. Para los terrenos no saturados, el suministro de oxígeno no constituye un problema pero su baja solubilidad en agua y la heterogeneidad de los acuíferos hacen que el transporte del oxígeno a través de las zonas contaminadas sea muy difícil. Existen otros aceptores de electrones más fáciles de suministrar como son nitratos, nitritos, sulfatos, Fe(III) y CO<sub>2</sub>.

**Nutrientes:** Además de degradar fácilmente las fuentes de carbono, los microorganismos requieren nutrientes tales como nitrógeno, fósforo y potasio para su metabolismo celular y su crecimiento. En las zonas contaminadas donde los niveles de carbono orgánico son altos debido a la naturaleza del contaminante, la disponibilidad de los nutrientes puede llegar a agotarse rápidamente durante el metabolismo microbiológico. Para evitar este agotamiento, se puede añadir un suplemento de nutrientes para estimular la comunidad bacteriana y aumentar la biorremediación *in situ*. Se utiliza generalmente una relación molar C:N:P de 100:10:1 para la biorremediación de suelos (Gallego y col. , 2006).

**Concentración de los contaminantes:** Se conoce que los HAPs tienen una gran afinidad por la fase sólida del suelo tanto a arcillas como a la materia orgánica, dando como resultado una baja concentración de estos compuestos en la fase acuosa del suelo. De esta manera se puede considerar un factor limitante ya que al ser tan baja esta concentración de contaminantes en la fase acuosa, no podrá soportar el crecimiento y desarrollo de una población microbiana capaz de metabolizarlo. Mientras que si nos encontramos en una situación con altas concentraciones de contaminante en la fase acuosa del suelo puede que no se produzca biodegradación por parte de los microorganismos debido a que esta alta concentración les provoque un efecto de toxicidad.

#### **I.4. INFLUENCIA DE LOS LÍQUIDOS EN FASE NO ACUOSA (NAPLs) EN LA BIODEGRADACIÓN DE HAPs**

Muchos de los contaminantes de las zonas a biorremediar no se encuentran en fases acuosas o sorbidos a sólidos sino disueltos en líquidos que son inmiscibles con agua. Estos líquidos en fases no acuosas (NAPLs) que contienen contaminantes medio ambientales están presentes en acuíferos, subsuelos, sedimentos, suelos, etc.

Los líquidos en fase no acuosa son muy conocidos debido a los derrames o escapes de petroleros, y estos NAPLs de petróleo han contaminado aguas superficiales, sedimentos marinos y playas. La mayor parte del petróleo vertido inconscientemente en aguas marinas, acaba depositándose en el fondo del mar, persistiendo en los sedimentos.

La gasolina, productos derivados del petróleo, o disolventes industriales son contaminantes comunes en acuíferos y aguas subterráneas introducidos mediante tanques de almacenaje subterráneos que tras muchos años enterrados, se corroen y empiezan a liberar su contenido. Además, los emplazamientos de residuos peligrosos contienen disolventes industriales, que se desplazan de sitio y penetran en las aguas subterráneas adyacentes convirtiendo en no potable lo que era anteriormente un suministro de agua seguro. Si el derrame del material en el subsuelo es denso, se desplazará hacia abajo, descansará y permanecerá como una piscina en el fondo del acuífero. Éstos son conocidos como NAPLs densos (DNAPLs)(Alexander, 1999).

Los NAPLs normalmente contienen una mezcla de moléculas orgánicas, aunque un derrame de solvente de una fuente industrial o de un tanque de almacenamiento subterráneo puede contener una única sustancia química. Típicamente, los NAPLs están compuestos por moléculas que presentan bajas solubilidades en agua y altas solubilidades en disolventes orgánicos, siendo la concentración en fase acuosa

bastante baja. Sin embargo, los NAPLs presentan una fuente a largo plazo de contaminación de aguas debido a que los contaminantes continúan entrando en la fase acuosa para reemplazar aquello que es transportado, biodegradado o eliminado por alguna técnica de biorremediación.

Estudios centrados en los emplazamientos contaminados demostraron que los NAPLs son, a menudo, extremadamente persistentes por lo que los compuestos que se encuentren dentro de los NAPLs serán también persistentes.

Existen un número de factores conocidos que influyen en la biodegradación de los constituyentes individuales de los NAPLs (Alexander, 1999):

- La capacidad intrínseca de la microflora en ese punto para transformar los constituyentes.
- La tasa de reparto de los constituyentes desde el NAPL a la fase acuosa. Esta tasa varía dependiendo de la identidad del NAPL (Carroquino y Alexander, 1998).
- La viscosidad del NAPLs puede afectar a la tasa de biodegradación porque cuanto más viscoso sea el NAPL menor será el reparto del contaminante desde el NAPL a la fase acuosa (Birman y Alexander, 1996).
- Su toxicidad. Factor importante porque influye directamente en la biodegradación de los compuestos presentes en el NAPL. Para la realización de esta Tesis Doctoral se eligieron los NAPLs de toxicidad reducida, lo cual permite el desarrollo de los microorganismos.
- La superficie de la interfase entre el NAPL y la fase acuosa. Este factor puede modificar la tasa de biodegradación de los constituyentes del NAPL debido a que la transferencia de masa del contaminante en el NAPL a la fase acuosa está relacionada con la superficie

del NAPL. Cuanto mayor sea la superficie del NAPL expuesta al agua donde se encuentran los microorganismos, más rápidamente serán metabolizados los contaminantes en dichos NAPLs.

- La presencia de otros constituyentes que sean degradados más rápidamente que el compuesto específico de interés.
- Una concentración de equilibrio en la fase acuosa demasiado baja para permitir el crecimiento de las especies responsables. Además, si el componente químico es transformado sólo por cometabolismo, este componente puede ser transformado más rápidamente si el NAPL tiene los constituyentes que permiten el crecimiento de las especies cometabolizantes.

Los microorganismos utilizan los NAPLs y los constituyentes de los mismos siguiendo cada una de los siguientes mecanismos (Alexander, 1999):

- Utilizan solamente los compuestos químicos que se encuentran en la fase acuosa. Los microorganismos únicamente pueden utilizar moléculas que se encuentran en la fase acuosa por reparto espontáneo, por lo que la degradación de estos compuestos dependerá de la tasa de reparto espontáneo a la fase acuosa.
- Los microorganismos excretan productos que convierten el sustrato en gotas de tamaño inferiores a 1 micra, siendo después asimiladas por el organismo. Debido al tamaño tan pequeño de estas partículas, este proceso puede recibir el nombre de pseudosolubilización. El proceso comúnmente implica la excreción realizada por los microorganismos de agentes tensioactivos que facilitan la pseudosolubilización.

- Las células entran en contacto directo con el NAPL en las superficies en que los microorganismos se desarrollan, y el compuesto cerca o en el punto de contacto con los microorganismos atraviesa la superficie celular y entra en el citoplasma.

Se puede representar la tasa de reparto desde el NAPL a la fase acuosa, comparándola con las tasas de biodegradación (Figura I.4).

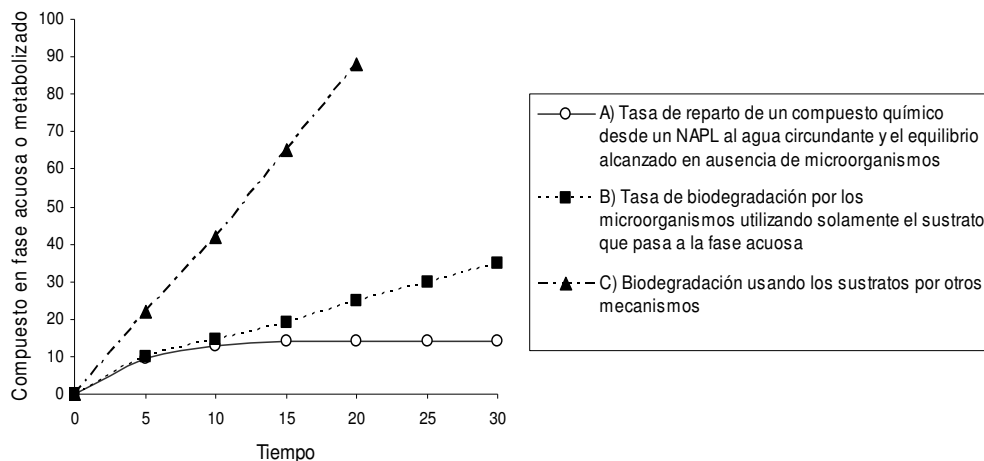


Figura I. 4.- Reparto de los contaminantes hidrófobos desde el NAPL hacia la fase acuosa, en ausencia y presencia de microorganismos (Alexander, 1999).

## I.5. BIODISPONIBILIDAD, BIOACCESIBILIDAD Y ACTIVIDAD QUÍMICA

La evaluación del riesgo ambiental de suelos y sedimentos contaminados con compuestos orgánicos hidrofóbicos (COHs) ha sido un área de intensa investigación y preocupación. Normalmente, la evaluación del riesgo involucra el uso de concentraciones totales de los COHs en suelos y sedimentos para conocer el potencial de bioacumulación o toxicidad (Ehlers y Loibner, 2006). Numerosos estudios han llegado a la conclusión de que la concentración total en suelos o sedimentos no es siempre un buen indicador del potencial

de biodegradación, bioacumulación o toxicidad (Alexander, 2000; Cornelissen y col., 2005).

Las características físico-químicas de la matriz del suelo y de los sedimentos pueden afectar seriamente a la biodisponibilidad de los COHs. Los contaminantes orgánicos en contacto con el suelo y sedimentos explican un conjunto de procesos que incluyen: sorción, desorción, secuestro y envejecimiento (aging). Todos estos procesos afectan a la inmovilización de COHs haciéndolos menos biodisponibles con el tiempo. Estudios sobre la interacciones de los COHs con ciertas fracciones de carbono orgánico (CO) en suelos y sedimentos, nos han dado indicios de que existe un reparto como mecanismo de sorción de los contaminantes que ayuda a explicar por qué los contaminantes tienen menos biodisponibilidad en suelos o sedimentos enriquecidos con una gran cantidad de material carbonáceo.

Como se ha ido viendo a lo largo de la introducción, la biodisponibilidad es uno de los factores más importantes para realizar una técnica de biorremediación. Es necesario definir este término aunque esto ha generado una gran controversia en los últimos años debido a que está ampliamente utilizado, no sólo en ciencias ambientales sino también en farmacología y toxicología. De forma que su uso en diferentes disciplinas ha provocado que la definición de biodisponibilidad sea confusa. Para evitar confusiones, el término biodisponibilidad se definirá en esta tesis de manera que esté relacionado con la degradación microbiana de los compuestos orgánicos.

Según Semple y col., (2004) biodisponibilidad representa la máxima cantidad de contaminante disponible para ser capturada por un organismo dentro de un período de tiempo determinado. Este concepto realmente puede describir dos fracciones diferentes: *biodisponibilidad* y *bioaccesibilidad*. Etimológicamente se definió *biodisponibilidad* como lo que está libremente disponible para atravesar la pared celular de un organismo desde el medio del organismo donde habita, en un tiempo determinado. *Bioaccesibilidad* se definió como lo

que está disponible para atravesar una pared celular de un microorganismo desde el medio del organismo donde habita, si el organismo tiene acceso a él. No obstante puede ser físicamente eliminado por el organismo o biodisponible sólo después de un período de tiempo (Figura I.5).

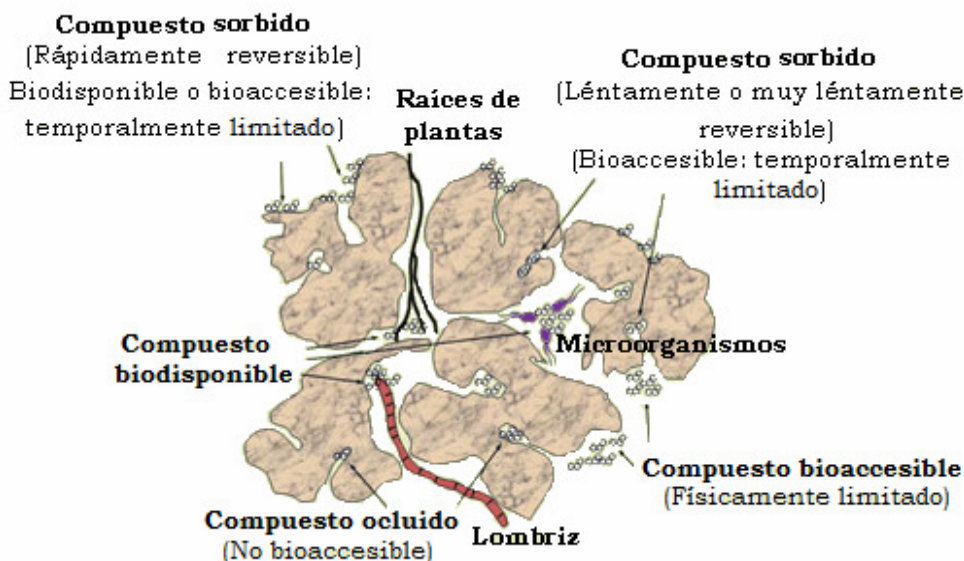


Figura I. 5.- Esquema donde se ilustra la fracción biodisponible y la bioaccesible de un contaminante en el suelo, tal y como se definen estos términos mediante la ubicación física. También se describe la relación de moléculas de contaminantes asociadas al suelo con la fracción bioaccesible (Esquema modificado de Semple y col., 2004).

Posteriormente, Reichenberg y Mayer (2006) profundizaron en el concepto, dado que muchos investigadores observaron y midieron biodisponibilidad en términos de dos formas diferentes:

- *Bioaccesibilidad*. Definida como la fracción de COH que es sorbida débil y reversiblemente, y que puede explicar la desorción rápida desde la fase sólida a la fase acuosa. Esta fracción es una cantidad definida operacionalmente, que incorpora la fracción de compuesto que es inmediatamente accesible (libre disuelto), así como la fracción que puede llegar a ser accesible para los organismos en el futuro (sorbida

débil/reversiblemente). Cuando los microorganismos captan la concentración de COH libremente disuelta, esta concentración disminuye e inmediatamente es repuesta por la fracción de COH que estaba sorbida débil y reversiblemente. De esta manera, la fracción rápidamente desorbida puede representar mejor esa cantidad que es accesible a un organismo en una escala de tiempo relevante, mientras que la fracción de COH que está fuertemente sorbida al suelo o sedimento generalmente no se considera bioaccesible.

- *Actividad química.* Es el potencial que posee un compuesto para experimentar procesos espontáneos tales como difusión y reparto. Está relacionada con la fuerza de sorción de los COHs. Una fuerte sorción implica una disminución de la actividad química y por tanto una disminución en la biodisponibilidad de los COHs. En matrices ambientales, los COHs se mueven desde áreas de alta actividad química hacia áreas de baja actividad, hasta alcanzar el equilibrio. En el equilibrio la actividad química es la misma en cada compartimento de una matriz (por ejemplo, en partículas sólidas, materia orgánica disuelta, fase acuosa, biota, etc) (Ditiro y col. , 1991). De esta manera, las concentraciones de COH en el equilibrio para cada compartimento, incluyendo la biota, son proporcionales entre sí. Si la relación entre las fases se conoce, la fracción de COH en una fase se puede utilizar junto a un apropiado factor de corrección (como  $K_{oc}$ ) para estimar la fracción en la otra fase. Esto es la base de la Teoría de reparto en el equilibrio que fue propuesta originalmente como método de medir la biodisponibilidad por Shea (1988), Ditiro y col., (1991).

En definitiva, la biodisponibilidad depende de varios factores, donde se incluyen las propiedades del suelo o los sedimentos (como por ejemplo, el contenido de carbono orgánico, el contenido de carbono negro conocido como “black carbon”, su composición física y química, etc), las propiedades



del contaminante (como por ejemplo su solubilidad en agua,  $K_{oc}$ , la forma de su molécula, etc), el tiempo de contacto entre el contaminante y el suelo o sedimento y la ruta de captura dentro del organismo.

## **I.6. MÉTODOS DE REPARTO DE HAPs EMPLEANDO POLIDIMETILSILOXANO**

Debido a su naturaleza hidrofóbica, el reparto de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) se realiza con facilidad en fases orgánicas sólidas ó líquidas, existiendo en la fase acuosa sólo a concentraciones limitadas. Esto hace que la degradación de HAPs por las células bacterianas sea difícil. En cultivos de bacterias degradadoras donde sólo utilizan los compuestos disueltos en medios acuosos, la transferencia de masa o la velocidad de desorción controlan las tasas de crecimiento y degradación (Alexander, 1999). El uso combinado de la biorremediación con otras tecnologías de remediación de suelos, como el uso de electrorremediación (Niqui-Arroyo y col. , 2006; Niqui-Arroyo y Ortega-Calvo, 2007; Niqui-Arroyo y Ortega-Calvo, 2010), la aplicación de biosurfactantes (García-Junco y col. , 2001; García-Junco y col. , 2003) o la adición de bioestimulantes para suelos contaminados con HAPs (Gallego y col. , 2007; Tejeda-Agredano y col. , 2011), pueden ayudar a superar esta limitación, lo que aumenta la eficacia de la biorremediación como una opción de tratamiento.

El destino y transporte de los contaminantes orgánicos hidrofóbicos pueden ser influidos notablemente por los procesos de sorción. La cuestión de si la sorción inhibe la biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos es de gran importancia para el éxito de la biorremediación tanto de suelos como de acuíferos.

Las concentraciones biodisponibles de COHs en medios acuosos, a menudo decrecen como resultado de procesos de (bio)sorción, volatilización o degradación. Para mantener constante la exposición de niveles de estos contaminantes en

medios acuosos se introdujo el reparto administrado conocido como “partitioning driven administering” (PDA, Figura I.6), cuyo principio consiste en controlar las concentraciones disueltas de estos contaminantes mediante reparto desde una fase sólida dominante (Mayer y col. , 1999).

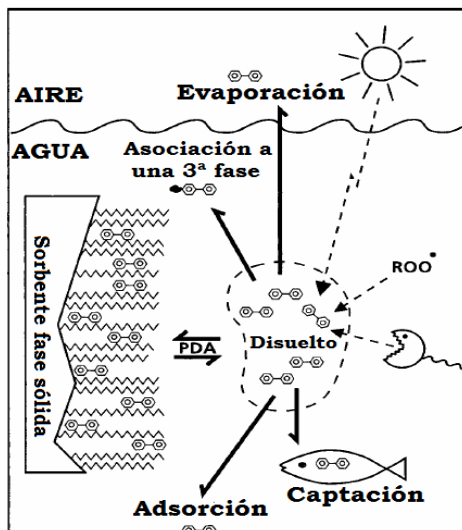


Figura I. 6.- Esquema de un sistema con varias fases. El PDA controla las concentraciones disueltas de los HAPs contra una serie de procesos de reducción degradativos (líneas discontinuas) y no degradativos (líneas continuas) mediante reparto desde una fase sólida dominante (Variante del esquema de Mayer y col., 1999).

Basados en este principio se desarrollaron nuevos métodos para determinar la transferencia de masa por difusión mediante microcámaras y medir de la capacidad de solubilización de medios acuosos (dopaje pasivo) utilizando polidimetilsiloxano como fase sólida dominante en ambos métodos:

a) **Estudio de la transferencia de masa de contaminantes mediante difusión.** Debido a las propiedades hidrófobas de los HAPs, las concentraciones de estos contaminantes se encuentran generalmente a menores órdenes de magnitud en el medio acuoso que en partículas del suelo, de sedimentos o en organismos acuáticos. Esto tiene

importantes implicaciones para su intercambio por difusión entre distintos compartimentos ambientales, donde una fina película acuosa puede actuar como una barrera eficaz para la transferencia de masa por difusión (Mayer y col. , 2005) (Figura I.7).

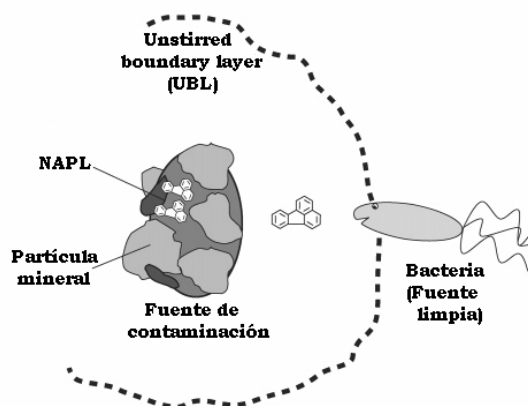


Figura I. 7.- Esquema representativo de la formación de la capa de difusión limitante (UBL) entre la fuente de contaminación y los microorganismos en un medio acuoso. El transporte de los contaminantes se produciría desde la fuente de contaminación hacia los microorganismos a través de la capa de difusión limitante (Mayer y col. , 2005).

La difusión molecular de estos contaminantes a través de estas capas limitantes conocidas como "Unstirred boundary layers (UBL)" a menudo constituye el paso limitante de su desorción desde matrices del suelo y de sedimentos, así como para su captación por los organismos (Johnsen y Karlson, 2004). La primera ley de Fick de la difusión es directamente aplicable para describir una transferencia de masa mediante difusión a través de UBLs homogéneos. También puede aplicarse en modelos que describen transporte por difusión a través de medios heterogéneos y el intercambio mediante difusión en las interfases. Sin embargo, estos modelos generalmente se basan en supuestos (como por ejemplo, que el transporte se limita por la difusión de moléculas disueltas libremente) que pueden ser bastante difíciles de confirmar por tratar con productos químicos orgánicos hidrofóbicos (Wells y col., 2004). Esto hace que la determinación directa de la

transferencia de masa por difusión a través de una UBL tenga tanta importancia.

Para medir la velocidad de difusión de los contaminantes en un medio, se utilizaron unas microcámaras que consistían en dos discos de polidimetilsiloxano (PDMS), uno de ellos limpio y el otro donde se fija el contaminante hidrófobo en estudio (HAPs). La transferencia de masa del disco contaminado (que sería la fuente de contaminación en la Figura I.7) al disco limpio (que sería la bacteria) se realiza a una distancia de 100  $\mu\text{m}$  de cada uno. El medio que se coloca entre ambos discos, es el factor variable de este diseño experimental ya que dependiendo de las características del medio se obtendrá una mayor o menor difusión de los contaminantes.

El fundamento básico de este sistema experimental consiste en ver la transferencia de las moléculas HAPs desde el disco contaminado al disco limpio que requiere 3 pasos (Figura I.8):

**1.-** Reparto de las moléculas de HAPs en la interfase entre el disco contaminado y el medio, el cual está gobernado

por el coeficiente de reparto  $K_{PDMS,Medio}$ .  $C_{Medio} = \frac{C_{Cont}}{K_{PDMS,Medio}}$

**2.-** Difusión de las moléculas de HAPs (difusión linear) a través del medio, que es función del gradiente de concentración  $(\Delta C / \Delta x)$  y del coeficiente de difusión ( $D$ ).

$$Difusión, flujo = -\frac{D \times \Delta C}{\Delta x}$$

**3.-** El reparto de las moléculas de HAPs en la interfase entre el medio y el disco limpio está gobernado por  $K_{PDMS,Medio}$ . La transferencia de masa por difusión del disco contaminado al disco limpio se controla midiendo el contenido de los HAPs que quedan en el disco contaminado y los que han pasado al disco limpio por unidad de tiempo. La constante de velocidad

$K$  ( $\text{s}^{-1}$ ) se ajusta a los datos medidos.  $C_{Medio} = \frac{C_{Lim}}{K_{PDMS,Medio}}$ .

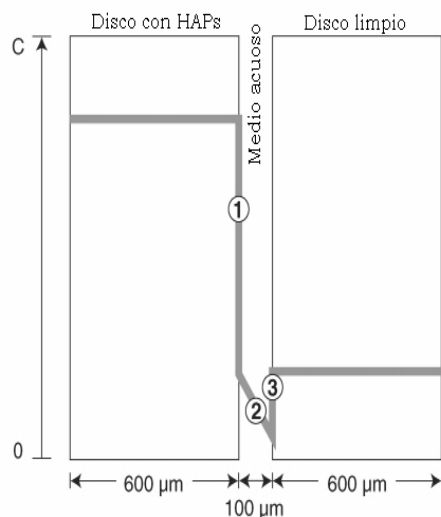


Figura I. 8.- Esquema de los 3 pasos en el proceso de difusión de los PAHs en las microcámaras desde el disco contaminado al disco sin HAPs (Mayer y col. , 2005).

La fracción de HAPs presente en el medio es despreciable:  $V_{PDMS} > V_{Medio}$  y  $K_{PDMS,Medio} \gg 1$ .

Los HAPs están homogéneamente distribuidos en el disco de PDMS debido a la permeabilidad especialmente alta de este polímero. Como consecuencia, los dos discos imponen un gradiente lineal de actividad química (o fugacidad) en la UBL, estas capas limitantes de la difusión (UBLs) actúan a menudo como un cuello de botella para el transporte por difusión de compuestos orgánicos hidrofóbicos (COHs), constituyendo a menudo un paso limitante tanto para su captación desde el suelo o matrices de sedimentos, como para su captación por los organismos. La transferencia de masa por difusión de COHs a través de UBLs se puede aumentar por la presencia de medios que normalmente son considerados para reducir la captación difusa.

Bajo el supuesto de que toda la fuga de masa química del disco contaminado se recupera en el disco limpio y que la masa presente entre la fina capa es insignificante, el balance de masa del sistema puede ser descrito por:

$$\frac{dm_{Cont}}{dt} = -am_{Cont} + am_{Lim} \quad (1)$$

Donde  $m_{Cont}$  y  $m_{Lim}$  son la masa (kg) en el disco contaminado y limpio respectivamente y  $a$  es la constante de la tasa de velocidad ( $s^{-1}$ ). Usando el supuesto de que un balance de masa cerrado produce una condición de simetría  $m_{Lim} = m_0 - m_{Cont}$ , donde  $m_{Cont}$  y  $m_{Lim}$  son la masa del disco contaminado y limpio respectivamente, al tiempo  $t$  y  $m_0$  es la masa inicial (en el disco contaminado). De esta manera, la solución analítica de la ecuación 1, nos da:

$$\frac{m_{Lim}(t)}{m_0} = \frac{C_{Lim}(t)}{C_0} = 50\% \cdot (1 - e^{-2at}) \quad (2)$$

En analogía a la primera Ley de difusión de Fick, se puede expresar la ecuación 2 como:

$$\frac{dC_{libre}}{dt} = \frac{A \cdot K \times D}{V \cdot \Delta x} \cdot \Delta C \quad (3)$$

Donde  $\Delta C = C_{Cont} - C_{Lim}$ ,  $A$  es el área superficial efectiva ( $m^2$ ),  $V$  es el volumen del disco ( $m^3$ ),  $\Delta x$  es el espesor de la capa ( $m$ ),  $K$  es el coeficiente de reparto entre la solución en la capa de difusión y el polímero  $K_{Medio,PDMS} = 1/K_{PDMS,Medio}$  y  $D$  es el coeficiente de difusión ( $m^2 \cdot s^{-1}$ ). La tasa de velocidad constante  $a$  ( $s^{-1}$ ) de antes puede ser identificada como:

$$a = \frac{A}{V \times \Delta x} \cdot \frac{D}{K_{PDMS,Medio}} \quad (4)$$

La constante de tasa de velocidad  $a$  describe la cinética del sistema y es proporcional al flujo de difusión. También está linealmente relacionada con otros parámetros de difusión establecidos: [1] el producto  $K \times D$ , también para conocer la permeabilidad ( $P$ ) o conductividad  $g$  ( $m \cdot s^{-1}$ ), y [2] el coeficiente de transferencia de transporte por difusión en los modelos de fugacidad (por ejemplo, en el  $mol \cdot año^{-1} \cdot Pa^{-1}$ ). Esto está en

contraste con las cámaras de difusión clásica, que tienen por objeto la determinación del coeficiente de difusión ( $D$ ).

Los volúmenes de los dos discos,  $V_{Contaminado}$  y  $V_{Limpio}$ , se mantienen constante, así como la superficie para el intercambio  $A$  y el espesor de la película  $\Delta x$ . Cualquier diferencia en la constante de la tasa de velocidad  $a$  en los dos medios  $i$  y  $j$  se atribuyen únicamente al producto  $K \times D$ :

$$\frac{a_i}{a_j} = K_{ij} \times \frac{D_i}{D_j} \quad (5)$$

Donde  $K_{ij}$  es el coeficiente de reparto entre el medio  $i$  y el medio  $j$ ,  $D$  es el coeficiente de difusión para el medio  $i$  y para el medio  $j$  y  $a_i/a_j$  es la relación entre velocidades que describe una conductividad relativa para la transferencia de masa por difusión. Por ejemplo, el flujo desconocido de HAPs a través del medio  $i$  puede expresarse como el flujo de estos HAPs a través del medio  $j$ , multiplicado por la relación entre las constantes de velocidad medidas  $a_i/a_j$ .

b) **Estudio de la capacidad de solubilización de contaminantes en un medio determinado mediante dopaje pasivo.** La silicona formada por polidimetilsiloxano (PDMS) ha sido ampliamente utilizada como un material común de recubrimiento para la microextracción en fase sólida (SPME). Esta técnica ha sido empleada para medir concentraciones de analitos disueltos libremente y para estudios de especiación, como por ejemplo: para medir proteínas unidas a tóxicos y a drogas (Vaes y col. , 1996; Musteata y col. , 2006), ácidos húmicos unidos a contaminantes medio ambientales (Poerschmann y col. , 1997; Lutzhoft y col. , 2000) y complejos de inclusión entre compuestos aromáticos y  $\beta$ -ciclodextrinas (Chalumot y col. , 2009). SPME fue introducida por Arthur and Pawliszyn en 1990 (Reichenberg y col. , 2008) y su formato resulta muy atractivo para los dispositivos de muestreo en el equilibrio (o también conocidos como Equilibrium Sampling Device, ESD) porque la fase de muestreo es un volumen pequeño ( $\mu\text{L}$ ) del

polímero con un área superficial relativamente grande. La micro-extracción se genera por difusión molecular a través de la superficie, la cual está impulsada por la actividad química del analito en la muestra y, de esta manera, la concentración resulta medible en el polímero.

SPME es un método poderoso y eficaz pero que no se encuentra exento de problemas y limitaciones como la dificultad de llegar al equilibrio en un período de tiempo práctico, que el contenido de los HAPs en el polímero no sea menor que el contenido de PAHs de la muestra, la adsorción a la superficie del polímero debe ser insignificante porque la fugacidad y la actividad química sólo son proporcionales a la absorción (disolución) de concentración dentro del polímero o asumir que se cumple el balance de masas sin que exista pérdidas tanto en la fijación como en la extracción de los analitos en el polímero. Por esta causa, se ha desarrollado un nuevo método analítico conocido como dopaje pasivo (passive dosing) donde se produce la liberación de los analitos desde un polímero (Figura I.9) en lugar de hacer un muestreo continuo por difusión como se hace con SPME. Este método se basa en los principios de dopaje pasivo desarrollados para el control de la concentración libre disuelta en ensayos de toxicidad.



Figura I. 9.- Fundamento de la técnica de dopaje pasivo: A) Los analitos disueltos en metanol se fijan en la silicona formada por polidimetilsiloxano (PDMS) en menos de una hora, B) equilibrio alcanzado con agua donde se controla la concentración libre disuelta de los analitos y C) equilibrio alcanzado con la muestra donde se mide la concentración total del analito (libre y unida a la materia orgánica disuelta, MOD) (Modificación del esquema de Birch y col, 2010).



El primer paso en este método nuevo es controlar la concentración de analito libre disuelto o actividad química por reparto en el equilibrio desde un polímero cargado con el contaminante previamente en viales totalmente cerrados evitando pérdidas a través de la silicona.

El segundo paso es medir la concentración total del analito en la muestra una vez alcanzado el equilibrio, mediante la técnica analítica elegida. La concentración medida en la muestra puede combinarse con el correspondiente reparto en el equilibrio con agua pura con el fin de obtener:

- La fracción libre de analito en la muestra ( $FL = C_{agua} / C_{muestra}$ ).
- El aumento de la capacidad ( $AC = C_{muestra} / C_{agua}$ , donde  $C_{agua} = C_{libre}$ ) que cuantifica la capacidad de disolución de un medio para los HAPs con respecto al agua, siendo el dopaje pasivo una buena herramienta para estudiar la especiación de HAPs en muestras acuosas.
- Los valores de las tasas de reparto  $K_{DOC}$  y  $K_D$  ( $AC = K_{COD} \cdot C_{COD} + 1$ , donde  $K_{COD}$  es la tasa de reparto para el carbono orgánico disuelto y  $C_{COD}$  es la concentración de carbono orgánico disuelto)(Birch y col. , 2010).

Con este nuevo método se consigue controlar la concentración libre disuelta de cada componente en mezclas de HAPs, se evitan separaciones de fases, no se necesita asumir hipótesis de balance de masas, se requiere un período corto de equilibrio termodinámico, es un método preciso con una desviación estándar del 3%, se reducen los problemas que se ocasionan con la SPME, se calculan constantes de reparto con regresiones lineales simples, se puede medir el aumento de la capacidad (AC) para cuantificar la capacidad de

un medio con carbono orgánico disuelto (COD) para saber si actúa como transportador de HAPs y además, el AC se puede determinar por encima y por debajo de niveles de saturación del COD.

## **I.7. TÉCNICAS DE BIOESTIMULACIÓN**

Como se ha comentado anteriormente, la bioestimulación es una técnica dirigida al tratamiento *in situ* de los contaminantes orgánicos como los HAPs. En esta tesis se utilizará este término, no sólo para definir la bioestimulación como un aporte de nutrientes externo que favorece la biodegradación de estos contaminantes sino que además englobará a todo proceso o fenómeno que ocasione un aumento o mejora de la tasa de biodegradación. Para poder entender esta nueva definición de bioestimulación, se procederá a explicar el contexto de las sustancias utilizadas en esta Tesis Doctoral como bioestimulantes.

### **I.7.1. Fertilizantes oleofílicos**

Aunque la capacidad potencial de la microflora indígena para degradar el fuel en las zonas donde se ha producido un vertido, depende de las propiedades físicas y químicas del mar y del fuel, de las condiciones medio ambientales y de la misma biota, es generalmente aceptable considerar la disponibilidad de los nutrientes como el mayor factor limitante. Estudios experimentales nos han mostrado que la utilización de fertilizantes que contienen nitrógeno y fósforo ofrece un gran potencial para combatir los vertidos de fuel en el medio marino y se han definido las tasas de carbono, nitrógeno y fósforo óptimas para una mejor biodegradación (Jimenez y col., 2006).

No obstante, la utilización de fertilizantes como estrategia de biorremediación dentro de ambientes marinos puede resultar difícil, especialmente en mar abierto donde la concentración de nutrientes solubles en agua puede disminuir

rápidamente por disolución. Para contrarrestar este problema, se han desarrollado formulaciones de nutrientes oleofílicos que retengan la concentración óptima de nutrientes en la interfase fuel-agua donde se produce la biodegradación.

La principal característica de los fertilizantes oleofílicos es que se adhieren a la superficie del fuel y proporcionan nutrientes desde la interfase a los microorganismos. Estos fertilizantes empleados en derrames marinos son principalmente recomendados para utilizarlos en orillas rocosas o donde la acción de las olas dificulta la efectividad de otros fertilizantes que sean de baja liberación y nutrientes solubles en agua.

La aplicación más extensiva de los fertilizantes oleofílicos, concretamente el Inipol EAP 22, tuvo lugar durante la remediación del derrame del petrolero Exxon Valdez en Alaska el 24 de marzo de 1989. Este fertilizante está compuesto por una microemulsión mezcla de urea encapsulada en ácido oleico como fase externa y lauril-éter-fosfato como tensioactivo, fue diseñado por Elf Aquitaine después del derrame del petrolero Amoco Cádiz en Francia en el año 1978. Después de 10 años de investigación este fertilizante fue aplicado en Alaska. Previamente se realizaron unos experimentos en playas arenosas y en playas rocosas donde el producto mostraba mejores resultados que otros fertilizantes estándar (Gallego y col. , 2006).

Las controversias sobre la efectividad de la biorremediación con fertilizantes fueron solventadas usando técnicas analíticas de CG-SM utilizando apropiados biomarcadores químicos como el hopano (Atlas, 1995). No obstante, se señalaron algunas dudas sobre la toxicidad de determinados componentes del Inipol, la solubilidad de la urea (fuente de N) y el papel de fuentes suplementarias de carbono como el ácido oleico.

Después de la experiencia en el accidente del petrolero Exxon Valdez con Inipol y productos similares como F1 o Inipol plus han sido utilizados en otros vertidos de fuel

marinos con resultados muy aceptables. Recientemente en Europa, con los derrames del Erika y especialmente el Prestige, se han promovido nuevas investigaciones para remediar las costas afectadas y se han obtenido ventajas en el tratamiento *in situ* con fertilizantes oleofílicos.

Como consecuencia de estos avances en el desarrollo de la biorremediación con fertilizantes oleofílicos (biorremediación *in situ* mediante bioestimulación), se utilizó el fertilizante S-200, que está en la lista NCP (National Oil and Hazardous Substances Pollution Contingency Plan) en Estados Unidos de América como agente de biorremediación. Se trata de una microemulsión de una solución de urea (fuente de N) en ácido oleico, conteniendo ésteres de fosfatos (fuente de P). Su composición es muy similar a la composición del Inipol pero tiene reducida su toxicidad, mejor poder emulsificante y permite la dilución y su aplicación en diferentes medios, principalmente en aguas subterráneas y en suelos, además de utilizarse en costas afectadas por vertidos de fuel (Gallego y col. , 2007).

La utilización de fertilizantes oleofílicos ha conseguido obtener importantes logros en la biodegradación de los compuestos HAPs que componen el fuel porque aporta los nutrientes necesarios a los microorganismos degradadores consiguiendo la proliferación de los mismos y un aumento sustancial en la cinética de la biodegradación como se verá en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Además, hay que añadir que su aplicación ocasiona un bajo coste en comparación con técnicas de biorremediación físicas donde hay que realizar excavaciones y movimiento de tierra.

### **I.7.2. Fitorremediación y rizorremediación**

El término *fitorremediación* fue acuñado a finales de 1980 y describe un rango de tecnologías donde las capacidades fisiológicas inherentes de las plantas son explotadas para eliminar la contaminación de suelos, sedimentos y acuíferos. La remediación basada en plantas no

es un concepto nuevo, ya que la vegetación se ha utilizado durante cientos de años en el tratamiento de aguas residuales municipales. No obstante, desde mediados de 1980, el interés en la utilización de plantas para la recuperación medio ambiental ha aumentado vertiginosamente.

La fitorremediación es un medio de remediación de suelos eficaz, no invasivo y de bajo costo, que se ha empleado para remediar ambientes contaminados con metales, radionucleidos, compuestos orgánicos, etc. Esta tesis se centrará en describir los diversos mecanismos que emplean las plantas para remediar suelos contaminados con compuestos orgánicos. Estos mecanismos se esquematizan en la Figura I.10 y son:

- **Fitoestabilización.** La fitoestabilización implica el uso de plantas para contener o movilizar contaminantes en el suelo o en las aguas subterráneas. Los mecanismos que participan son la absorción y acumulación en el sistema radicular, adsorción en la superficie de las raíces o precipitación en dicha zona. El consumo o acumulación de los HAPs por la planta es generalmente pequeño (Edwards, 1983). De esta forma, para el caso de los HAPs, la fitoestabilización implica simplemente la creación de una cubierta vegetal para minimizar cualquier indicio de migración de los contaminantes a través de la erosión, la lixiviación o la dispersión del suelo. La fitoestabilización de hidrocarburos de petróleo (y otros contaminantes orgánicos) también puede implicar la incorporación de contaminantes en los materiales húmicos de la rizosfera. Es decir, las plantas puede proporcionar las enzimas que unen a un contaminante en la materia orgánica del suelo (humus) o puede aumentar el contenido de materia orgánica del suelo, permitiendo así una mayor humificación (Aprill y Sims, 1990; Cunningham y col. , 1996). En consecuencia, la adición al suelo de materia orgánica procedente de las plantas (en forma de exudados, mucílagos o residuos, etc) puede reducir la

biodisponibilidad de los contaminantes y, por tanto su biodegradabilidad.

- **Fitodegradación.** La fitodegradación (también conocida como fitotransformación) implica la degradación de contaminantes ya sea en el interior de la planta, a través de procesos metabólicos, o externamente, a través de la liberación de enzimas producidas por las plantas en el suelo. Las plantas pueden desempeñar un papel indirecto en la degradación de hidrocarburos de petróleo por la liberación de enzimas capaces transformar estos contaminantes mediante reacciones químicas catalizadas en el suelo. Schnoor y col., (1995) identificaron enzimas de las plantas como los agentes causantes de la transformación de contaminantes mezclados en sedimentos y suelos.
- **Fitovolatilización.** Se refiere a la absorción y la transpiración de un contaminante a través de una planta. De esta forma, el mismo contaminante o un metabolito del contaminante (si además está involucrada la fitodegradación) se libera a la atmósfera. Por ejemplo, Watkins y col., (1994) encontraron que había mejorado la volatilización de  $^{14}\text{C}$ -naftaleno en un suelo franco arenoso plantado con *Chloris gayana* en comparación con un suelo sin vegetación. Sugirieron que el naftaleno se había tomado por las raíces de esta gramínea, había sido trasladado dentro de la planta y se había volatilizado a través de los tallos y hojas. Los autores señalaron que este mecanismo de eliminación reduciría la cantidad de naftaleno disponible para la biodegradación, pero puede tener implicaciones negativas para la monitorización de la calidad del aire y el cumplimiento de la legislación. Otros autores observaron hojas quemadas en alfalfa que crecían en suelo contaminado por HAPs y sugirieron que un compuesto no identificado del suelo había sido trasladado y volatilizado a través de la planta. Las hojas quemadas desaparecieron a medida que el experimento

iba progresando, indicando que la disipación de los contaminantes eran los responsables de este efecto (Wiltse y col. , 1998).

- **Rizodegradación.** También conocida como *rizorremediación* o *fitoestimulación* consiste en la eliminación de los contaminantes en el suelo como resultado de la actividad microbiana, que es mayor en presencia de la rizosfera. Las plantas y los microorganismos están involucrados, tanto directa como indirectamente, en la degradación o transformación de HAPs a productos, que son generalmente menos tóxicos y persistentes en el ambiente que los compuestos de origen. Sin embargo, a pesar de que las plantas y los microorganismos pueden degradar HAPs de forma independiente, el principal mecanismo mediante el cual los HAPs se degradan en el suelo es la interacción entre plantas y microorganismos en la rizosfera conocido como *efecto de la rizosfera*.

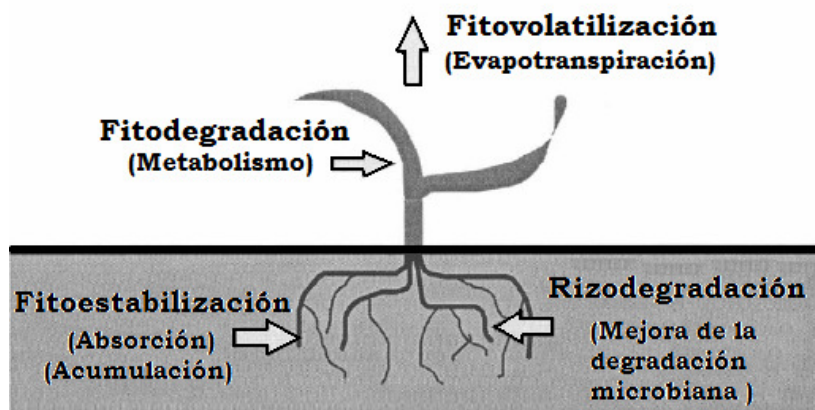


Figura I. 10.- Mecanismos envueltos en la fitorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. (Esquema modificado de Germida y col., (2002).

La rizosfera es la zona del suelo bajo la influencia directa de las raíces y se considera a la extensión comprendida entre 1-5 mm desde la superficie de la raíz. Las raíces de las plantas excretan una serie de compuestos orgánicos mediante *exudados*. Estos compuestos pueden ser

azúcares, polisacáridos, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, taninos, alcaloides, esteroides, enzimas, factores de crecimiento, tensioactivos, flavonoides, nucleótidos, etc. Todos ellos proporcionan una fuente rica de nutrientes para las poblaciones microbianas en la rizosfera (Pinton y col., 2007). De hecho, los compuestos derivados de la rizodeposición (liberación de compuestos orgánicos desde la raíz al suelo) tales como exudados, mucílagos y restos de raíz por desprendimiento de tejidos y células muertas, representan entre el 8 y el 86% del carbono neto anual fijado por fotosíntesis (Meng y Zhu, 2011). De estos compuestos se estima que los exudados constituyen entre el 40 y 90% (Lynch y Whipps, 1990; Pinton y col., 2007), los cuales pueden proporcionar carbono y energía suficientes para mantener un gran número de microorganismos, alrededor de  $10^8$ - $10^9$  microorganismos asociados a la rizosfera por gramo de suelo (Erickson y col., 1995). Debido a la presencia de estos exudados, las poblaciones y actividades microbianas son del orden de 5 a 100 veces mayor en la rizosfera que en la mayor parte del suelo. (Anderson y col., 1993; Gunther y col., 1996).

Estos consorcios microbianos, a su vez pueden ofrecer a las plantas diversos beneficios como la secreción de quelantes para aumentar la disponibilidad de minerales y su mejor absorción por la raíz, protección contra patógenos para la planta y degradación de los contaminantes antes de que puedan influir negativamente en el vegetal.

El éxito de la rizorremediación depende en gran medida de la capacidad de los microorganismos degradadores de los contaminantes presentes en el suelo para descontaminar, así como del crecimiento de las plantas que impulsan a los microorganismos a colonizar eficientemente las raíces. La quimiotaxis hacia compuestos específicos de los exudados de raíz puede ser la clave para la colonización eficiente de las raíces aunque la respuesta quimiotáctica puede ser provocada por diferentes compuestos en función de la especie colonizadora (de Weert y col., 2002; Kuiper y col., 2002). Ortega-Calvo y col., (2003) demostraron que se producía



quimiotaxis hacia naftaleno, fenantreno y exudados de raíz en bacterias de la rizosfera degradadoras de HAPs.

Cabe destacar que algunas especies de plantas pueden aumentar el número de degradadores en un gran volumen de suelo que se extiende más allá de la rizosfera (Siciliano y col., 2003; Leigh y col., 2006). Aunque la rizorremediación ocurre de forma natural, también se puede optimizar, mediante la manipulación deliberada de la rizosfera. Esto se puede lograr mediante el uso adecuado del par planta-microorganismo. Estas combinaciones pueden ser plantas y rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) o plantas y microorganismos degradadores de contaminantes. Por ejemplo, una especie de césped combinada con un microorganismo degradador de naftaleno que protege la semilla del césped de los efectos tóxicos del naftaleno, el crecimiento de las raíces impulsa a las bacterias degradadoras de naftaleno en el suelo, el cual podría haber estado profundamente distribuido en el suelo como para poderlo degradar en ausencia de raíces (Kuiper y col., 2004).

Asimismo, las plantas provocan la movilización de los HAPs en el suelo, dando lugar a su acumulación, en una forma más biodisponible, en zonas próximas a las raíces, posiblemente mediante el efecto combinado del flujo de agua a través de las raíces y la pseudosolubilización de los HAPs por compuestos orgánicos derivados de la planta (Liste y Alexander, 2000a; Liste y Alexander, 2000b).

Se conoce muy poco sobre la idoneidad de la especie de planta a utilizar en un proceso de fitorremediación de HAPs. Si bien la mayor parte de los estudios se han realizado con especies herbáceas (Aprill y Sims, 1990; Binet y col., 2000; Miya y Firestone, 2000), posiblemente por su fácil manejo en el laboratorio, especies del género *Pinus* (*P. banksiana*, *P. resinosa*, *P. strobus* y *P. sylvestris*) son también capaces de estimular la biodegradación de HAPs en el suelo (Heinonsalo y col., 2000; Liste y Alexander, 2000b). Claramente, la planta a utilizar debe ser capaz de crecer en presencia de los

contaminantes, y deben tolerar condiciones locales, tales como drenaje limitado o concentraciones altas de sal. Otras propiedades deseables incluyen crecimiento rápido, que sea perenne, y que posea un sistema radicular profundo y denso (Alexander, 1999). Esta última propiedad es relevante en el caso de contaminantes situados a cierta profundidad en el suelo, y añade interés al estudio de especies forestales, donde existe una información muy escasa.

Entre las especies estudiadas en la fitorremediación de HAPs, resulta de especial interés, de cara a esta Tesis Doctoral las que, aparte de tener las características anteriores, cumplan los dos criterios siguientes: a) una buena adaptación a las zonas mediterráneas con una contrastada utilidad en fitorremediación de suelos contaminados por HAPs y b) existencia de protocolos de propagación, tanto sexuales como agámicos, eficaces para su germinación y desarrollo en suelos contaminados por HAPs, así como para la propagación clonal posterior. Estas dos condiciones las cumplen, entre otras, *Festuca arundinacea* Schreb; *Lolium perenne*, L. y el girasol *Helianthus annuus*, L.

***Festuca arundinacea*. Schreb.** Pertenece a la familia de las Poaceas y se conoce vulgarmente como festuca alta, vive en juncuales, riberas de ríos, lagos, arroyos y pastos. Esta planta perenne se ha usado ampliamente en la fitorremediación de HAPs y se ha constatado su éxito en la supresión de varios de estos compuestos (Shann y Boyle, 1994; Cunningham y col., 1996; Banks y col., 1999; Cheema y col., 2009). Parrish y col., (2004) encontraron que entre varias especies fue esta planta la que desarrolló una mayor biomasa tanto en raíces como en parte aérea y la que eliminó un porcentaje mayor de contaminante. Epuri y Sorensen (1997) indicaron el claro efecto de esta especie en la mineralización y extractabilidad de benzo(a)pireno en un suelo contaminado con este HAP. Parrish y col., (2005) cultivaron *Festuca arundinacea* durante 12 meses en invernadero, en macetas con suelo que contuvieron 15 tipos de HAPs y observaron que las poblaciones microbianas degradadoras de

estos compuestos fueron 100 veces mayores en las macetas con estas plantas que en el control (sin planta). Huang y col., (2004) destacaron su capacidad de mantener o, incluso incrementar, el contenido de agua en los tejidos fotosintéticos y aumentaron el desarrollo de las raíces facilitando el transporte de fotoasimilados en condiciones de alto estrés provocado por creosota. Aparte de la conocida capacidad de germinación de las semillas de esta especie, que la hacen muy adecuada para su uso inicial en suelos contaminados, existen protocolos eficaces para su micropropagación. Seko y Nishimura (1996) estudiaron el efecto del CO<sub>2</sub> sobre la supervivencia de regenerantes *in vitro* en medio de cultivo sin azúcar. Gyulai y col., (1995) incluyeron esta especie en un amplio estudio sobre desarrollo *in vitro* de Monocotiledóneas de cara a su interacción con microorganismos. Cao y col., (2006) optimizaron las técnicas de cultivo *in vitro* para regenerar plantas de *Festuca arundinacea* y *Lolium perenne* transformadas con *Agrobacterium*.

***Lolium perenne*, L.** conocida vulgarmente como vallico, pertenece también a las Poaceas, es perenne y muy común en praderas y céspedes formando parte importante de los pastos, por lo que es alimento diario del ganado. Johnson y col., (2004) demostraron que un suelo plantado con *Lolium perenne* y *Trifolium repens* junto a un inóculo de la bacteria *Rhizobium leguminosarum trifolii* presentó una concentración menor de HAPs extraíbles que el suelo sin plantar, tras 180 días de experimentación y aumentando (tras este periodo) la biomasa microbiana en los suelos tratados. Olson y col., (2007) estudiaron la capacidad de uso en fitorremediación de 18 especies, tanto Monocotiledóneas como Dicotiledóneas, y destacaron, entre las primeras, a *Lolium perenne* y *Andropogon gerardii*, como las más efectivas y, en ambos casos multiplicaron por dos el descenso de los HAPs testados a los 220 días de experimentación. *L. perenne* cuenta con sistemas de propagación tanto convencionales por semillas como mediante micropropagación (Creemersmolenaar y col., 1992), incluso se han obtenido plantas de *Lolium perenne* más tolerantes a suelos salinos mediante transgenización con

*Agrobacterium tumefaciens* (Wu y col. , 2005), al que hay que unir el trabajo ya citado para *Festuca* de Cao y col., (2006).

***Helianthus annuus*, L.** El girasol, perteneciente a la familia Asteracea es ampliamente conocido por la producción de aceite de sus semillas. Es una planta anual, que puede alcanzar los dos metros de altura. Esta especie se ha usado como piloto en experiencias de fitorremediación de HAPs, y presenta cierta sensibilidad al fluoranteno, en comparación con otras especies como *Faba vulgaris* (Kummerova y col. , 2001). En experimentos con fluoreno, antraceno, pireno y criseno, el girasol comparado con otras especies, elimina en mayor medida que el resto, los HAPs citados del suelo, sobre todo al final del experimento (Maliszewska-Kordybach y Smreczak, 2000). Estos autores indicaron que entre un grupo de especies ensayadas, el girasol fue el que presentaba mejor respuesta a la germinación de semillas y elongación radical en suelos con los HAPs antes citados. Olson y col., (2007) encontraron que dentro de las Dicotiledóneas, *Helianthus annuus* es la que mejor responde en presencia un suelo muy contaminado con HAPs frente a otras 11 especies de Dicotiledóneas ensayadas. Respecto a su propagación, por ser una especie ampliamente cultivada, las semillas disponibles en el mercado presentan una máxima capacidad de germinación. Así mismo, la metodología de propagación *in vitro* está ampliamente desarrollada desde hace años (Trifi y col., 1981; Cavallini y Lupi, 1987; Imhoff y col., 1996). Existen otros trabajos que inciden en el cultivo de protoplastos de esta especie (Wingender y col. , 1996), en el control genético de plantas obtenidas por organogénesis *in vitro* (Berrios y col. , 1999), en el uso del saco embrionario como material de partida (Popielarska y Przywara, 2003) y en el cultivo de embriones cigóticos (Sujatha y Prabakaran, 2001) o somáticos (Petitprez y col. , 2005). Por otro lado, los biocombustibles se consideran como una de las alternativas ecológicas al petróleo, a fin de reducir, a corto plazo, las emisiones de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, contribuyendo así a reducir el efecto invernadero. Entre los biocombustibles, el biodiesel es una fuente de energía renovable, biodegradable y no tóxico.

En Brasil, uno de los países más desarrollados en lo referente a biodiesel, basa la producción de este biocombustible en la utilización del girasol (Tavares y col. , 2011). Por lo que cabría la posibilidad de combinar la capacidad de esta planta para recuperar suelos contaminados con HAPs, y su uso potencial para la obtención de biodiesel, de manera alternativa e independiente de la aplicación habitual en alimentación.

Una vez seleccionada la planta más adecuada, según los supuestos anteriores, lo más interesante del estudio por su complejidad, es ver los principales procesos involucrados en rizodegradación de HAPs, los cuales se resumen en la Figura I.11.

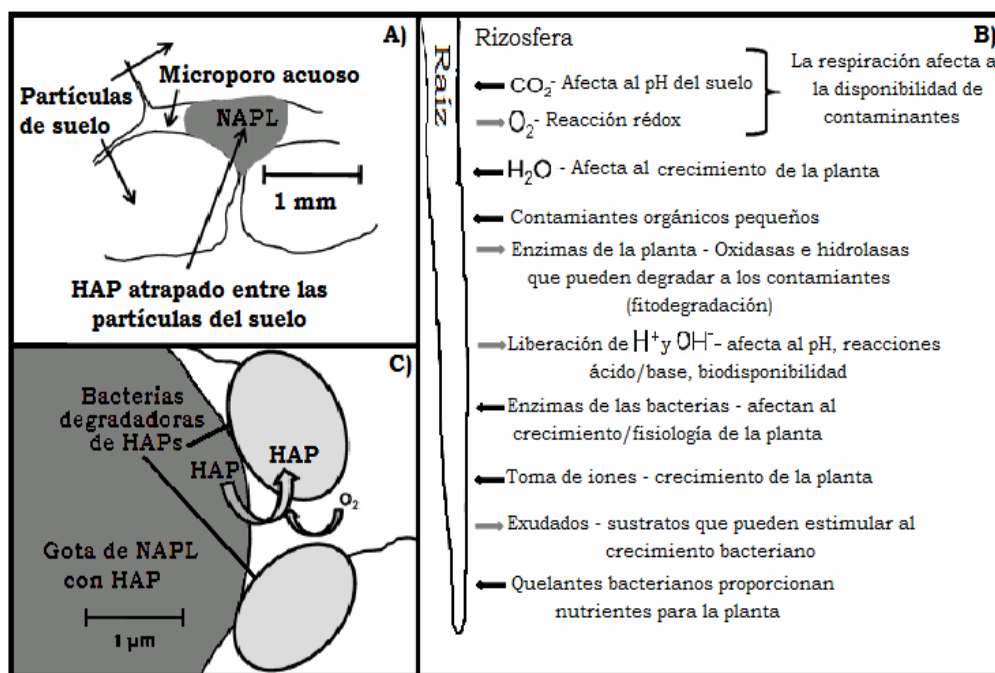


Figura I. 11.- Rizorremediación de HAP. A) Biodisponibilidad del HAP en NAPL: el contaminante orgánico se encuentra unido a las partículas de suelo o físicamente atrapado en microporos donde no son fácilmente biodisponibles. B) Procesos generales que afectan a la rizorremediación: las raíces de las plantas sustentan el crecimiento microbiano en la superficie de la raíz y en la rizosfera. Las raíces crean canales en el suelo que permiten el movimiento de  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , que son lo suficientemente anchos para que los contaminantes tengan una mayor accesibilidad microbiana. C) Degradación aeróbica de HAPs: en la interfase agua/NAPL los microorganismos utilizan métodos de adhesión o surfactantes mejorando la accesibilidad y por tanto aumentando la descontaminación del suelo (Gerhardt y col. , 2009).

Además del aumento de la actividad y de las poblaciones microbianas, se debe tener en cuenta que las raíces adquieren agua del suelo fomentando la translocación de los contaminantes disueltos en la rizosfera (Ferro y col., 1994), que los tensioactivos procedentes de exudados de raíz pueden aumentar la solubilidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos y mejorar así su biodisponibilidad (Song y col., 2004) y que las raíces pueden mejorar la difusión de oxígeno, proporcionando canales de flujo de aire (Child y col., 2007). La disponibilidad de oxígeno es importante, debido a la degradación de los HAPs por ciertas bacterias del suelo, incluyendo a las micobacterias, que realizan las transformaciones a través de dioxigenasas.

### **I.7.3. Materia orgánica disuelta: Ácidos húmicos**

En el medio acuático, aproximadamente entre un 75 y 99% del carbono orgánico está en forma de partículas o como materia inerte disuelta (el resto está presente en los organismos vivos). Las concentraciones de materia orgánica disuelta (MOD) en aguas naturales se encuentran dentro del rango de 0.5 a 50 mg/L. La MOD está predominantemente compuesta por sustancias húmicas (SH) que constituyen entre el 40-80% del total de MOD (Steinberg y col., 2006). En sedimentos, el carbono orgánico formado por SH puede representar hasta un 20% del total de su peso seco (Akkanen y col., 2005). Las SH son productos naturales formados por diagénesis de la descomposición de la materia orgánica, que incluye degradación y procesos de condensación. Generalmente, las SH se pueden dividir en ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) y huminas coloidales o insolubles, que difieren tanto en sus propiedades fisico-químicas como biológicas. Debido a la amplia gama de tamaño molecular nominal y grupos funcionales, estos compuestos son generalmente definidos por su solubilidad en soluciones alcalinas o por sus características espectrales.

Pan y col., (2007) encontraron que las afinidades de adsorción de los HAPs variaron entre AH, AF y las fracciones de huminas debido a las diferencias entre ellas, citadas anteriormente. También se demostró que el pireno en el HA fue más disponible que en humina durante la biodegradación (Tang y col., 2008). La distribución de HAPs en diferentes fracciones húmicas podría dar una idea del mecanismo que rige la biodisponibilidad de los HAPs en suelos.

Engelbreton y Vonwandruszka (1994) describieron la forma que podían tener los ácidos húmicos, que poseían una especie de microestructura micelar similar a la de los tensioactivos (Figura I.12).

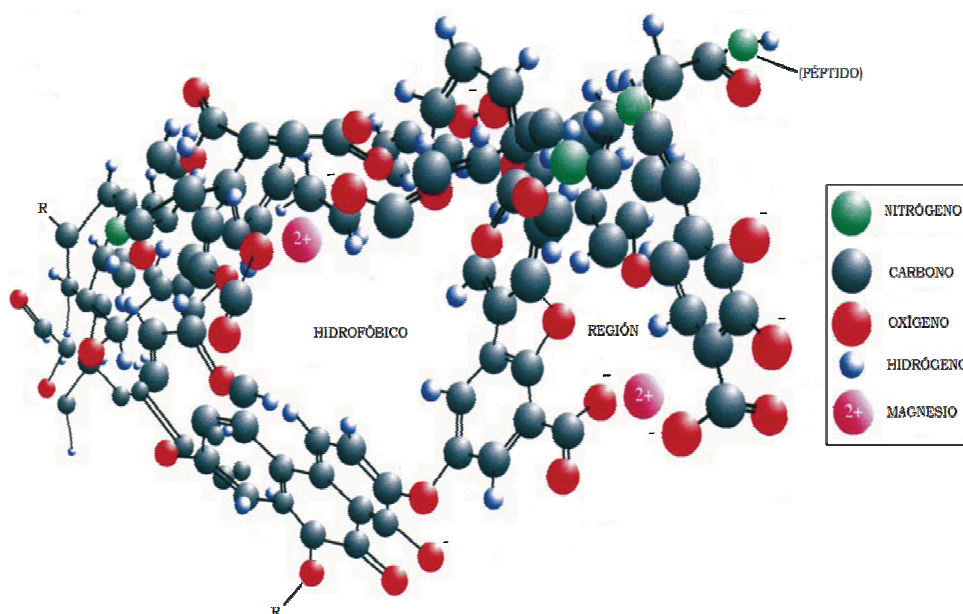


Figura I. 12.- Estructura de los ácidos húmicos mostrando la contribución de Mg<sup>2+</sup> en la formación de un microambiente hidrofóbico intramolecular. R, es la continuación de unidades estructurales similares. (Esquema modificado de Engelbreton y Vonwandruszka, 1994).

Esta microestructura acelera la degradación de HAPs mediante el aumento de la solubilidad de estos contaminantes, promoviendo su biodisponibilidad para los microorganismos. A pesar del gran número de artículos que

hablan de la importancia de los AH en la biorremediación de diferentes contaminantes antropogénicos (Haluska y col., 1995; Fu y col., 1999), su papel en la detoxificación de los HAPs por los microorganismos se mantiene incierto. Existen estudios de los efectos de los AH sobre la biodegradación de los HAPs en ambientes geológicos saturados de agua y en medios acuosos que presentan aumento de la degradación (Ortega-Calvo y Saiz-Jimenez, 1998; Haftka y col., 2008; Smith y col., 2009), otros que muestran inhibición y otros que muestran ningún efecto (Laor y col., 1999).

Se sabe que la biodegradación de los HAPs depende del flujo de masa total hacia las células degradadoras. Las bacterias degradadoras suelen tomar los HAPs disueltos por difusión desde los alrededores de la fase acuosa hacia las células. Aquí, las concentraciones disueltas determinan la biodisponibilidad, y bajas concentraciones libres disueltas pueden producir una biodegradación lenta. Debido a la baja solubilidad de los HAPs y a su alta hidrofobicidad, estos compuestos son adsorbidos de tal forma que las concentraciones libres disueltas son bajas. Además, si el depósito de concentraciones libres disueltas se agota por biodegradación, por una cinética de desorción limitada, como por ejemplo en microporos de la materia sólida, la reposición es limitante. Algunos de estos HAPs permanecerán inaccesibles y persistentes durante mucho tiempo. Existe un amplio número de artículos que indican que hay otras vías de transporte que puedan proporcionar HAPs adicionales para las células degradadoras. La mayoría de las evidencias provienen de la cinética de degradación en presencia de surfactantes artificiales y naturales. Dependiendo del tipo de tensioactivo y de bacteria, la fracción de HAP en forma de micela puede estar directamente biodisponible para las células bacterianas sin necesidad de ser desorbida pasando a ser una concentración libre disuelta. Esto se ha atribuido a la interacción de la micela del tensioactivo con la superficie de la célula, seguida por la liberación directa de HAP intercalado. Mientras que los AH pueden disminuir la biodegradación, reduciendo la concentración de HAPs libres disueltos por



sorción, los AH además pueden actuar como transportadores de HAPs (Totsche y col., 1997; Haftka y col., 2008).

Normalmente la adsorción de COH a la materia orgánica disuelta (MOD) se expresa como un coeficiente de reparto ( $K_{OC}$ ) del compuesto químico entre la MOD y las fases acuosas libres.

La determinación del  $K_{OC}$  requiere de medidas o cálculos de la cantidad de compuesto químico sorbido al carbono orgánico disuelto (COD) y la concentración del compuesto químico libre disuelto en la fase acuosa. Para determinar la concentración libre disuelta del contaminante en disoluciones que contienen COD se necesita una técnica que pueda medir directamente esta concentración sin tener necesidad de hacer una separación de fases, de forma que se pueda conocer la concentración libre disuelta y la concentración del contaminante unida a la MOD. Gauthier y col., (1986) fueron los primeros en introducir el uso del quenching de fluorescencia como un método no destructivo para determinar constantes en equilibrio de interacciones entre materiales húmicos disueltos y HAPs sintéticos. Otros investigadores han empleado técnicas similares para determinar constantes de unión con naftaleno (Traina y col., 1989) y fenantreno (Magee y col., 1991) en presencia de carbono orgánico disuelto en agua para saber qué es lo que ocurre entre naftaleno o 1-naftol y ácidos húmicos (Morra y col., 1990). Cualquier proceso en el que disminuya la fluorescencia de un compuesto es conocido como quenching de fluorescencia, este fenómeno se utilizó para desarrollar una nueva técnica conocida como ***Espectrofotometría de fluorescencia sincrónica***.

Las técnicas más comunes para la determinación de HAPs son los métodos cromatográficos, especialmente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con fase reversa (con columna C18 para resolver problemas de co-elución con HAPs isoméricos) con detección fluorimétrica. Esta técnica logra la separación de los 16 HAPs de la EPA. No obstante los métodos cromatográficos son caros, consumen mucho tiempo y requieren grandes cantidades de disolventes.

Por otro lado, los procedimientos espectroscópicos han estado muy limitados a causa de una gran similitud química entre los diferentes HAPs. La fluorimetría convencional es muy sensible, pero no permite el análisis de matrices multicomponente debido al solapamiento de las bandas espectrales, las cuales suelen ser por lo general anchas.

El desarrollo de la espectrofluorimetría ha permitido la obtención de picos estrechos, por lo que puede ser utilizada para mezclas multicomponente. La técnica es muy simple, rápida y sensible.

La espectrometría de fluorescencia sincrónica fue introducida por Lloyd en 1971 para el análisis cualitativo y cuantitativo de aceites de máquinas. Esta técnica consistió en el uso simultáneo de longitudes de onda de excitación y de emisión existiendo siempre entre ambas longitudes un incremento fijo, es decir, que se produce un barrido de ambas longitudes de onda separados un cierto  $\Delta\lambda$ . Este barrido del espectro con los dos monocromadores sincronizados (excitación y de emisión) hacen que se estrechen los anchos de banda de los picos consiguiendo una simplificación notable del espectro. Un parámetro importante es la diferencia de longitudes de onda que separa los dos monocromadores, por lo que un menor valor de  $\Delta\lambda$  conlleva a un aumento de la resolución, aunque siempre esto no es así. Para cada analito se debe optimizar experimentalmente esta variable instrumental.

# CAPÍTULO II

## *Objetivos*

- *“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto y pensar lo que nadie más ha pensado”.*

**Werner Heisenberg**  
(1901-1976).



El objetivo principal de esta tesis, corresponde a la evaluación de la biodisponibilidad y metabolismo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en distintos escenarios relevantes para las técnicas de bioestimulación.

La degradación microbiana es el proceso primordial de eliminación de los HAPs. Debido a que las tasas de biodegradación de estos hidrocarburos mediante atenuación natural son muy lentas, a menudo se ha recurrido a la adición de bioestimulantes específicos en procesos de biorremediación. Se pretende por tanto determinar el mecanismo por el que estos bioestimulantes aceleran la biodegradación, y en concreto si es a través del aumento de la biodisponibilidad.

Los objetivos específicos son:

1. Caracterizar el efecto del fertilizante oleofílico S-200 y sus componentes sobre la mineralización, y bioaccesibilidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) disueltos en fases orgánicas no acuosas puras (disolventes orgánicos) y presentes en mezclas complejas líquidas tales como fuel pesado.
2. Estudio del efecto de la rizosfera sobre la biodisponibilidad de HAPs en suelos contaminados con creosota, en concreto estudiando su efecto sobre los microorganismos autóctonos del suelo contaminado con creosota y la influencia de los exudados sobre la accesibilidad microbiana de HAPs.
3. Influencia de los ácidos húmicos sobre la accesibilidad microbiana de HAPs empleando métodos de reparto con fase sólida dominante (polidimetilsiloxano).



# **CAPÍTULO III**

## *Materiales y Metodología*

- *"Una experiencia  
nunca es un fracaso,  
pues siempre viene a  
demostrar algo".*

**Thomas Alva Edison**  
(1847-1931).





### III.1. REACTIVOS

**Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).** Se utilizaron fenantreno (98%) y pireno (98%), ambos distribuidos por la casa comercial Sigma Chemical Co. Los compuestos radioquímicos fueron suministrados por Sigma Chemical Co (St Louis, MO): fenantreno-9-<sup>14</sup>C [actividad específica, 13,1 mCi/mmol; pureza radioquímica, >98%], fluoranteno-3-<sup>14</sup>C [actividad específica, 45 mCi/mmol; pureza radioquímica, >98%] y pireno-4,5,9,10-<sup>14</sup>C [actividad específica, 55 mCi/mmol; pureza radioquímica, >98%].

**Tensioactivo.** El tensioactivo empleado fue Brij 35 (C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>) tratándose de un tensioactivo no-iónico (Poerschmann y col. ) y suministrado por Sigma -Aldrich.

**Bioestimulantes.** El fertilizante oleofílico usado como bioestimulante fue S-200, fabricado y suministrado por IEP Europe (Madrid). Contiene urea (fuente de N) y ésteres fosfóricos (fuentes de P), en una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados en la que predomina el ácido oleico como producto oleofílico. Contiene como disolventes 2-butoxi-etanol y glicol-éter, además de llevar como base agua. Los ácidos húmicos empleados fueron ácidos húmicos suministrados por Aldrich y ácidos húmicos extraídos de un suelo localizado en el Parque Nacional de Doñana, cerca del lago de Santa Olalla (Huelva) (Lahlou y col., 2000). Ácido oleico (90%) fue suministrado por Aldrich y urea por la casa Fluka.

**Disolventes.** Todos los disolventes utilizados (acetona, diclorometano, metanol y acetonitrilo) fueron de calidad HPLC y fueron suministrados por Merck.

### III.2. LÍQUIDOS EN FASE NO ACUOSA (NAPLs)

En este trabajo se emplearon 4 líquidos en fase no acuosa:

- 2,2,4,4,6,8,8- heptametilnonano (HMN), n-hexadecano (HD) y di-2-etilhexil-ftalato (DEHP) se obtuvieron de Sigma Chemical Co, todos ellos con una pureza igual o superior a 98%.
- Fuel pesado, RMG 35 (ISO 8217), obtenido de la Oficina Técnica de Vertidos Marinos Accidentales (OTVM), Universidad de Vigo.

Las constantes fisico-químicas de cada NAPL utilizado, relevante para este estudio y disponible en la literatura (Carroquino y Alexander, 1998) o proporcionada por OTVM, son la solubilidad en agua,  $S_w$  (mg/L); partición octanol-agua,  $\log k_{ow}$ , densidad,  $D$  (g/L), y la viscosidad,  $V$  (centistokes, cSt). Los valores de estas constantes fisico-químicas correspondientes a cada NAPL los podemos ver en la Tabla III. 1.

Tabla III. 1.- Propiedades fisico-químicas de los NAPLs.

<b>NAPLs</b>	<b><math>S_w</math>(mg/L)</b>	<b>Log <math>k_{ow}</math></b>	<b><math>D</math> (g/mL)</b>	<b><math>V</math> (cSt)</b>
DEHP	$2.2 \cdot 10^{-5}$	7.45	0.981	81.4 (20°C)
HD	$0.283 \cdot 10^{-3}$	9.16	0.773	3.03 (25°C)
HMN	$0.278 \cdot 10^{-3}$	8.25	0.793	3.18 (25°C)
FUEL PESADO	-	-	0.981	380 (50°C)

Con el fin de reducir la viscosidad y permitir que los resultados fueran reproducibles en los experimentos de biodegradación y de reparto, las muestras de fuel pesado se mezclaron en la proporción siguiente: 1 g de fuel con 1 mL de HMN o DEHP. El resultado de estas muestras de NAPL más fluidas, a las que se refiere como fuel/HMN y fuel/DEHP,

tenían viscosidades a 25°C de  $13.99 \pm 0.28$  y  $31.16 \pm 0.14$  cSt, respectivamente. Estos valores de viscosidad se determinaron mediante el tiempo que transcurre cuando pasa el fluido a través de una pipeta de 10 mL comparándolo con HMN (Birman y Alexander, 1996).

### III.3. SUELOS

Se utilizaron dos tipos de suelo en este trabajo:

A) **Suelo contaminado por creosota.** Este suelo fue facilitado por EMGRISA (Empresa de Gestión de Residuos Industriales, Sociedad Estatal, Madrid, España) responsable de la gestión ambiental del emplazamiento. Las muestras procedían de una antigua planta de tratamiento de maderas situada en Andalucía con un alto contenido en HAPs (Niqui-Arroyo y col., 2006). Se utilizó una pala excavadora para recoger las muestras del horizonte superficial del suelo hasta un metro de profundidad que es hasta donde penetró la creosota (Figura III.1). Una vez cogidas las muestras de suelo se guardaron en contenedores especiales para este tipo de muestras y se mantuvieron a 4°C hasta su posterior utilización.

B) **Suelo no contaminado.** Se trata de un suelo franco arenoso con el 67% de arena lavada (Aquarama) y 33% de suelo de Vega procedente de la finca experimental “Las Hampas” del IRNAS-CSIC en Coria del Río (Sevilla). La mezcla de ambos suelos contenía un pH de 8.73, 27.5% de  $\text{CaCO}_3$ , 1.75% de materia orgánica, 0.096% de nitrógeno orgánico (Kjeldahl),  $13.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de fósforo disponible y  $428 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de potasio. La distribución de tamaño de partículas fue: 19.5% de arena de grano grueso, 39.9% de arena de grano fino, 15.9% de limo y 24.6% de arcilla.



Figura III. 1.- Emplazamiento contaminado con creosota. Fotos de la zona y del muestreo de suelo.

### III.4. BACTERIAS, MEDIOS, CONDICIONES DE CULTIVO Y PREPARACIÓN DE INÓCULOS

La estirpe utilizada en esta Tesis Doctoral fue *Mycobacterium gilvum* VM552. Esta estirpe procede de un suelo contaminado con HAPs y es capaz de crecer con fenantreno, fluoranteno y pireno como única fuente de carbono y de energía (Wick y col., 2002; van Herwijnen, 2003). También se han observado resultados de degradación, mediante procesos cometabólicos, de antraceno y benzo(a)pireno (Bueno-Montes y col., 2011).

El medio líquido utilizado para cultivar la estirpe se denomina Medio Suiza (SW), (pH=7, Tabla III. 2). El cultivo se realizó en agitador orbital a 30°C, 150 revoluciones por minuto (rpm) y con 0.2 % (p/v) de fenantreno como fuente de carbono. Los cristales de fenantreno fueron previamente esterilizados mediante disolución en diclorometano y posterior recristalización.

Esta estirpe forma en medio sólido de agar soja triptona suplementado (TSA, Cultimed, Panreac Química, S. A.) colonias redondas de color amarillo-anaranjado y de aspecto mucoso y brillante. Este medio rico (Tabla III. 2) se preparó añadiendo a un medio denominado MSB (minimal salts medium), el peso adecuado de agar soja triptona (42 g/L).

En los ensayos de biodegradación, se empleó el medio de mineralización (MM, Tabla III. 2) cuyo pH fue igual a 5.7, siendo suficientemente ácido como para permitir la liberación del  $^{14}\text{CO}_2$  generado durante el proceso de biodegradación del sustrato marcado, y su captura en la trampa alcalina.

Para la preparación de los inóculos, se siguió el siguiente procedimiento:

1º) Se filtró a través de una placa porosa n°2 (40  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro) 1000 mL de cultivo para los experimentos de interfase constante y 100 mL de cultivo para los experimentos

de mineralización con exudados y ácidos húmicos, cada uno incubado con fenantreno como fuente de carbono adecuada.

2º) Se mantuvo el cultivo bacteriano filtrado, durante 24 h, en agitación a 30°C y 150 rpm, para eliminar los posibles cristales residuales de fenantreno en solución.

3º) Después de la incubación del cultivo filtrado, éste se sometió a varios ciclos de lavado para liberar el pellet bacteriano de restos de metabolitos. Este lavado consistió en varias centrifugaciones con medio de mineralización durante 10 minutos a 8000 rpm (para los experimentos de interfase constante) y 5 minutos a 10000 rpm (para los experimentos de mineralización en presencia de exudados y ácidos húmicos).

4º) Tras el lavado, el pellet se resuspendió en un volumen conocido de medio de mineralización estéril. Las células viables se determinaron en cada experimento como unidades formadoras de colonias (CFU) después de sucesivas diluciones del pellet con medio de cultivo y siembra en placas de TSA (Tryptone Soy Agar). También se midió la densidad óptica del inóculo a 600 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Genesys 10vis, Spectronic Unicam).

Tabla III. 2.- Composición por litro de los distintos medios utilizados en esta tesis. Los reactivos marcados con \* se autoclavaron por separado de los marcados con \*\* y se mezclaron una vez enfriados. Los marcados con \*\*\* se añadieron por filtración a través de millipore de poro 0.2 µm.

<b>Compuesto</b>	<b>Medio Suiza (SW)</b>	<b>Medio Mineralización (MM)</b>	<b>MM con N ajustado (MMNA)</b>	<b>Medio MSB</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	3.52g **			670 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g **	900 mg**	900mg **	340 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		100 mg**	100 mg **	
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.1 g*			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g*			
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.05 g*			
CaCl <sub>2</sub>		80 mg*	80 mg*	14 mg
NH <sub>4</sub> Cl				500 mg
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		100 mg*	876 mg*	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		100 mg*	100 mg*	112 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.5 µg***			5 mg
ZnCl <sub>2</sub>	5 µg***			
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	30 µg***			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5.5 µg***			
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	19.5 µg***			
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.7 µg***			
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.3 µg***			
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O		2 µg***	2 µg***	
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O		2 µg***	2 µg***	
CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O		2 µg***	2 µg***	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	10 µg***	1.4 µg***	1.4 µg***	2.5 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O		2 µg***	2 µg***	
CuSO <sub>4</sub>	2.5 µg***			
Na <sub>2</sub> EDTA	2 mg***			
FeCl <sub>2</sub>	0.75 mg***			
LiCl	1.25 µg***			
SnCl <sub>2</sub>	1.25 µg***			
KBr	5 µg***			
KI	5 µg***			
BaCl <sub>2</sub>	1.25 µg***			
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O		10 mg***	10 mg***	0.22 mg
TSA				40 g
pH	7.0	5.7	5.7	7.0

### III.5. ANÁLISIS DE HAPs POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La instrumentación utilizada fue un cromatógrafo líquido de alta resolución (Waters 996 Separation Module) de fase reversa equipado con un detector de UV-VIS (Waters 996 Photodiode Array Detector) y otro detector de fluorescencia (Waters 474 Scanning Fluorescence Detector). La columna empleada está especialmente indicada para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Waters PAH column, C<sub>18</sub>, 5 µm de tamaño, 4.6 x 250 mm). Los componentes de la fase móvil, acetonitrilo de calidad HPLC (Merckx y col. ) y agua Milli-Q, fueron filtrados previamente a su uso para aumentar la vida útil de la columna, utilizando para ello un filtro de membrana de nylon de 0.45 µm de poro y 47 mm de diámetro (Teknokroma, Barcelona, España).

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

- Flujo fase móvil: 1 mL/min.
- Temperatura de la columna: 30°C.
- Volumen de inyección 80 µL.
- Tiempo de análisis 50 min.

El gradiente empleado para la fase móvil lo podemos ver en la Tabla III. 3 (Garagorri y col. , 1999), así como la programación del detector de fluorescencia en la Tabla III. 4.

Tabla III. 3.- Gradiente empleado como fase móvil en el análisis de muestras de reparto.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Acetonitrilo (%)</b>	<b>Agua Milli-Q (%)</b>
0	45	55
5	45	55
25	95	5
31	100	0
38	100	0
43	45	55



Tabla III. 4.- Programación del detector de fluorescencia.

<b>Tiempo (min)</b>	<b><math>\lambda</math> Excitación (nm)</b>	<b><math>\lambda</math> Emisión (nm)</b>
0.0	270	323
14.5	248	374
21.0	270	400
32.5	305	430
38.0	270	323

Estas condiciones analíticas se utilizaron en los análisis de los experimentos de reparto de los HAPs desde los NAPLs a la fase acuosa, en el ensayo del invernadero a tiempo inicial, intermedio (45 días) y final (90 días), así como, en los ensayos de mineralización con suspensiones de suelo contaminado con creosota mediante poblaciones autóctonas en presencia y ausencia de exudados de girasol a tiempo inicial y final.

Se realizó una recta de calibrado para el análisis de las muestras de cinco puntos, cubriendo el intervalo de concentraciones de las muestras a determinar. Los límites de detección y cuantificación de los componentes analizados se calcularon como tres veces y diez veces la desviación estándar relativa de la ordenada en el origen de la recta de calibrado. La curva de calibrado para el experimento de reparto de fenantreno fue del orden de  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , siendo el límite de detección igual a  $0.2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  y el límite de cuantificación igual a  $0.7 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , obtenidos con el detector de fluorescencia. La curva de calibrado para los HAPs de las muestras de suelo fue del orden de  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , los límites de detección y de cuantificación calculados aparecen en la Tabla III. 5.

Tabla III. 5.- Límites de detección y de cuantificación de los HAPs expresados en  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

<i>HAP</i>	<i>Límite de detección</i>		<i>Límite de cuantificación</i>	
	<i>Matriz diodos</i>	<i>Fluorescencia</i>	<i>Matriz diodos</i>	<i>Fluorescencia</i>
Fluoreno	0.02	0.90	0.31	2.00
Fenantreno	0.09	0.65	0.29	2.16
Antraceno	0.01	0.87	0.10	2.90
Fluoranteno	0.04	-	0.25	-
Pireno	0.01	0.35	0.04	1.18
Criseno	0.01	0.19	0.03	0.96

### **III.6. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL FERTILIZANTE OLEOFÍLICO EN LA BIODEGRADACIÓN DE HAPS**

#### **III.6.1. Experimentos de mineralización con el método de la interfase constante**

Para medir la mineralización de HAPs diana presentes en NAPLs se utilizó un sistema bifásico NAPL/agua (García-Junco y col., 2003; Tejeda-Agredano y col., 2011), que permite mantener la integridad de la fase orgánica y por tanto un área interfásica constante, con lo cual se evitan las posibles interferencias derivadas de la emulsión del fuel causada por el fertilizante oleofílico S-200. Los HAPs diana que se utilizaron en este ensayo fueron fenantreno, pireno y fluoranteno. Debido a la alta viscosidad del fuel pesado, para obtener resultados reproducibles fue necesario utilizar en todos los ensayos una mezcla de fuel con HMN o DEHP.

Los ensayos se realizaron por duplicado en matraces biométricos estériles de 250 mL de capacidad (Bellco Glass, New Jersey, USA) (García-Junco y col., 2001). Estos matraces son matraces modificados, constituidos por un cuerpo principal donde se colocó la fase acuosa (70 mL de medio de mineralización estéril con o sin 0.1 mL de S-200 más 1 mL de

inóculo, siendo la densidad bacteriana igual a  $3.7 \cdot 10^7$  células/mL para una absorbancia a 600 nm igual a 0.03) y un brazo lateral que contenía la trampa de sosa (1 mL a 0.5 M).

El fertilizante oleofílico S-200 fue previamente esterilizado en acetona dejándola evaporar completamente para volver al volumen de S-200 inicial.

Dentro del cuerpo principal del matraz biométrico se introdujo un cilindro de vidrio de 2 cm de diámetro y 10 cm de altura abierto por ambos extremos donde se colocó el NAPL. El cilindro contiene en su base cuatro ranuras de 6 mm de alto y 2 mm de ancho para permitir el intercambio de solución acuosa entre el interior y exterior del mismo.

En los experimentos con fuel, 1 mL de fuel contenía 80000 dpm de  $^{14}\text{C}$  de fenantreno, pireno o fluoranteno y se añadió sobre la superficie acuosa dentro del cilindro de vidrio descrito anteriormente.

Los experimentos con fenantreno presente en NAPLs puros se realizaron con 1 mL de HMN, DEHP, o HD conteniendo fenantreno marcado con  $^{14}\text{C}$  y fenantreno (no marcado) suficiente para alcanzar 1 mg de fenantreno por mL de NAPL.

Los matraces fueron sellados con tapones envueltos en Teflón y se incubaron a 25°C en agitador orbital a 80 rpm.

Las trampas alcalinas (1 mL, NaOH 0.5M) de  $^{14}\text{CO}_2$  fueron recogidas diariamente, se introdujeron en viales de centelleo de 7 mL, se mezclaron con 5 ml de líquido de centelleo (Ready safe, Beckman Instruments, Fullerton, California) y tras 8 horas en oscuridad para disipar su quimioluminiscencia, se cuantificó la radioactividad utilizando un contador de centelleo líquido (Beckman Instruments, Fullerton, California, modelo LS5000TD).

El uso de la misma densidad celular en todos los experimentos de mineralización permitió realizar comparaciones entre tratamientos diferentes.

Los balances de masa realizados después de los experimentos de mineralización detectaron el 90-105% de la radioactividad presente inicialmente en el sistema, lo que indica que no se obtuvieron pérdidas importantes de  $^{14}\text{CO}_2$  durante los experimentos de biodegradación, debido al buen sellado de los matraces con los tapones envueltos en Teflón (García-Junco y col., 2003).

Para determinar los porcentajes de biodegradación de alcanos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, sus alquil derivados y la posible acumulación de metabolitos de HAP en los ensayos de fuel en HMN, se incubaron varios matraces por duplicado en las mismas condiciones que en los ensayos de mineralización, pero sin la adición de compuestos marcados con  $^{14}\text{C}$ . Además, se incluyeron controles no inoculados para estimar pérdidas abióticas. Al final del tiempo de incubación (1500 h), tanto el NAPL como la fase acuosa de los cultivos y los controles fueron extraídos y analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Estos análisis se realizaron gracias a la colaboración del Departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona liderado por la Doctora Magdalena Grifoll y fueron claves para conocer el análisis químico del fuel residual y los metabolitos de los HAPs.

Algunos experimentos de mineralización se llevaron a cabo en presencia del tensioactivo no iónico Brij 35 ( $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). La concentración micelar crítica de este tensioactivo, determinada a  $25^\circ\text{C}$  con un tensiómetro de anillo TD1 Lauda (Lauda, Alemania), fue  $77 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

También se realizaron otros tratamientos con la adición de urea ( $14.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y ácido oleico ( $42.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), que se añadieron a la fase acuosa para llegar a la misma concentración de nitrógeno y de carbono orgánico total (COT), respectivamente, proporcionada por el bioestimulante S-200.

### III.6.2. Experimentos de reparto con el método del área interfásica constante

Estos ensayos se realizaron en las mismas condiciones que los experimentos de mineralización (apartado III.6.1), pero en ausencia de bacterias (Efroymsen y Alexander, 1995; Garcia-Junco y col., 2003; Tejeda-Agredano y col., 2011).

La cinética de reparto desde los distintos NAPLs hacia la fase acuosa fue determinada en Erlenmeyers de 250 ml de capacidad donde se introdujo 70 ml de medio de mineralización (MM) en condiciones estériles con o sin S-200 o Brij 35. Se colocó 1 mL de NAPL sobre la superficie acuosa dentro de cada cilindro de vidrio (apartado III.6.1).

Los matraces se cerraron con tapones envueltos en Teflón y se colocaron en agitador orbital a 80 rpm y 25°C. A un cierto intervalo de tiempo, se fueron sacando muestras de la fase acuosa del exterior del cilindro de vidrio para después medirlas mediante inyección directa en HPLC (Ver apartado III.5).

Para estudiar el reparto que se produce desde el NAPL que se encuentra en el cilindro de vidrio a la fase acuosa, nos basamos en la hipótesis de equilibrio local entre la fase acuosa y el NAPL donde la concentración de la fase acuosa vendrá dada por:

$$\frac{dC}{dt} = k' \cdot (C_{eq} - C) \quad (1)$$

$$C = K_D \cdot C^s \quad (2)$$

Donde **C** es la concentración en la fase acuosa de HAP a tiempo **t**, **C<sub>eq</sub>** es la concentración en fase acuosa que ha alcanzado el equilibrio con el NAPL, **K'** es la constante de transferencia de masa, **C<sup>s</sup>** es la concentración de HAP en el NAPL y **K<sub>D</sub>** es el coeficiente de reparto entre fase acuosa y NAPL.

Como el valor de  $C_{eq}$  no cambia, al encontrarse en el equilibrio, cuando integramos la ecuación (1) resulta:

$$C = C_{eq} \cdot [1 - \exp(-k \cdot t)] \quad (3)$$

El cálculo de  $C_{eq}$  y  $k$  se realiza mediante una aproximación de los datos experimentales por regresión no lineal (mediante excel, parámetros de Solver) obteniéndose la tasa máxima de reparto como  $C_{eq} \cdot k$ . Cuando la concentración de HAP en la fase acuosa no alcanzó el equilibrio, se realizó un ajuste de los datos experimentales a una regresión lineal.

### III.7. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS RAÍCES DE PLANTAS Y SUS EXUDADOS EN LA BIODEGRADACIÓN DE HAPs

#### III.7.1. Producción *in vitro* de exudados

Se desarrollaron diferentes sistemas de obtención de exudados de raíces de las siguientes especies seleccionadas por su capacidad fitorremediadora: a) ***Helianthus annuus* (girasol)** de la cual utilizamos dos tipos de semillas certificadas: las procedentes de la Universidad de California (Lote n° PR63A90) y las pertenecientes a la variedad Pilar certificadas por la Junta de Andalucía), b) ***Lolium perenne*** con referencia 330342-04 y c) ***Festuca arundinacea***, lote n° 006/330123-01, var. Fawn, en ambos casos certificadas y suministradas por la empresa Semillas Fitó.

En un primer ensayo, se usaron semillas de *Lolium* y *Festuca* de los lotes citados anteriormente que se germinaron *in vitro* sobre medio líquido con objeto de optimizar la obtención de exudados de raíces. Para esto, se esterilizaron por separado 24 semillas de *Lolium* y 24 de *Festuca*. La esterilización se realizó siempre en cabina de flujo laminar y mediante la inmersión de las semillas durante 1 minuto en etanol 96°, e inmediatamente inmersión de 30 minutos en NaClO (1% de cloro activo). Transcurrido este tiempo, se

eliminaron los restos de agente esterilizante mediante tres lavados de cinco minutos cada uno en agua destilada estéril.

Una vez finalizado el proceso y manteniendo las condiciones de asepsia, de las 24 semillas de cada especie (12 semillas de *Lolium* y 12 semillas de *Festuca*) se introdujeron cada una en tubos de ensayo (Figura III.2) de 150 x 25 mm de capacidad conteniendo cada uno 10 mL de medio líquido vid (VD) (Troncoso y col. , 1990) sin hidratos de carbono y 0.25 g de perlita donde se colocaron las semillas para evitar que se sumergiesen en el medio. Las otras 12 semillas por especie se depositaron cada una en sendos tubos de ensayo con 10 mL de medio líquido Suiza (SW, Tabla III. 2) y los 0.25g de perlita.

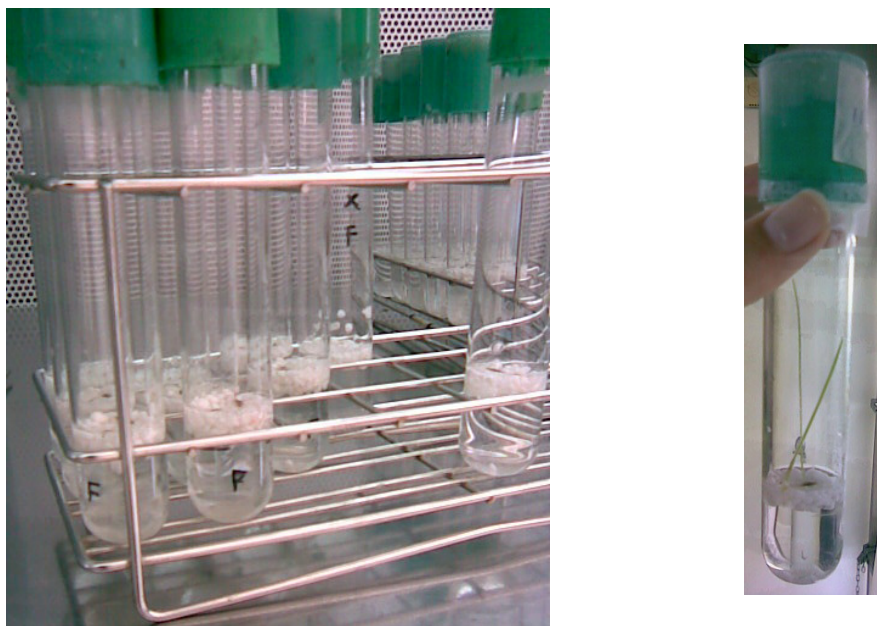


Figura III. 2.- Tubos de ensayo de 150 x 25 mm de capacidad para el primer ensayo de cultivo *in vitro* (foto de la izquierda). Desarrollo de una de las gramíneas *in vitro* (foto de la derecha, *Festuca*).

Después de tapar cada tubo con tapones de polipropileno transparente (Bellco, referencia K25) y sellarlos con parafilm, se envolvieron cada uno con papel de aluminio para conseguir oscuridad. El conjunto se colocó en cámara de cultivo a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  de temperatura. A los 3 días se observaron

las primeras germinaciones de semillas, por lo que se retiró el papel de aluminio, quedándose a una intensidad lumínica de  $2.75 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  y 18 horas de fotoperíodo. Transcurridos 45 días se vio un desarrollo adecuado de la zona radicular de las plantas de ambas especies. En consecuencia, se retiraron las plantas y se congeló el medio a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis tanto del carbono orgánico como del carbono orgánico total mediante el Servicio de Análisis del IRNAS.

Ante los resultados alentadores conseguidos en el primer ensayo, se realizó una producción de exudados a mayor escala.

Para ello, se prepararon frascos de 1000 mL de capacidad a lo que se les instaló en su interior un soporte a modo de cesta de tela metálica de acero inoxidable (0.98 mm de luz y 0.40 mm de diámetro) sostenida por hilos metálicos que se sujetaron en la boca del frasco que se cerró herméticamente. La longitud de estos hilos metálicos se calculó para que las semillas posicionadas en la cestilla estuvieran en contacto con el medio de cultivo (500 mL de MM), pero sin hundirse en él, lo que produciría efectos de anoxia y, en consecuencia, la germinación resultaría seriamente afectada. Gracias a este sistema (Figura III.3), las raíces que se van desarrollando se internan en el medio líquido donde vierten los exudados objeto de extracción, sin tener ningún tipo de participación la parte aérea.

Posteriormente, en el interior de la cabina de flujo laminar, se esterilizaron por separado dos grupos de 50 semillas de girasol mediante inmersión en etanol 96° durante 90 seg. Seguidamente ambos grupos se sometieron a una nueva inmersión en hipoclorito sódico ( $\text{NaClO}$ ) (3.5% de cloro activo) durante 30 minutos y para eliminar los restos de hipoclorito se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno en agua destilada estéril. De igual modo 200 semillas de *Lolium perenne* y 200 de *Festuca arundinacea* se esterilizaron por separado mediante inmersión en etanol 96° durante 90 segundos y posteriormente en  $\text{NaClO}$  (3.5% de cloro activo)



durante 20 minutos finalizando con los tres lavados con agua estéril de cinco minutos cada uno.



Figura III. 3.- Sistema utilizado para la obtención de exudados de girasol *in vitro*.

Una vez esterilizadas las semillas se colocaron los 2 grupos de 50 semillas en el caso del girasol, y 2 grupos de 100 para el caso de las dos gramíneas en cada uno de los 6 frascos con los soportes descritos anteriormente, previamente esterilizados en autoclave. A cada uno de los frascos se les añadió en cámara de flujo laminar, 500 mL de MM (pH=5.7) estéril sin reguladores de crecimiento y sin fuente de carbono, a fin de no interferir con los exudados de raíz y que fueran éstos los únicos compuestos hidrocarbonados disponibles para los microorganismos. Una vez sembradas las semillas y cerrados los frascos con parafilm, el conjunto se depositó en una cámara de cultivo a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $65.24 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ , para

potenciar la fotosíntesis dado que el medio de cultivo carece de fuente de carbono, y 18 horas de fotoperíodo. Transcurrido un mes de incubación en estas condiciones, se observó una germinación adecuada de las semillas con una proliferación del sistema radicular bastante aceptable, por lo que se separaron las plantas de los medios de cultivo con los exudados excretados en condiciones estériles. Los medios recogidos se centrifugaron durante 3 horas a 31000 g para obtener una solución nítida que incluye la materia orgánica disuelta potencialmente presente en el agua intersticial de los sedimentos (Haftka y col., 2008) y se almacena a -20°C hasta su uso en los experimentos de mineralización.

Se analizó el carbono orgánico total (COT) a los medios centrifugados, también mediante el Servicio de Análisis del IRNAS, Sevilla.

Dada la mayor concentración de exudados producidos por *Helianthus annuus*, estimada mediante la concentración de carbono orgánico total (COT) y su mejor crecimiento *in vitro*, se utilizaron preferentemente los exudados de esta planta en los posteriores ensayos de mineralización y eliminación de de HAP en invernadero.

Para llevar a cabo esta producción regular de exudados de raíces de girasol, se realizaron siete cultivos, usando siempre 50 semillas completas y esterilizadas en cabina de flujo laminar sumergiéndolas en etanol absoluto durante 3 minutos, inmediatamente después de la eliminación del etanol se introdujeron en una solución de hipoclorito sódico al 57% (14% de cloro activo) durante 25 minutos y posterior lavado de 5 minutos cada uno con agua esterilizada. Transcurridos 30 días, se cuantificó el número de plantas para calcular el porcentaje de germinación, el peso fresco y seco y la tasa de crecimiento relativo (relative growth rate, RGR) de la planta completa de acuerdo con la ecuación:  $RGR = (\ln pf - \ln pi) \cdot D^{-1}$  (Merckx y col., 1987) donde **pf** es el peso seco de la planta completa al final del experimento; **pi** es el peso seco al inicio del experimento (media de 5 plántulas

secadas 3 días después de la germinación de la semilla) y **D** es la duración del experimento en días. El secado de las plantas se efectuó manteniendo el material vegetal en estufa a 70°C durante 72 horas.

### **III.7.2. Mineralización de pireno en cultivos líquidos en presencia y ausencia de exudados de raíces de girasol**

Para ver el efecto de los exudados de raíces de girasol en la biodegradación de HAPs puros, llevamos a cabo dos tipos de estudios de mineralización de pireno en presencia o ausencia de estos exudados: Por debajo de la solubilidad del pireno ( $S=0.135 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a 25°C) a  $6\cdot 10^{-4} \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y por encima de la solubilidad del pireno a  $27.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

A) Para medir la mineralización del hidrocarburo **por debajo de su solubilidad**, se preparó una disolución de MM de 40 mL con  $4296 \text{ dmp}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Conociendo el valor de  $\text{dmp}\cdot\text{mL}^{-1}$  de esta disolución y la actividad específica podemos conocer la concentración del este hidrocarburo en la disolución. De esta manera, la disolución de pireno en MM era de  $7.21\cdot 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Una vez preparadas las disoluciones, éstas se añadieron por duplicado en tubos de pirex 18 x 100 cm hasta alcanzar una concentración de HAP marcado de  $6\cdot 10^{-4} \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en 5 mL de volumen total donde 0.5 mL eran de inóculo bacteriano (densidad óptica a 600 nm igual a 0.19 en los 5 mL totales,  $2.3\cdot 10^8$  células/mL) en ausencia o presencia de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de carbono orgánico procedente de los exudados de raíz de girasol.

En el interior del tubo de ensayo se colocó una varilla de vidrio de 5 cm para homogenizar la disolución en su interior durante la agitación a 80 rpm y 25°C. Los tubos de ensayo se cerraron con tapones envueltos en Teflón, de los cuales suspendían unos viales de 1 mL donde se colocaron las trampas de NaOH (1 mL a 0.5 M).

Se tomó diariamente 1 mL de la trampa de sosa para medir la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  como se ha descrito anteriormente.

B) Los experimentos de mineralización **por encima de la solubilidad** del pireno, se realizaron en los mismos tubos de ensayo y en las mismas condiciones de temperatura y agitación.

Se preparó una disolución de pireno en acetona ( $136 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de la cual se depositó 100  $\mu\text{L}$  en el fondo de los tubos de ensayo estériles añadiéndoles a cada tubo de ensayo el pireno marcado para conseguir una radiactividad de 40000 dpm por tubo y se dejó evaporar toda la acetona durante 24 horas, quedándose los cristales de HAP en el fondo del tubo.

Una vez evaporado todo, se añadieron las disoluciones de MM, exudados de girasol a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y 0.5 mL de inóculo bacteriano (Densidad óptica a 600 nm de  $0.19 \pm 0.03$ ,  $2.3\cdot 10^8$  células/mL para un volumen total de 5 mL). Como el volumen total para cada tratamiento fue de 5 mL, la concentración final de pireno que se obtuvo fue de  $27.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

La mineralización se pudo medir, recogiendo las trampas de sosa (0.5 M) diariamente como hemos descrito en el caso anterior.

### III.7.3. Ensayo en invernadero

El suelo utilizado en esta tarea fue una mezcla (1:1) de suelo contaminado con creosota y suelo no contaminado. La descripción de estos suelos aparece detallada en el apartado III.3.

El suelo no contaminado utilizado se autoclavó previamente antes de mezclarse con el suelo contaminado para que sólo existieran los microorganismos autóctonos de este último. La mezcla se secó ligeramente en estufa a  $30^\circ\text{C}$

durante 18 horas, posteriormente se molió y se realizó un cribado hasta obtener un tamaño de grano no superior a 2 mm.

Una vez finalizados estos tratamientos, la mezcla (1:1) se homogeneizó en una hormigonera durante períodos diarios de 9 horas a lo largo de una semana, cambiando periódicamente el sentido de giro para conseguir una mezcla óptima. Las **características finales de la mezcla (1:1)** fueron: 2.2% de humedad sobre peso húmedo, pH de 8.09; 15.9% de CaCO<sub>3</sub>, 0.69% de materia orgánica oxidable, 0.401% carbono orgánico oxidable, 0.055% de nitrógeno orgánico (Kjeldahl), 7.0 mg·kg<sup>-1</sup> de fósforo Olsen, 0.9% carbono orgánico total. Distribución de tamaño de partícula: 46.6% de arena de grano grueso, 4.3% de arena de grano fino, 15.8% de limo, y el 33.2% de arcilla. La clase textural fue: franco-arcillo-arenosa.

Por último, se realizó una extracción de los HAPs presentes en la mezcla homogénea de suelo (ver apartado III.7.4) para su posterior análisis por HPLC (ver apartado III.5). La concentración inicial de HAPs en la mezcla (1:1) fue igual a 21.75 mg·kg<sup>-1</sup> que corresponde al sumatorio de 6 PAHs (fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno y criseno). Se consideró que estos niveles de HAPs en el suelo fueron suficientes para permitir períodos de pruebas relativamente cortos y estimaciones precisas del proceso de biodegradación en nuestro sistema experimental. Además, las concentraciones resultantes pueden ser consideradas realistas por los suelos presentados en fuentes puntuales de contaminación debido a la eliminación de residuos industriales o derrames accidentales de hidrocarburos aromáticos policíclicos, que suelen contener concentraciones superiores a 1 mg / kg (Posada-Baquero y Ortega-Calvo, 2011).

Después de conocer el contenido de HAPs en el suelo y comprobar la homogeneidad de la mezcla, comenzó el ensayo en invernadero según el diseño experimental de la Figura III.4.



Figura III. 4.- Diseño experimental del ensayo realizado en invernadero. Los círculos simbolizan las macetas utilizadas y los colores nos indican el tipo de suelo empleado.

Se colocaron en el invernadero 20 macetas con 2 kg de suelo en cada maceta (10 kg de suelo no contaminado y 10 kg de mezcla (1:1)). En las macetas con planta se plantaron 5 semillas de girasol por maceta (50 semillas en total).

La duración de la prueba fue de 90 días. Las condiciones del invernadero fueron: temperatura  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ , régimen de luz natural y el sustrato se mantuvo a capacidad de campo mediante adición de 100 cc de agua de la red a cada maceta cuando fue necesario.

Se tomaron muestras de suelo y planta a tiempo inicial ( $T_0$ ), tras 45 ( $T_{45}$ ) y 90 días ( $T_{90}$ ) para comprobar la evolución de los HAPs en el suelo y su efecto sobre las plantas. Las muestras de suelo se extrajeron con un tubo de vidrio (20 g) y con cuidado para no dañar las plantas. Las muestras recogidas se congelaron ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) y se guardaron hasta su extracción (ver apartado III.7.4) y análisis por HPLC (ver apartado III.5). Además del análisis químico de los contaminantes así como de las propiedades del suelo a  $T_0$  y  $T_{90}$ , estas muestras fueron analizadas a nivel microbiológico gracias a la colaboración del Departamento de Microbiología de la Universidad de Barcelona liderado por la Doctora Magdalena Grifoll. También se guardaron muestras de la mezcla de suelo homogénea a  $T_0$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  y a  $4^{\circ}\text{C}$  para los experimentos de mineralización en suspensiones (apartado III.7.5).

El análisis microbiológico consistió en cuantificar las poblaciones microbianas (tanto heterótrofa como la degradadora de alto y bajo peso molecular de HAPs) mediante la técnica del número más probable (NMP) miniaturizado en placas de microtitulación, con 8 réplicas por dilución (Wrenn y Venosa, 1996). Y además se hizo un estudio de la composición de las comunidades microbianas mediante la técnica molecular de secuenciación directa de bandas de DGGE (gel de gradiente desnaturizante químico) para el análisis de genes que codifican el 16S rRNA. Esta técnica permitió la separación de una mezcla heterogénea de genes amplificados por PCR en un gel de poliacrilamida con un gradiente químico de formamida y urea en concentraciones crecientes en el sentido de la migración electroforética de muestras de suelo con creosota (mezcla 1:1, invernadero) control y suelo con creosota (mezcla 1:1, invernadero) en presencia de *Helianthus annuus* después de los 90 días que duró el experimento en invernadero. La separación de las moléculas de DNA se consigue porque durante su migración por el gel de poliacrilamida, el DNA, se encuentra con concentraciones crecientes de los agentes desnaturizantes formamida y urea, lo que genera diferentes horquillas de desnaturización, según la secuencia de las moléculas de DNA, traducándose en una reducción de la velocidad de migración y una separación en diferentes bandas de migración electroforética. Una vez las moléculas quedan separadas en el gel, es posible recortarlas y estudiar su secuencia, con el fin de asociar cada banda a un determinado grupo filogenético.

Al final del experimento se calcularon el porcentaje de germinación y el peso fresco y seco de tallos y raíces por separado. Para el peso seco se mantuvo el material vegetal durante 72 horas en estufa a 70°C.

### **III.7.4. Extracción de los HAPs del suelo y purificación de la muestra**

La extracción de los HAPs presentes en la mezcla de suelo (1:1) utilizada en el invernadero, así como su extracción en las suspensiones para los experimentos de mineralización se realizaron como se explica a continuación (esquema detallado en la Figura III.5):

1º) Se realizó una extracción Soxhlet de 250 mL de capacidad. Se utilizó como fase orgánica extractora 100 mL de diclorometano. Se pesó 2.8 g de suelo para las muestras del invernadero y 1 g para las suspensiones de los experimentos de mineralización. Todas las muestras se sometieron a un proceso de secado en estufa a 40°C durante 48 horas y posteriormente se eliminó la humedad restante mediante molienda de la muestra en un mortero de ágata junto a un peso equivalente a la muestra de sulfato sódico anhidro. Después estas muestras se introdujeron en unos cartuchos de celulosa (19 mm  $\varnothing_{\text{interior}}$  x 90 mm, Filtros Anovia, S.A., Barcelona, España) y se sometieron a extracción durante un periodo de 8 horas (Jones y col., 1989).

2º) El extracto orgánico obtenido se llevó al rotavapor hasta casi su sequedad y se resuspendió en 5 mL de diclorometano. Para eliminar los compuestos más polares del extracto, se pasó por un cartucho de fluorisil (Sep-Pak cartridges, WATERS) que permitió el paso de los compuestos apolares como los HAPs y retuvo los polares. El cartucho se acondicionó previamente con 9.5 mL de diclorometano con ayuda de una jeringa Hamilton. Después de pasar el extracto por el cartucho, se limpió el cartucho con 2 mL de diclorometano para arrastrar las trazas de HAPs que se hubieran quedado retenidas (Garrigues y Bellocq, 1989; Aceves y Grimalt, 1993; Leal-Granadillo y col. , 2000).

3º) Una vez que el extracto quedó limpio, se llevó a sequedad mediante corriente de nitrógeno. Se resuspendió en



un volumen conocido de acetonitrilo y se sonicó durante 15 minutos para alcanzar la completa disolución de los HAPs.

4°) Por último, la muestra en acetonitrilo se filtró mediante un filtro de Nylon ( $0.45\ \mu\text{m}$  y 13 mm de diámetro) para eliminar las posibles impurezas existentes en la disolución y se traspasó a un vial para ser analizada mediante HPLC (apartado III.5).

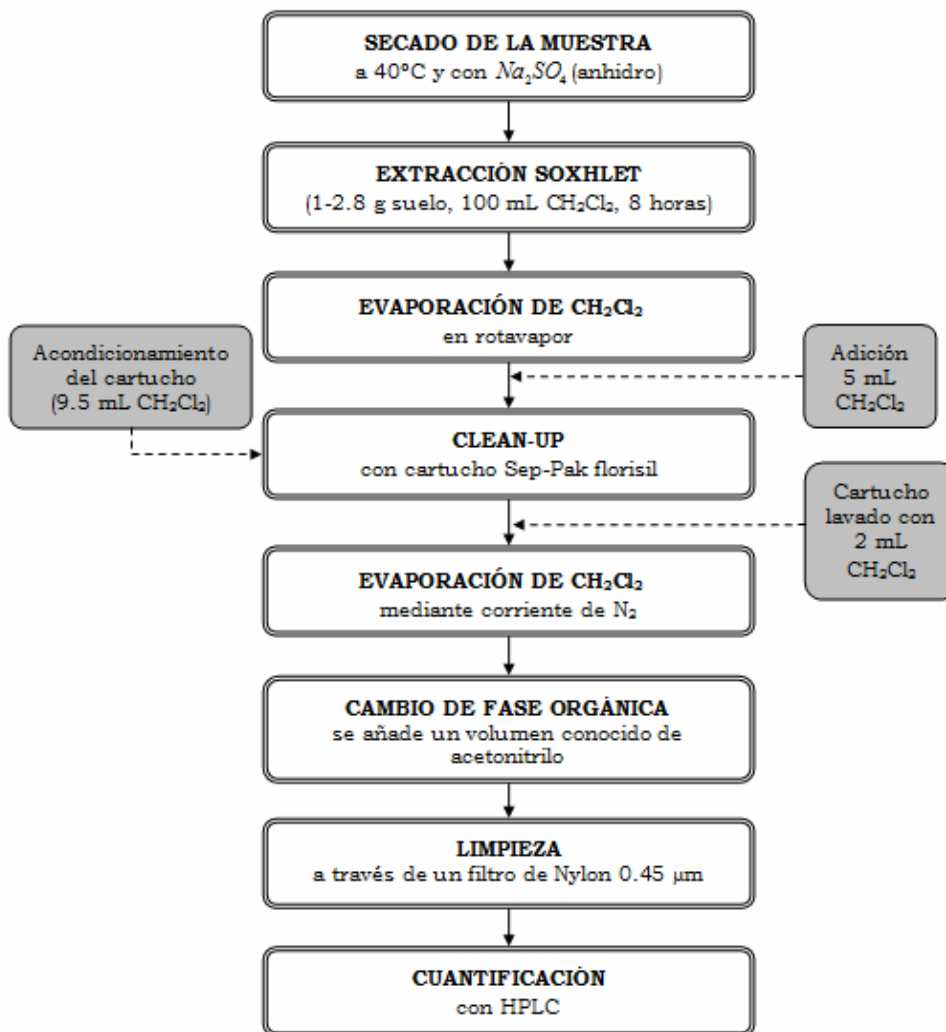


Figura III. 5.- Proceso de extracción y cuantificación de HAPs en suelos.

### **III.7.5. Experimentos de mineralización de pireno en suspensiones de suelo contaminado con creosota en presencia y ausencia de exudados de girasol**

El estudio de la mineralización del suelo contaminado con creosota se realizó en condiciones estériles del material utilizado y por duplicado. Se utilizaron dos series de matraces de 250 mL de vidrio con 1 g de suelo procedente de la mezcla homogénea a T<sub>0</sub> conservada a 4°C (apartado III.7.3). Se añadió en cada matraz 70 mL de exudados de girasol y 70 mL de MM para los controles.

1) En una primera serie de matraces se estudió la capacidad de degradación por las bacterias autóctonas mediante ensayos respirométricos. El pireno marcado con <sup>14</sup>C se añadió en una disolución de MM, conteniendo un total de 20000 dpm.

2) En la segunda serie de matraces correspondió a la réplica de la anterior pero sin el compuesto marcado.

Estos matraces se sellaron con tapones envueltos en teflón como en los apartados anteriores. La mineralización se midió como en los apartados III.6.1 y III.7.2.

Al finalizar estos ensayos de mineralización, se realizó una decantación de las suspensiones para separar la parte sólida de la líquida. Las muestras sólidas se sometieron a extracción Soxhlet y purificación de la muestra para ver la concentración residual de HAPs presentes en la suspensión mediante HPLC (apartado III.5).

## III.8. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE ÁCIDOS HÚMICOS EN LA BIODEGRADACIÓN DE HAPS

### III.8.1. Preparación de ácidos húmicos

Se preparó una disolución stock de  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos en una solución 0.1 M de sosa, el pH de esta disolución stock se ajustó a pH 6 con HCl (Ortega-Calvo y Saiz-Jimenez, 1998).

Conociendo la proporción de carbono orgánico total de los ácidos húmicos extraídos del suelo mediante su análisis y caracterización, obtuvimos las concentraciones deseadas ( $10$  y  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de COT) diluyendo la disolución stock con MM.

### III.8.2. Mineralización de pireno y fenantreno en cultivos líquidos en presencia o ausencia de ácidos húmicos

Con el fin de ver la influencia de la materia orgánica disuelta, procedente de ácidos húmicos extraídos del suelo de Santa Olalla (Huelva), sobre la biodegradación de HAPs puros por *Mycobacterium gilvum* VM552, se diseñaron varias situaciones:

A) **Por debajo de la solubilidad** de los HAPs en estudio ( $6\cdot 10^{-4} \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), de la misma forma que en el apartado III.7.2 y B) **por encima de su solubilidad** ( $14.4$  y  $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para fenantreno y  $1.62$  y  $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para pireno). Se añadieron diferentes concentraciones de ácidos húmicos del stock preparado en el apartado III.8.1 ( $0$ ,  $10$  y  $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en un volumen total de  $5 \text{ mL}$  de MM donde se añadió  $0.5 \text{ mL}$  de inóculo bacteriano ( $A_{600} = 0.2$ ,  $2.4\cdot 10^8$  células/mL). Esta serie de experimentos se mantuvieron en agitación orbital de  $80 \text{ rpm}$  y temperatura controlada de  $25^\circ\text{C}$ . En estas mismas condiciones de agitación y temperatura se realizaron otros ensayos en paralelo equilibrando las disoluciones durante  $24$

horas en agitación para posteriormente añadir el inóculo pero sólo para el estudio del pireno a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

En todas las situaciones, mantuvimos cerrados los recipientes con tapones envueltos en teflón de donde se suspende la trampa con 1 mL de sosa 0.5 M. La mineralización se midió igual que en los apartados anteriores (III.6.1, III.7.2 y III.7.5).

### **III.8.3. Experimentos de disolución de pireno en presencia y ausencia de ácidos húmicos. Control de la concentración libre disuelta**

Los experimentos de disolución se realizaron para conocer la velocidad de disolución de pireno a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  presente en los diferentes medios con o sin  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos. Estos experimentos se realizaron en las mismas condiciones que los experimentos de mineralización del apartado anterior (III.8.2) pero sin añadir el inóculo bacteriano ni la trampa de sosa.

Para medir la velocidad de disolución de la concentración de pireno total y libre en disolución, se preparó una serie doble en paralelo de tubos (apartado III.7.2) por triplicado con  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de pireno en presencia o ausencia de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos en medio de mineralización (MM) a 80 rpm y  $25^\circ\text{C}$ . Se colocó 30000 - 40000 dpm de pireno marcado radioquímicamente por tubo. El método empleado para añadir los compuestos marcados y no marcados fue el mismo que el utilizado en el apartado III.7.2. Se cogieron muestras de 0.3 mL de cada tubo cada hora durante un total de 8 horas y una última muestra 24 horas después. Las muestras se guardaron en viales de HPLC (Teknokroma, 2 mL de capacidad) hasta su medida. Las primeras 5 muestras se cogieron de la primera serie de tubos y las siguientes 5 muestras se cogieron de la segunda serie (con la misma composición y condiciones de incubación que la primera serie), de esta manera evitábamos un cambio brusco del volumen total.

La **concentración de pireno libre disuelto** se determinó por espectrofotómetro sincrónico de fluorescencia (Fluorescent spectrophotometer F-2500, HITACHI). Las muestras homogeneizadas se traspasaron del vial de muestreo a una cubeta de cuarzo (1 cm de longitud de camino) con una pipeta pasteur de vidrio. El barrido de longitud de onda fue de  $\Delta\lambda=100$  nm, de tal forma que la longitud de onda de excitación fue a 272.4 nm y la de emisión a 372.4 nm. El ancho de ranura de entrada era de 2.5 nm, el de salida de 5 nm y la velocidad de barrido de 240 nm/min.

Para estudiar la disolución de pireno en medio MM en presencia o ausencia de ácidos húmicos fue necesario calcular un factor de corrección del filtro interno para aplicarlo a la medida realizada por el espectrofotómetro sincrónico de fluorescencia. Para calcular este factor se midió por Espectrómetro Ultravioleta/Visible (Parking Elmer, Lambda EZ210) a  $\lambda_{\text{excitación}}=272.5$  y  $\lambda_{\text{emisión}}=372.5$  nm la absorbancia de la disolución control (MM) y la absorbancia de la disolución con ácidos húmicos en MM. La ecuación a seguir para calcular este factor fue la siguiente según Gauthier y col., (1986):

$$F = \frac{F_{\text{cor}}}{F_{\text{obsd}}} = \frac{2.3 \cdot d \cdot A_{\text{ex}}}{1 - 10^{-d \cdot A_{\text{ex}}}} \cdot 10^{g \cdot A_{\text{em}}} \cdot \frac{2.3 \cdot s \cdot A_{\text{em}}}{1 - 10^{-s \cdot A_{\text{em}}}}$$

Donde  **$F_{\text{obsd}}$**  es la intensidad observada,  **$F_{\text{cor}}$**  es la intensidad corregida,  **$d$**  es el ancho de la cubeta de cuarzo (1 cm),  **$g$**  es la distancia desde el borde del haz de la muestra hasta el borde de la cubeta (0.4 cm),  **$A_{\text{ex}}$**  y  **$A_{\text{em}}$**  son las absorbancias medidas por Ultravioleta a longitud de onda de excitación y de emisión respectivamente.

Además de calcular este factor se hizo un tratamiento de las intensidades de fluorescencia obtenidas de las muestras para convertirlas a concentraciones (concentración libre de pireno disuelto,  **$C_{\text{libre}}$** ).

$$[C_{\text{libre}}] = \frac{(M - B) \cdot F}{P}$$

Donde **M** es la intensidad de fluorescencia de la muestra, **B** es la intensidad de fluorescencia del espectrofotómetro sincrónico en ausencia de pireno para conocer el background de la disolución de MM en presencia o ausencia de ácidos húmicos, **F** es el factor calculado previamente y **P** es la pendiente de la curva de calibrado obtenida a diferentes concentraciones de pireno (pendiente igual a 0.8 con r=0.93).

La ventaja de utilizar este tipo de instrumentación para conocer la concentración de pireno disuelto es que las mismas muestras que se introducen en el espectrofotómetro de fluorescencia sincrónica, se pueden re-utilizar para medirlas por contador de centelleo (Beckman Instruments Fullerton, California, modelo LS5000TD) trasvasando las muestras de la cubeta de cuarzo a los viales de 7 mL de capacidad con 5 mL de líquido de centelleo (Ready safe, Beckman Instruments, Fullerton, California) para calcular la **concentración de pireno total** presente en la muestra.

Utilizando la combinación de ambos instrumentos, espectrofotómetro de fluorescencia sincrónica y el contador de centelleo se determinó la concentración libre en disolución y la concentración total de pireno respectivamente en la misma muestra con ácidos húmicos.

Para estudiar la cinética de disolución del pireno en presencia o ausencia de ácidos húmicos, se utilizó el mismo ajuste empleado en el estudio del reparto desde NAPLs (apartado III.6.2).

Por otro lado, se realizó un **experimento de biodegradación** utilizando las mismas condiciones de incubación y concentraciones tanto de pireno (esta vez sin añadir pireno marcado con <sup>14</sup>C) como de ácidos húmicos pero esta vez añadiendo *M. gilvum* VM552 en la misma proporción que en el apartado de mineralización III.8.2 para conseguir

una absorbancia de  $A_{600} = 0.2$  ( $2.4 \cdot 10^8$  células/mL). Se colocó una serie de tubos de ensayo en paralelo para medir la concentración de pireno en disolución a medida que la bacteria iba degradando el compuesto para poder controlar la cantidad de pireno libre presente en disolución en todo momento. La toma de muestra se realizó como en los ensayos de disolución y el análisis de la concentración libre disuelta se llevó a cabo mediante espectrofotometría de fluorescencia sincrónica, tal y como se ha descrito anteriormente.

### **III.9. ENSAYOS CON TÉCNICAS DE DOPAJE PASIVO CON POLIDIMETILSILOXANO**

#### **III.9.1. Preparación de viales con polidimetilsiloxano empleados en dopaje pasivo**

Tanto la preparación de los viales con polidimetilsiloxano como las técnicas utilizadas con este tipo de silicona, fueron realizadas gracias a los conocimientos adquiridos mediante estancias de dos meses en el 2009 y 2010 en National Environmental Research Institute (NERI) en Roskilde (Dinamarca) bajo la supervisión del Dr. Philipp Mayer.

En la preparación de viales con silicona (polidimetilsiloxano, PDMS) fijada en la base de cada vial, se utilizaron viales de cristal de 10 mL de capacidad con tapones de rosca forrados con teflón (Supelco) en el estudio del aumento de la capacidad de los bioestimulantes por captar los HAPs y viales de 20 mL para los ensayos de mineralización.

Se preparó el PDMS mezclando el pre-polímero y su catalizador como indicaron las instrucciones del fabricante (Silastic MDX4-4210, Dow Corning) y se dejó en reposo en el frigorífico a 5°C durante una hora para obtener una textura homogénea. Con la ayuda de una jeringa de plástico se introdujo  $500 \pm 5$  mg de silicona en el fondo de cada vial.

Los viales con PDMS en el fondo, se mantuvieron a 5°C durante 72 h para reducir las burbujas de aire, luego se pusieron a temperatura ambiente durante 72 h y a 110°C durante una noche para fijar bien la silicona.

Una vez fijada la silicona, se prosiguió con su limpieza mediante 3 lavados de etanol (96%) con los viales totalmente cerrados y manteniendo un contacto total de 48 horas para eliminar impurezas y oligómeros. Después de este tiempo se hicieron 3 lavados con agua Milli-Q durante 24 horas para eliminar los restos de etanol.

Por último, los viales con el polímero se secaron a 110°C durante una hora y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su uso en los ensayos de biodegradación o de disolución del pireno.

Para la esterilización de estos viales, se realizaron 3 lavados con etanol absoluto durante 72 horas, luego 3 lavados con agua Milli-Q autoclavada y por último, se eliminó el agua para secarlos en estufa a 80°C durante 24 horas.

### **III.9.2. Estudio de la mineralización y disolución de pireno en presencia y ausencia de ácidos húmicos en viales con PDMS**

Para ver el efecto de los ácidos húmicos ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sobre la biodegradación de pireno a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y su disolución en MM, se usaron los viales con PDMS fijada en su base para controlar la concentración de pireno libre disuelta.

En estos viales con PDMS (Figura III.6) y en condiciones estériles, se fijó 100  $\mu\text{L}$  de pireno en acetona ( $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) como en los apartados de mineralización (III.8.2) y de disolución (III.8.3) para tener una concentración de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en un volumen de 5 mL. Se añadió 15000 dpm de  $^{14}\text{C}$ -pireno en acetona por vial. Se dejó evaporar la acetona durante 24 h y el pireno quedó retenido en la silicona debido a la alta hidrofobicidad de la silicona. A continuación, se añadieron las



disoluciones de medio MM (control) y  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos de Santa Olalla en MM. Por último se colocó 0.5 mL de inóculo bacteriano (*M. gilvum* VM552,  $A_{600\text{nm}} = 0.16$ ,  $1.9 \cdot 10^8$  células/mL) en los **experimentos de mineralización**.

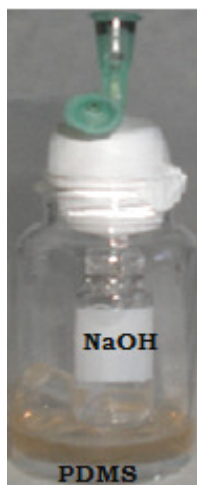


Figura III. 6.- Viales de dopaje pasivo con PDMS fijados en su base para la mineralización de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de pireno por *Mycobacterium gilvum* VM552 en presencia de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos extraídos de Santa Olalla, Huelva.

Los viales fueron sellados con tapones envueltos en teflón, de los cuales pendían las trampas de NaOH (1 mL, 0.5 M). En el interior de estos viales se colocaron unas barritas de vidrio de 5 cm de longitud para homogeneizar la mezcla durante su incubación en agitador orbital a 80 rpm y  $25^\circ\text{C}$ . Las muestras de NaOH con  $^{14}\text{CO}_2$  producido de la mineralización del pireno, fueron recogidas a diario en viales de centelleo de 7 mL junto a 5 mL de líquido de centelleo (Ready safe, Beckman Instruments, Fullerton, California) y transcurridas 8 horas de oscuridad para disipar su quimioluminiscencia, fueron medidas por contador de centelleo (Beckman Instruments, Fullerton, California). Se realizaron triplicados por cada tratamiento (con o sin  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos de Santa Olalla).

En el caso de los **ensayos de disolución** de pireno a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , se emplearon los mismos viales de la Figura III.6 con las mismas disoluciones que en los ensayos de mineralización

y las mismas condiciones de incubación, pero sin añadir los microorganismos ni la trampa de sosa. Al igual que en el apartado III.8.3, se prepararon varias series de tratamientos en paralelo para evitar un cambio brusco de concentración al muestrear. Se recogieron 0.5 mL de muestra durante 8 horas y la última muestra 24 horas después. Estas muestras también fueron medidas por contador de centelleo (Beckman Instruments, Fullerton, California) para conocer la concentración total de pireno en todo el proceso ya que la concentración disuelta se controló con la presencia de la silicona.

### **III.9.3. Estudio de la difusión de PAHs en presencia de los 3 bioestimulantes empleados en biodegradación**

Para estudiar la influencia de los bioestimulantes empleados en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, se utilizaron unas siliconas de polidimetilsiloxano con forma de discos (SSP-M823), con un espesor de  $600 \pm 10 \mu\text{m}$  y 6 mm de diámetro, que fueron suministradas por Specialty Silicone Products, Inc. (Ballston Spa, NY).

Sodeman Industrifjedre A/S (Viby, Dinamarca) suministraron arandelas de acero inoxidable de  $100 \mu\text{m}$  (ID 4mm, OD 8 mm) que se utilizaron como separadores. Se seleccionaron de las arandelas suministradas aquellas que tuvieron un radio de  $100 \pm 5 \mu\text{m}$ . Los imanes utilizados fueron unos discos de neodimio-hierro-boro niquelados con 10 mm de diámetro y un espesor de 5 mm, fueron suministrados por Farnell (Herlev, Dinamarca).

Los HAPs estudiados fueron; fenantreno (98%, Aldrich), fluoranteno (99%, Aldrich), pireno (99%, EGA), benzo(a)antraceno (Aldrich), criseno (95%, Aldrich), benzo(k)fluoranteno (98%, Aldrich) y benzo(a)pireno (98%, Aldrich).

Más de 1000 discos de PDMS se limpiaron 3 veces con 200 mL de metanol durante 24 h. Estos discos se contaminaron con una mezcla metanol: agua (90:10, v/v) que contenían los HAPs a una concentración de 40-47  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  cada hidrocarburo. El contacto total entre los discos y la mezcla fue de 16 horas para que los HAPs quedaran retenidos en el PDMS. En el mismo día que se realizó el experimento de difusión, los discos contaminados se trasladaron a un vaso de precipitado con un volumen pequeño de agua (mL/disco) con el fin de eliminar el metanol.

El experimento consistió en una serie de microcámaras (Figura III.7) para medir la transferencia de masa mediante reparto-difusión-reparto, poniendo 10  $\mu\text{L}$  de las disoluciones en estudio con los bioestimulantes entre un disco contaminado con HAPs y un disco limpio.

Los bioestimulantes empleados fueron: fertilizante oleofílico (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), exudados de girasol (71.7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y ácidos húmicos (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) extraídos de Santa Olalla en MM.

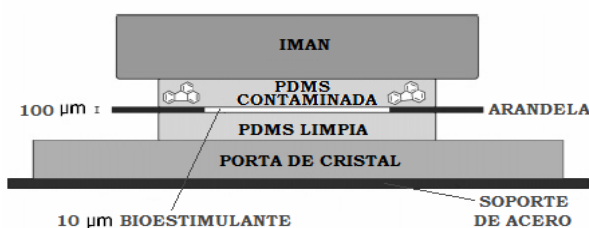


Figura III. 7.- Sección transversal del diseño experimental de las microcámaras empleadas en el estudio del aumento de difusión en presencia de los diferentes bioestimulantes utilizados. (Modificación de Mayer, P., y col., 2005).

Las diferentes matrices se colocaron en cada microcámara y quedaron fijadas en el medio por una arandela de acero inoxidable de 100  $\mu\text{m}$  de espesor. Las diferentes disoluciones que componen las matrices en estudio son el factor variable de este diseño experimental y forman el modelo “Unstirred Boundary Layer” (UBL) citado en la introducción I.3.

Las microcámaras se colocaron sobre una placa de vidrio horizontal con soporte de acero y se mantenían unidas gracias al empuje de un imán. Todas las microcámaras se realizaron sobre un porta de cristal 40 x 60.

De esta forma los HAPs pasaron por reparto del disco de PDMS a la matriz en estudio, mediante difusión a través de los 100  $\mu\text{m}$  del modelo UBL y finalmente por reparto al disco de PDMS limpio.

Se cogieron muestras por triplicado en períodos de tiempo de 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 min, 24 y 48 h. Las medidas se realizaron quitando el imán y transfiriendo cada disco a 0.4 mL de metanol (para los discos limpios) y a 4 mL de metanol (para los discos contaminados con HAPs) para extraer los HAPs y medirlos por HPLC.

El HPLC utilizado tenía detección por fluorescencia (Agilent 1100 system con G1321A FLD, ex. 260 nm; em 350, 420, 440 y 500 nm). La columna de separación "CP-Ecospher 4 PAH" fue obtenida por Varian Inc. (Palo Alto, CA) y operaba a 0.5 mL/min (28°C, 30  $\mu\text{L}$  de inyección). Metanol (grado HPLC suministrado por Merck) y agua Milli-Q eran la fase móvil: 50% metanol a t=0-2 min, gradiente lineal desde 50 a 75% metanol a t=2-7 min, gradiente lineal desde 75 a 100% a t=7-35 min y 100% metanol a t=33-55 min.

La cuantificación de las concentraciones de HAPs en los extractos se realizó por una curva estándar externa de cinco puntos. El análisis de las muestras se llevó a cabo dentro de dos semanas después de la toma de muestras. La integración de la señal se realizó con HP Chemstation software (A.06.03, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) y se corrigió a mano cuando fue necesario.

Generalmente, se recuperó entre un 90-100% de los HAPs iniciales en el extracto final de los discos contaminados y limpios respectivamente, indicando un completo balance de masas.

Finalmente, el porcentaje que fue transferido al disco limpio fue ajustado para cada HAPs con la ecuación (1), con el fin de determinar la tasa de velocidad constante  $\alpha$ , que luego se normalizó con la constante de velocidad determinada por el agua destilada (ecuación 2). Estas regresiones no lineales se realizaron mediante mínimos cuadrados con el programa GraphPad Prizm 5 (San Diego, CA).

$$\frac{m_{dl}(t)}{m_0} = \frac{C_{dl}(t)}{C_0} = 50\% \cdot (1 - e^{-2\alpha t}) \quad (1)$$

Donde  $m_{dl}$  es la masa de HAP en el disco limpio,  $m_0$  es la masa de HAP inicial y  $\alpha$  es la constante de velocidad ( $s^{-1}$ ).

$$\frac{\alpha_i}{\alpha_j} = K_{ij} \cdot \frac{D_i}{D_j} \quad (2)$$

Donde  $K_{ij}$  es el coeficiente de reparto entre el medio  $i$  y el medio  $j$ ,  $D$  es el coeficiente de difusión para el medio  $i$  y para el medio  $j$  y  $\alpha_i/\alpha_j$  es la relación entre velocidades que describe una conductividad relativa para la transferencia de masa por difusión. Para mas detalle ver la introducción (apartado I.6).

### **III.9.4. Ensayos de dopaje pasivo en el estudio de la capacidad extractora de HAPs por los bioestimulantes empleados en biodegradación**

Para conocer la capacidad de los bioestimulantes en captar los HAPs de un medio donde se encuentran contenidos (en este caso la silicona), se propuso el siguiente esquema experimental.

Primero se usaron viales de vidrio de 10 mL de capacidad con silicona (PDMS) fijada en el fondo de su base (Ver apartado III.8.4.1). Estos viales fueron expuestos a una disolución saturada de PAHs al 10 % de su solubilidad en metanol. Los HAPs utilizados fueron: naftaleno (>99%,

Aldrich), fenantreno (>98%, Merck), antraceno (>99%, Fluka), fluoranteno (>99%, Aldrich) y pireno (>99%, Sigma). Los cristales de los HAPs en metanol mantuvieron el nivel de saturación.

La silicona de estos viales contiene los HAPs debido al reparto de estos hidrocarburos desde el metanol a la silicona a 22°C durante un periodo mínimo de 72h. Después de que la silicona captara los HAPs, el metanol fue cuidadosamente retirado y se limpió la superficie con un tisú para eliminar cualquier solución adherida. Por último, se lavó la silicona 3 veces con agua Milli-Q para eliminar el posible metanol retenido y se secó con un tisú (Smith y col., 2010).

Una vez preparados los viales con los HAPs retenidos en la silicona, se añadió 3 mL de agua Milli-Q en cada vial y equilibramos los viales a 20°C y 1000 rpm durante 24. Todo el experimento se realizó en una habitación con temperatura controlada. Después de este tiempo, se tomó 0.75 mL de cada muestra y se mezclaron con 0.75 mL de metanol para medirlas por HPLC con detector de fluorescencia. De esta cuantificación se obtuvo una concentración de HAPs disuelta, **C<sub>1</sub>**.

Se retiró el agua Milli-Q y se añadió 3 mL de los siguientes bioestimulantes en cada vial: ácidos húmicos de Santa Olalla (10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), exudados de girasol (71.7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), exudados de Lolium (10.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y exudados de Festuca (17.8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), además del control MM. Se alcanzó el equilibrio de estas disoluciones a las 24h de incubación, se cogieron muestras después de alcanzar el equilibrio (0.75 mL de muestra + 0.75 mL de metanol) y se midió la concentración mediante HPLC con detector de fluorescencia. De esta cuantificación se obtuvo una concentración total de HAPs, **C<sub>t</sub>**.

Por último, se retiraron las disoluciones con los bioestimulantes y se añadió 3 mL de agua Milli-Q en cada vial, se equilibraron los viales con agua de igual modo que en los casos anteriores. Se tomaron las muestras y se realizó

cuantificación de la misma manera. De esta medida se obtuvo una concentración en disolución de HAPs,  $C_2$ .

También se colocaron unos viales con agua Milli-Q en paralelo a 20°C y 1000 rpm, para controlar que no existía una desviación en las medidas de  $C_1$  y  $C_2$ .

De esta forma se puede saber que en el equilibrio existe una concentración de HAPs libre disuelta ( $C_{ld}$ ) dada por la ecuación 1.

$$C_{ld} = C_{Agua} = \frac{C_1 + C_2}{2} \quad (1)$$

Mientras que el aumento de la capacidad ( $AC$ ) de captar los HAPs de las disoluciones con los bioestimulantes en estudio viene expresada por la siguiente ecuación (2).

$$AC = \frac{C_t}{C_{ld}} \quad (2)$$





# CAPÍTULO IV

## *Resultados*

- “Cuando puedes medir aquello de lo que hablas, y expresarlo con números, sabes algo acerca de ello; pero cuando no lo puedes medir, cuando no lo puedes expresar con números, tu conocimiento es pobre e insatisfactorio: puede ser el principio del conocimiento, pero apenas has avanzado en tus pensamientos a la etapa de ciencia”.

*William Thomson Kelvin*  
(1824-1907).



## **IV.1. FERTILIZANTE OLEOFÍLICO**

### **IV.1.1. Caracterización del fertilizante oleofílico S-200**

Este bioestimulante contribuyó con  $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  del carbono orgánico total (COT),  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de N y  $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de P total en la disolución de medio de mineralización (MM) utilizada en los experimentos de biodegradación (en una proporción de 0.1 mL en 70 mL de MM, ver apartado de Materiales y Métodos, III.6), información obtenida por el Servicio de Análisis del IRNAS, Sevilla. Esto significó un aumento del 0.4% y del 0.003% en la concentración total de N y P, respectivamente, en el medio MM.

Se determinó la tensión superficial de la disolución de MM a  $25^{\circ}\text{C}$  mediante un tensiómetro de anillo de platino (TD1 Lauda, Hucha-Erlös) (Laha y Luthy, 1992; Garcia-Junco y col., 2003), disminuyendo de  $62$  a  $34\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  en presencia del bioestimulante.

El efecto del bioestimulante (10:1, v/v) sobre la viscosidad se determinó en una muestra de fuel/HMN, resultando un valor de la viscosidad de  $13.03 \pm 0.7$  cSt, solamente un 7% más bajo que sin bioestimulante.

### **IV.1.2. Influencia del fertilizante oleofílico en la biodegradación de los componentes del fuel**

La mineralización de fenantreno, fluoranteno y pireno inicialmente presentes en el fuel/HMN se representa en la Figura IV.1. Los datos, obtenidos de forma simultánea para las tres gráficas, indican que la mineralización fue diferente cuando el bioestimulante oleofílico estaba presente. El bioestimulante no afectó a la fase inicial (las primeras 100 h) de mineralización, pero el consiguiente aumento en la tasa de

biodegradación no se produjo si el medio no tenía bioestimulante.

En los controles, sin bioestimulante, la mineralización de los tres HAPs fue lineal ( $r > 0.98$ ) durante todo el período experimental y se produjo de forma simultánea a una tasa de  $0.10 \pm 0.01 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  para fenantreno,  $0.0035 \pm 0.0003 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  para pireno, y  $0.0006 \pm 0.00005 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  para fluoranteno. Las curvas de mineralización en presencia del bioestimulante presentaron una forma de "S", esto evidenció una mayor respiración (consumo de los contaminantes químicos y producción de  $^{14}\text{CO}_2$ ) y por lo tanto un aumento de las tasas máximas de  $1.12 \pm 0.07 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (fenantreno),  $0.065 \pm 0.002 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (pireno), y  $0.027 \pm 0.01 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (fluoranteno). Estas velocidades se determinaron a partir de las pendientes máximas observadas en las curvas de mineralización (Figura IV.1).

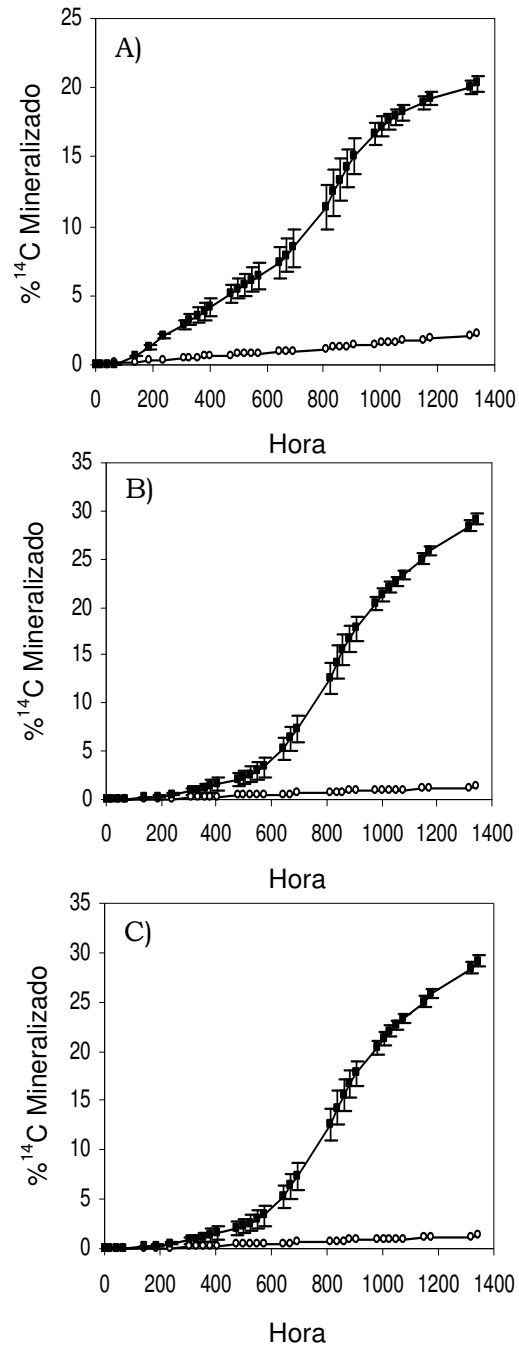


Figura IV. 1.- Efecto del bioestimulante oleofílico (S-200) sobre la mineralización de (A) fenantreno, (B) pireno, y (C) fluoranteno presente en fuel/HMN por *Mycobacterium gilvum* VM552. Los resultados de las tres gráficas se obtuvieron de experimentos llevados a cabo simultáneamente. Los símbolos representan el porcentaje de  $^{14}\text{C}$  mineralizado sin bioestimulante (○) y con bioestimulante (■). Las barras de error representan una desviación estándar de duplicados.

El análisis por GC-MS de las fracciones alifáticas y aromáticas procedentes del NAPL residual (fuel/HMN) de los matraces inoculados y controles abióticos confirmó que el bioestimulante oleofílico mejoró la biodegradación de todas las familias de hidrocarburos analizadas. Como se muestra en la Figura IV.2, la fracción de alifáticos de los controles abióticos mostró una distribución modal de los n-alcenos de n-C<sub>14</sub> a n-C<sub>35</sub>, con máximos en n-C<sub>24</sub> y n-C<sub>26</sub>, lo que es característico del fuel pesado utilizado. En los matraces inoculados, los alcanos totales (m/z 85) fueron degradados significativamente (60.6 ± 12.8%, P < 0.05) sólo cuando el bioestimulante oleofílico estaba presente. Se obtuvieron resultados similares cuando los porcentajes de degradación fueron calculados basados en las relaciones C<sub>17</sub>/pristano o C<sub>18</sub>/fitano (resultados no mostrados). Los hidrocarburos saturados de alto peso molecular (es decir, C<sub>24</sub>-C<sub>29</sub>) fueron más ampliamente degradados (64-67%) que compuestos más pequeños con mayor solubilidad en agua (C<sub>18</sub>-C<sub>20</sub>, degradados entre un 49 al 59%; C<sub>14</sub>-C<sub>17</sub>, no significativamente degradados). Estos resultados son significativos, ya que estudios anteriores sobre la biodegradación de fuel por bacterias han llevado a la suposición general de que los alcanos de cadena corta son generalmente biodegradados más rápidamente que los compuestos de cadena larga (Wang y col., 1998).

La biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus derivados alquilados alcanzó el 22% en ausencia de S-200, mientras que en presencia del bioestimulante aumentó hasta un 60%. Sólo fluoreno (43 ± 4.7%) y fenantreno (38 ± 15%) fueron degradados significativamente en ausencia de bioestimulante, mientras que los cultivos con bioestimulante presentaron una eliminación mayor a gran escala de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (el 84 ± 6.4% para fluoreno y el 99 ± 0.3% para el fenantreno), además de una degradación importante de antraceno (un 40 ± 12.9%), fluoranteno (del 68 ± 3.4%) y pireno (un 43 ± 4.7%) (Figura IV.3). Estos resultados mostraron una buena concordancia con los resultados de mineralización obtenidos en los ensayos con <sup>14</sup>C (Figura IV.1),

teniendo en cuenta que las determinaciones basadas en la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  son estimaciones mínimas del proceso de biodegradación (ya que no incluyen la incorporación a la biomasa y la producción de metabolitos). Como era de esperar, los HAP metilados más abundantes que sus derivados no-alquilados, fueron atacados en menor medida, mostrando solamente una degradación ligera pero significativa en presencia del bioestimulante. En efecto, el correspondiente fragmentograma (Figura IV.2) mostró una degradación selectiva de mono- y di-metil-naftalenos y mono-metil-fenantrenos, tras los patrones descritos en la literatura (Wang y col., 1998; Vila y Grifoll, 2009).

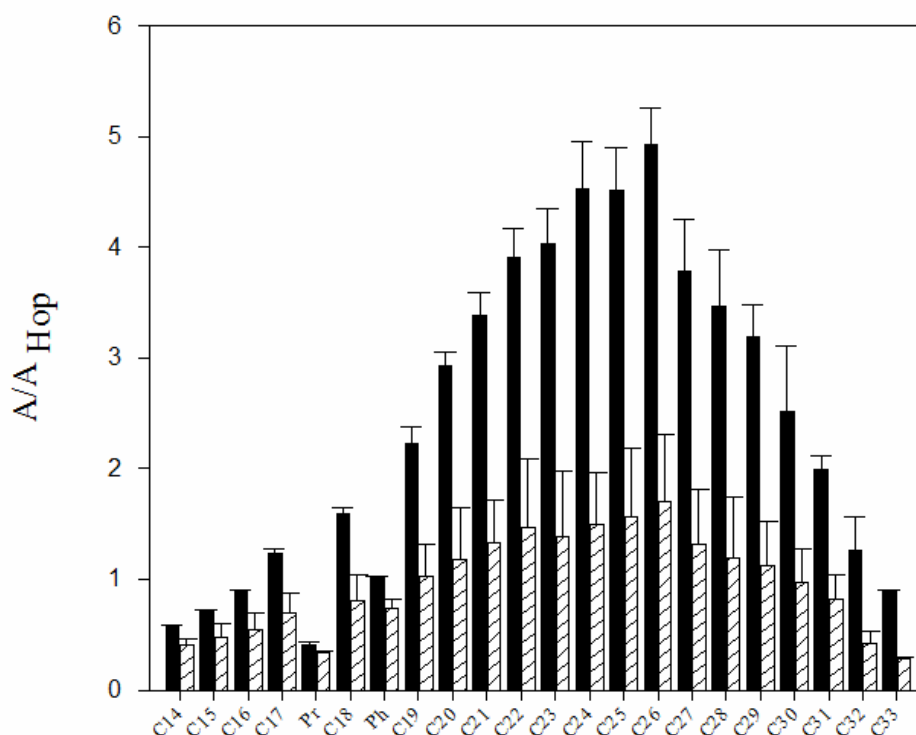


Figura IV. 2.- Áreas normalizadas con hopano ( $A/A_{\text{HOP}}$ ) de los n-alcenos ( $m/z$  85) detectados por el análisis GC-MS en el fuel/HMN residual de los controles abióticos (barras de color negro) y con cultivo de *Mycobacterium gilvum* VM552 (barras con rayas), con el bioestimulante. Los compuestos desde C<sub>18</sub> a C<sub>33</sub> fueron significativamente degradados ( $P < 0.05$ ). Los cultivos sin bioestimulante no mostraron una degradación de alcanos significativa en comparación con los controles. Pr, pristano, Ph, fitano, Cn, n-alcenos, n indica el número de átomos de carbono.

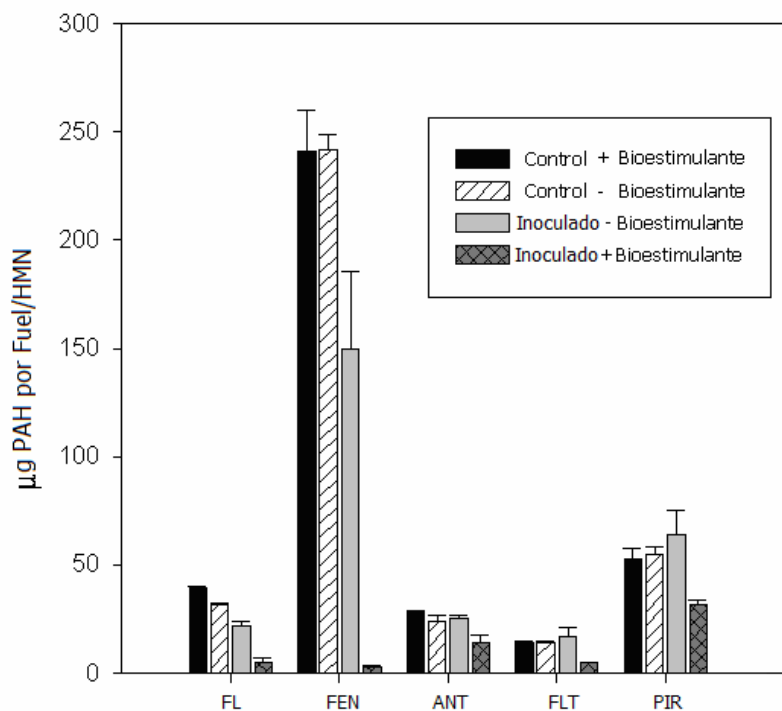


Figura IV. 3.- Concentraciones de HAPs recuperadas del NAPL de los controles y matraces inoculados, tanto con o sin bioestimulante S-200. Sólo se muestran los HAPs con la degradación significativa ( $P < 0.05$ ). Las barras muestran la relación entre el área del pico y la del hopano para cada tipo de muestra. FL, fluoreno; FEN, fenantreno; ANT, antraceno; FLT, fluoranteno y PIR, pireno.

El análisis por GC-MS de los extractos neutro y ácido de la fase acuosa con y sin bioestimulante presentó perfiles similares de acumulación de metabolitos. Sin embargo, la concentración en los matraces con bioestimulante fue alrededor de 10 veces mayor (los valores fueron de alrededor de una décima de varios microgramos por mililitro, es decir,  $120 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  para 1-indanona,  $140 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  para el ácido difénico,  $690 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  para el ácido 2-carboxicinámico y  $3.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  para el ácido 4-metilftálico, Figura IV.4). Los metabolitos neutros correspondieron a alquilos oxidados o naftalenos fenólicos, mientras que los compuestos ácidos fueron principalmente ácidos dicarboxílicos, generalmente acumulados durante la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus derivados de metilo por cepas de *Mycobacterium*. En concreto, el ácido ftálico es un producto intermedio común en la degradación de naftaleno, fenantreno,



fluoranteno y pireno, mientras que los ácidos carboxicinámico y difénico son metabolitos del naftaleno y fenantreno, respectivamente (Lopez y col., 2008). La presencia de metabolitos con los grupos metilo indica vías similares de biodegradación para los correspondientes HAPs alquilo (Vila y col., 2001; Lopez y col., 2008; Vila y Grifoll, 2009).

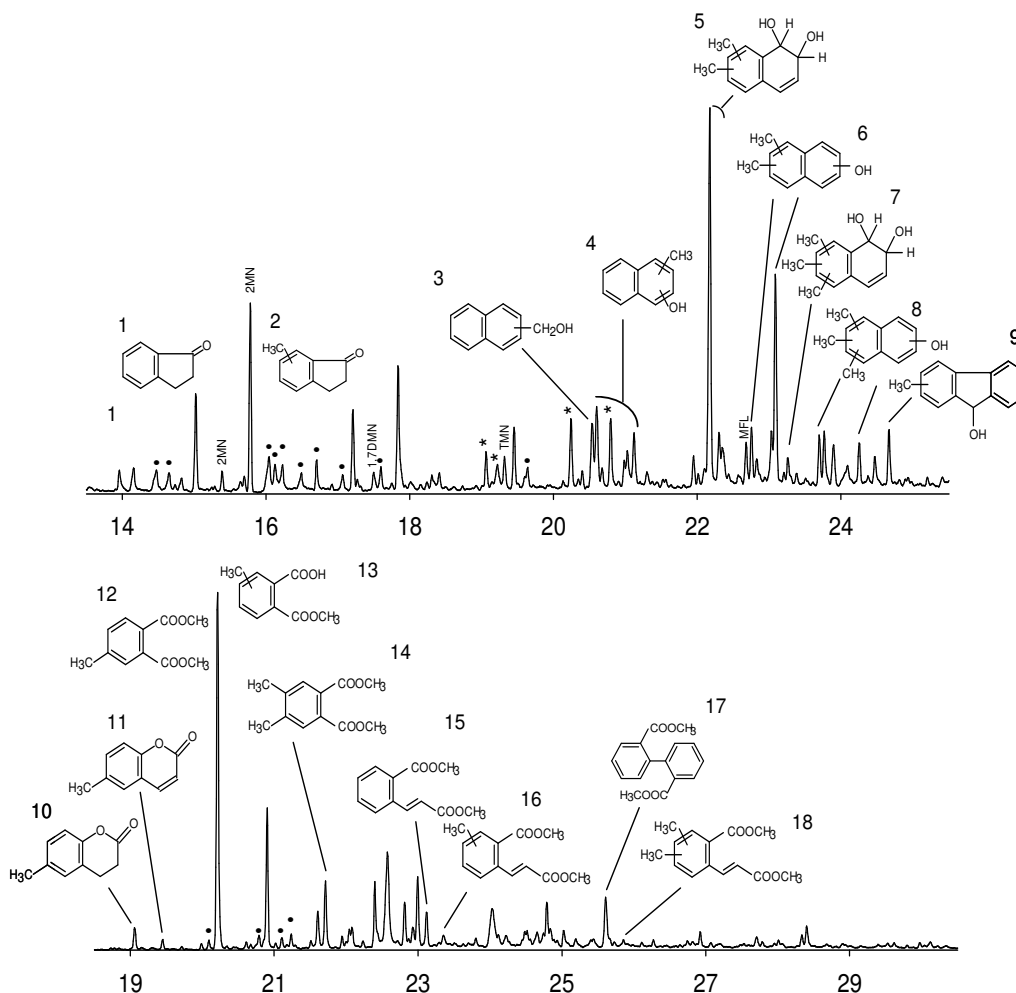


Figura IV. 4.- Cromatogramas típicos con GC-MS del extracto neutro (arriba) y del ácido (abajo) de las fases acuosas de los cultivos con *Mycobacterium gilvum* VM552 en la presencia de bioestimulantes con los picos identificados (ver Tabla IV. 1). Los metabolitos ácidos fueron identificados como los correspondientes a ésteres metílicos. (•) Ácidos monoaromáticos; (\*) lactonas del ácido hidroxí aromático; MN, metilnaftaleno; HMN, heptametilnonano; DMN, dimetilnaftaleno, TMN, trimetilnaftaleno; MFL, metilfluoreno. Para la identificación de los compuestos 1-18, ver tablas IV. 1 y 2.

Tabla IV. 1.- Tiempos de retención (Tr) y los iones fragmento del GC-MS para identificar los metabolitos detectados en los extractos neutros de los matraces con *Mycobacterium gilvum* VM552 con fuel, en presencia y ausencia de S-200.

N°	Tr	Ion Fragmento, m/z (%)	Identificación
1	15.0	132 (M <sup>+</sup> ,100), 104 (M <sup>+</sup> -CO, 86.1), 89 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -CO,4.2), 78 (30.9), 51 (17.06)	1-Indanona <sup>1</sup>
2	17.2	146 (M <sup>+</sup> , 94.42), 131 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> , 4.51),117 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> , 100),103 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> , 10.2),91 (22.09), 77 (9.11), 63 (8.86), 51 (8.18)	Metil 1-ndanona <sup>2</sup>
3	20.5	158 (M <sup>+</sup> , 56.17), 141 (M <sup>+</sup> -OH, 20.68), 129 (M <sup>+</sup> -CHO, 100), 115 (17.22), 102 (4.06), 98 (1.02)	Naftaleno metanol <sup>2</sup>
4	20.6	158 (M <sup>+</sup> ,100), 141 (M <sup>+</sup> -OH, 31.08), 129 (M <sup>+</sup> -CHO, 93.24), 115 (M <sup>+</sup> -CHO-CH <sub>2</sub> , 79.73), 105 (79.73), 91 (50), 77 (36.48)	Metil naftol <sup>2</sup>
	20.9	158 (M <sup>+</sup> , 87.83), 141 (M <sup>+</sup> -OH, 28.37), 129 (M <sup>+</sup> -CHO, 100), 115 (M <sup>+</sup> -CHO-CH <sub>2</sub> , 55.41), 104 (18.92), 91 (22.98), 77 (21.62)	
	21.1	158 (M <sup>+</sup> ,100), 141 (M <sup>+</sup> -OH, 4.05), 129 (M <sup>+</sup> -CHO, 32.43), 115 (M <sup>+</sup> -CHO-CH <sub>2</sub> , 18.92), 102 (4.05), 89 (2.70)	
5	22.2	190 (M <sup>+</sup> , 5.35), 172 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O, 100), 157 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> , 35.23), 143 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> , 32.57), 129 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> , 39.24), 115 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> , 26.05), 104 (2.85)	1,2-dihidroxi 1,2-dihidro dimetil naftaleno <sup>3</sup>
	22.3	190 (M <sup>+</sup> , 6.56), 172 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O, 100), 157 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> , 34.95), 143 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> , 30.16), 129 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> , 41.4), 115 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> , 25.48), 104 (4.09)	
	22.3	190 (M <sup>+</sup> , 19.6), 172 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O, 100), 157 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> , 15.69), 143 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> , 52.94), 129 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> , 26.47), 115 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> , 24.51), 105 (6.86), 91 (10.78), 77 (10.78)	
6	22.8	172, (M <sup>+</sup> ,100 ), 157 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> , 20.55), 143 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> , 9.82), 128 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> , 26.84), 115 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> , 12.74), 102 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> -CH, 1.99), 86 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> -CH-O, 4.46)	Dimetil naftol <sup>2</sup>
	22.8	172 (M <sup>+</sup> , 100), 157 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> ,39.1), 141 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -O, 12.57), 128 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -O-CH, 22.52), 115 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -O-CH-CH, 12.69), 103 (1.80), 91 (5.02)	
	23.0	172 (M <sup>+</sup> , 100), 157 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> , 18.43), 143 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> , 8.30), 128 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> , 25.37), 115 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> , 15.02), 102 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> -CH, 2.80), 86 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> -CH-O, 4.69)	
7	23.3	204 (M <sup>+</sup> , 7.30), 186 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O, 51.13), 171 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> , 100), 158 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> -CH, 15.77), 143 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> -CH-CH <sub>3</sub> , 13.30), 128 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> -CH-CH <sub>3</sub> , 23.87), 115 (17.09)	1,2-dihidroxi 1,2-dihidro trimetil naftaleno <sup>3</sup>
	24.1	204 (M <sup>+</sup> , 4.85), 186 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O, 100), 171 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> 57.28), 157 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> , 7.76), 141 (53.39), 128 (20.38), 115 (33.01)	

Tabla IV. 2.- Continuación de la tabla IV. 1.

<b>N°</b>	<b>Tr</b>	<b>Ion Fragmento, m/z (%)</b>	<b>Identificación</b>
8	23.7	186 (M <sup>+</sup> , 100), 168 (M <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O, 66.72), 157 (70.20), 143 (55.50), 128 (50.75), 115 (54.33)	Trimetilnaftol <sup>3</sup>
	24.2	186 (M <sup>+</sup> , 46.31), 171 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> , 100), 153 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O, 3.06), 141 (8.66), 128 (M <sup>+</sup> 12.77), 115 (9.66), 102 (1.83)	
9	24.7	196 (M <sup>+</sup> ,47.97), 181(M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> , 100), 165 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -O, 31.37), 152 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -O-CH, 25.91)	Metil fluorenol <sup>3</sup>
10	19.1	162 (M <sup>+</sup> , 100), 147 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> , 3.9), 134 (M <sup>+</sup> -CO, 57.7), 119 (31.6), 105 (12.6), 91 (62.9)	2H-1-Benzopira-2-ona,3,4-dihidro-6-metil <sup>2</sup>
11	19.5	160 (M <sup>+</sup> , 100), 132 (M <sup>+</sup> -CO, 69.4), 131 (M <sup>+</sup> -CO-H, 71.0), 104 (21.3), 77 (18.0)	2H-1-Benzopira-2-ona,6-metil <sup>2</sup>
12	20.2	208 (M <sup>+</sup> , 13.7), 177 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> , 100), 149 (M <sup>+</sup> -COOCH <sub>3</sub> , 5.7), 118 (2.8), 91 (11.5)	DME ácido 4-metil-ftálico <sup>1</sup>
13	20.9	194 (M <sup>+</sup> , 31.1), 162 (M <sup>+</sup> -OCH <sub>3</sub> -H, 100), 134 (M <sup>+</sup> -OCH <sub>3</sub> -HCO, 77.7), 105 (12.6), 91 (60.2)	ME metal ftálico <sup>3</sup>
14	21.7	222 (M <sup>+</sup> , 13.5), 191 (M <sup>+</sup> -OCH <sub>3</sub> , 100), 163 (M <sup>+</sup> -COOCH <sub>3</sub> , 4.9), 148 (1.5), 132 (1.9), 120 (1.2), 105 (5.8), 91 (2.7), 77 (4.9)	DME ácido 4,5-dimetil ftálico <sup>2</sup>
15	23.1	220 (M <sup>+</sup> , 3.6), 189 (M <sup>+</sup> -O CH <sub>3</sub> , 10.6), 173 (14.5), 161 (M <sup>+</sup> -COOCH <sub>3</sub> , 100), 145 (7.6), 130 (6.7), 118 (11.0), 115 (6.17), 102 (7.8), 91 (5.7)	DME ácido 2-carboxicinámico <sup>1</sup>
16	23.4	234 (M <sup>+</sup> , 6.8), 220 (M <sup>+</sup> - CH <sub>3</sub> , 4.9), 203 (M <sup>+</sup> -OCH <sub>3</sub> , 3.9), 189 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> -OCH <sub>3</sub> , 10.7), 175 (M <sup>+</sup> -COOCH <sub>3</sub> , 100), 161 (M <sup>+</sup> -CH <sub>2</sub> -COOCH <sub>3</sub> , 32.0), 145 (30.6), 131 (14.6), 118 (8.7), 115 (16.5), 105 (6.8), 91 (16.5)	DME ácido metil carboxicinámico <sup>3</sup>
17	25.6	270 (M <sup>+</sup> , 2.7), 239 (M <sup>+</sup> -O CH <sub>3</sub> , 3.8), 211 (M <sup>+</sup> -COOCH <sub>3</sub> , 100), 196 (M <sup>+</sup> -COO CH <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> , 13.4), 180 (M <sup>+</sup> -COOCH-OCH <sub>3</sub> , 13.3), 168 (6.5), 152 (12.4), 139 (10.1)	DME ácido difénico <sup>1</sup>
18	26.1	248 (M <sup>+</sup> , 7.7), 234 (M <sup>+</sup> -CH <sub>3</sub> , 10.2), 217 (M <sup>+</sup> -OCH <sub>3</sub> , 20.7), 189 (M <sup>+</sup> -COOCH <sub>3</sub> , 100), 174 (M <sup>+</sup> -CH <sub>2</sub> -COOCH <sub>3</sub> , 26.0), 161 (M <sup>+</sup> -CH-COOCH <sub>3</sub> , 7.0), 145 (26.6), 131 (13.1), 115 (42.5), 105 (9.4), 91 (22.5)	DME ácido dimetil carboxicinámico <sup>3</sup>

La identificación se basó en análisis de estándares auténticos<sup>1</sup>, en el uso de patrones de fragmentación con parecidos superiores al 90% con la librería NIST<sup>2</sup>, o se dedujo de acuerdo al patrón de fragmentación y mediante datos de la literatura<sup>3</sup>.

<sup>a</sup>ME es metil éster, y DME es dimetil éster.

### IV.1.3. Estudio del reparto del fenantreno desde los NAPLs

La transferencia de masa del fenantreno, tomado como HAP modelo, desde el NAPL a la fase acuosa se midió para determinar si el aumento de mineralización causado por el bioestimulante podría explicarse por un aumento del reparto entre ambas fases. Sin embargo, el reparto de fenantreno, elegido como representante de los HAPs del fuel en el NAPL, no se modificó sustancialmente en presencia del bioestimulante (Figura IV.5).

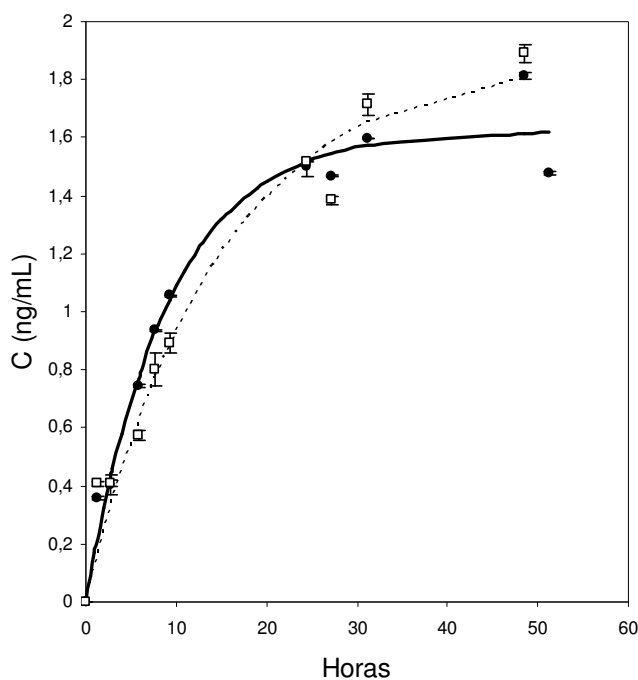


Figura IV. 5.- Reparto de fenantreno desde el fuel/HMN en presencia y ausencia del bioestimulante oleofílico S-200. Los símbolos representan las concentraciones de fenantreno en la fase acuosa sin bioestimulante (●) y con bioestimulante (□). Las líneas continua y discontinua representan, respectivamente, al ajuste experimental de la ecuación 3 (III.6.2) sin y con bioestimulante. Las barras de error indican una desviación estándar de los duplicados.

Las tasas de reparto y las concentraciones en el equilibrio en fase acuosa se muestran en la Tabla IV. 3. Las tasas para los procesos abióticos se compararon con las tasas

máximas de mineralización. En ausencia de bioestimulante, la tasa de mineralización del fenantreno inicialmente presente en el fuel/HMN no fue significativamente diferente de la que se midió para la tasa de reparto. Esto confirma la consistencia entre las mediciones por HPLC y  $^{14}\text{C}$  en el sistema experimental utilizado. Sin embargo, cuando el bioestimulante estaba presente, la tasa de mineralización máxima fue superior a la tasa de reparto obtenida.

Tabla IV. 3.- Efecto del bioestimulante oleofílico S-200 sobre el reparto y mineralización de fenantreno inicialmente presente en NAPL con fuel.

NAPL	S-200	Reparto		Mineralización		
		$C_{eq}$ ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Tasa ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	Tasa ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	Final (%)	Días <sup>b</sup>
Fuel/HMN	-	1.62 ± 0.006a	0.18 ± 0.002Aa	0.11 ± 0.012Aa	12.64 ± 0.16a	58
	+	1.86 ± 0.047a	0.13 ± 0.007Aa	1.13 ± 0.07Bb	42.5 ± 1.96b	58
	- <sup>c</sup>	26.60 ± 9.41 <sup>d</sup> a	0.70 ± 0.18Aa <sup>e</sup>	0.14 ± 0.001Ba	8.12 ± 0.54a	35
	+ <sup>c</sup>	33.83 ± 1.69 <sup>d</sup> a	0.77 ± 0.31Aa <sup>e</sup>	1.67 ± 0.091Bb	32.57 ± 0.94b	35
Fuel/DEHP	-	2.30 ± 0.34a	0.30 ± 0.12Aa	0.07 ± 0.002Ba	2.96 ± 1.02a	35
	+	3.82 ± 0.38 <sup>d</sup> a	0.17 ± 0.04Aa <sup>e</sup>	0.29 ± 0.18Ba	5.54 ± 2.89a	35

<sup>a</sup>Los valores mostrados son la media ± una desviación estándar. Los valores en una línea seguidos con la misma letra mayúscula no son significativamente diferentes ( $P = 0.05$ ). Para cada NAPL, los valores en una columna seguidos por la misma letra minúscula no son significativamente diferentes ( $P = 0.05$ ). Los análisis estadísticos de los datos de reparto se realizaron separadamente mediante tratamientos con y sin Brij 35.

<sup>b</sup>Período de tiempo empleado para las medidas de los experimentos de mineralización.

<sup>c</sup>Tratamientos con Brij 35.

<sup>d</sup>Último valor experimental porque no se alcanzó el equilibrio durante el experimento.

<sup>e</sup>Valores calculados mediante regresión lineal con los 10 primeros puntos (las primeras 24 h).

Una situación similar se observó cuando añadimos el tensioactivo Brij 35 para aumentar el reparto de fenantreno desde el NAPL (fuel/HMN) hacia la fase acuosa (Tabla IV. 3). En estas condiciones, el bioestimulante oleofilico no tuvo, de nuevo, efecto significativo sobre las tasas de reparto, pero la mineralización de fenantreno se mejoró en su presencia, siguiendo una gráfica en forma de “S” (Figura IV.6) y produciéndose tasas máximas de mineralización superiores a las previstas por reparto abiótico. En ausencia de bioestimulante, la mineralización también fue lineal, pero obteniendo significativamente tasas menores que las tasas de reparto (Tabla IV. 3), lo que sugiere que el reparto excedió el potencial catabólico de los microorganismos.

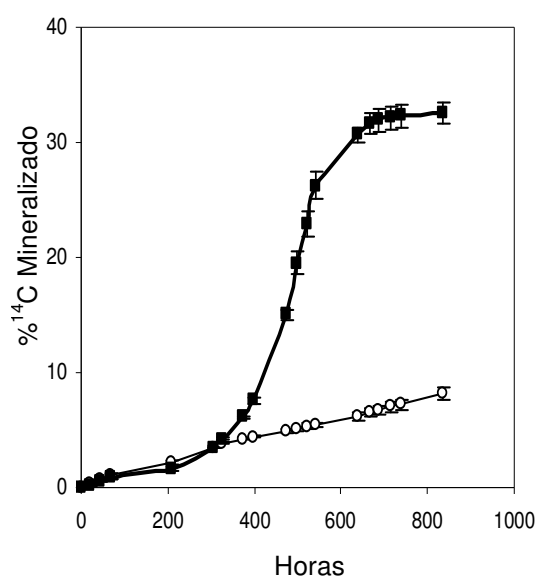


Figura IV. 6.- Efecto del bioestimulante oleofilico (S-200) sobre la mineralización del fenantreno presente en el NAPL (fuel/HMN) por *Mycobacterium gilvum* VM552 en presencia del tensioactivo Brij 35. Los símbolos representan el % de <sup>14</sup>C-fenantreno mineralizado sin bioestimulante (○) y con bioestimulante (■). Las barras de error representan una desviación estándar de los duplicados.

El efecto estimulador del S-200 sobre la mineralización de fenantreno se observó también cuando el HMN fue sustituido por DEHP como medio para fluidizar el NAPL (Tabla IV. 3). La tasa de mineralización fue, en presencia del

bioestimulante, inferior a la observada con la mezcla de HMN, pero aún fue el doble de las predicciones de la tasa de reparto.

También se realizaron experimentos de mineralización y de reparto con fenantreno disuelto en NAPLs puros (constituidos por un solo componente), con el fin de discriminar los posibles efectos causados por la biodegradabilidad de los NAPLs. Por lo tanto, se determinó la mineralización del fenantreno inicialmente disuelto en un NAPL que podría ser utilizado como fuente de carbono y energía (hexadecano o HD) y dos NAPLs que no fueron degradados por la cepa bacteriana utilizada (HMN y dietilhexilftalato, DEHP). En estas condiciones, las tasas de reparto y las concentraciones en equilibrio medidas en ausencia de bacterias aumentó en el ensayo con HMN y con DEHP, pero no con HD (Tabla IV. 4). La razón exacta de estas diferencias es desconocida, pero puede estar relacionada con el alto valor del  $\log K_{ow}$  del HD en comparación con los valores de  $\log K_{ow}$  del HMN y DEHP. No obstante, con independencia del NAPL usado, las curvas de mineralización del fenantreno tuvieron forma de “S” (Figura IV.7).

En el inicio de la mineralización del fenantreno presente en HD, se observaron dos fases diferentes. El aumento por el bioestimulante oleofílico fue evidente sólo en la fase inicial de mineralización (hasta 234 h) (Figura IV.7.A), alcanzando la mineralización su valor máximo. La tasa siguiente (hasta 404 h) no fue estadísticamente diferente con y sin la presencia del bioestimulante. En esta gráfica se presentó un período de latencia de 150 horas y un tiempo de duplicación de 71.7 h ( $\mu_{max} = 0.009 \text{ h}^{-1}$ ) en experimentos de crecimiento por separado con HD, posiblemente debido a que la proliferación en HD ocurrió durante la fase de mineralización máxima de fenantreno.

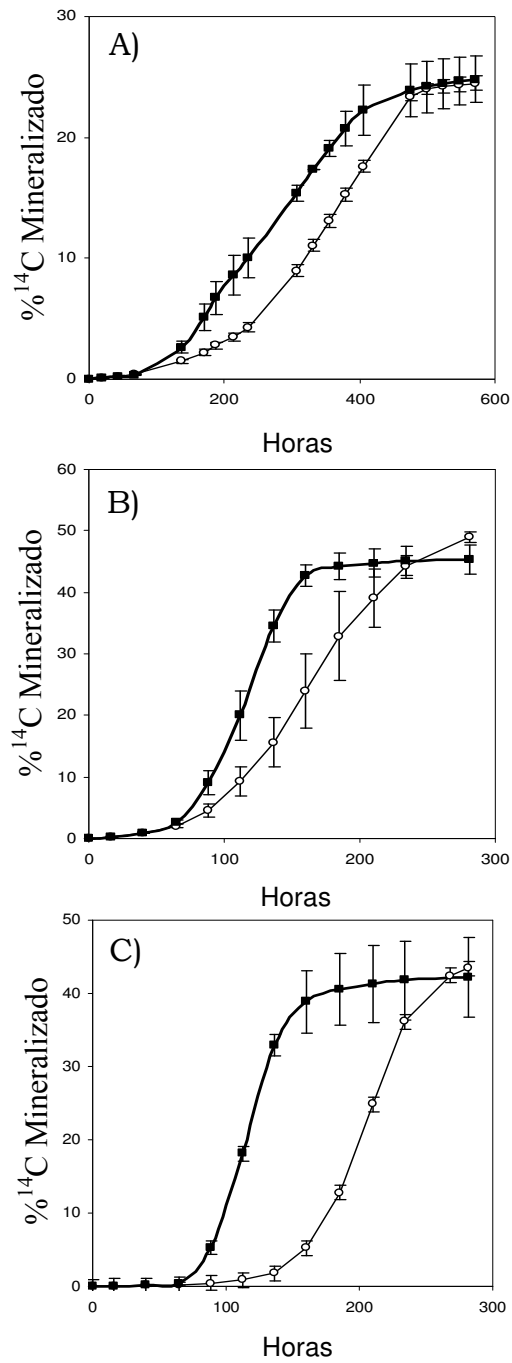


Figura IV. 7.- Efecto del bioestimulante oleofílico (S-200) sobre la mineralización de fenantreno presente en hexadecano (A), heptametilnonano (B) y en ftalato de di-2-etilhexil (C) por *Mycobacterium gilvum* VM552. Los símbolos representan % $^{14}\text{C}$  mineralizados sin bioestimulante (○) y con bioestimulante (■). Las barras de error representan una desviación estándar de los duplicados.



Cuando el fenantreno se suministró en forma de cristales y en las mismas condiciones de crecimiento, *M. gilvum* no mostró fase de latencia y el tiempo de duplicación fue de 22.7 h ( $\mu_{\max} = 0.03 \text{ h}^{-1}$ ). El crecimiento exponencial observado en estos experimentos de crecimiento excluye cualquier limitación nutricional en las condiciones experimentales utilizadas. La mineralización se mejoró también en presencia del bioestimulante oleofílico en los ensayos con fenantreno en HMN y DEHP, pero las diferencias en las tasas se mantuvieron durante toda la fase de mineralización máxima (Tabla IV. 4). En todos los casos, las tasas de mineralización fueron superiores a las tasas de reparto.

Todos estos resultados de reparto concordaron con los resultados obtenidos mediante ensayos con polidimetilsiloxano para profundizar en el comportamiento físico-químico del fenantreno en presencia y ausencia del bioestimulante oleofílico. Mediante estos ensayos se obtuvieron resultados de difusión donde  $\frac{a_{\text{medioconS-200}}}{a_{\text{medioacuoso}}}$  no fue superior a 1, indicando ningún efecto de transferencia de masa por difusión del fenantreno en presencia del fertilizante oleofílico, S-200 y su concordancia con los datos obtenidos de la ausencia de un efecto sobre el reparto.

Tabla IV. 4.- Efecto del bioestimulante oleofílico S-200 en el reparto y mineralización de fenantreno inicialmente presente en NAPLs puros.

NAPL	S-200	Reparto		Mineralización		Días <sup>b</sup>
		C <sub>eq</sub> (ng·mL <sup>-1</sup> )	Tasa (ng·mL <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	Tasa (ng·mL <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	Final (%)	
HD	-	43.84 ± 19.50a	1.73 ± 0.19Aa	4.10 ± 0.30Ba <sup>c</sup> 10.00 ± 4.00Bb <sup>c</sup>	24.48 ± 0.56a	24
	+	49.21 ± 4.39a	2.00 ± 0.64Aa	10.52 ± 1.57Bb	24.78 ± 1.57a	24
HMN	-	42.88 ± 8.53 <sup>d</sup> a	2.43 ± 0.16Aa <sup>f</sup>	38.28 ± 9.78Ba	48.96 ± 0.88a	12
	+	64.74 ± 5.84b	5.64 ± 0.95Ab	62.93 ± 2.03Bb	45.40 ± 2.37a	12
DEHP	-	12.59 ± 3.63a	0.57 ± 0.003Aa	52.48 ± 0.89Ba	43.43 ± 2.36a	12
	+	25.01 ± 0.22 <sup>d</sup> b	2.02 ± 1.03Ab <sup>f</sup>	62.25 ± 6.18Bb	42.19 ± 5.46a	12

<sup>a</sup>Los valores mostrados son la media ± una desviación estándar. Los valores en una línea seguidos con la misma letra mayúscula no son significativamente diferentes ( $P = 0.05$ ). Para cada NAPL, los valores en una columna seguidos por la misma letra minúscula no son significativamente diferentes ( $P = 0.05$ ).

<sup>b</sup>Periodo de tiempo empleado para las medidas de los experimentos de mineralización.

<sup>c</sup>Tasas calculadas por regresión lineal con los 5 primeros puntos ( $r > 0.99$ ) durante la primera fase (entre las 136 y 234 horas) y la segunda fase (de 307 a 404 horas) de mineralización, como aparece en la Figura IV.7.A.

<sup>d</sup>Último valor experimental porque no se alcanzó el equilibrio durante el experimento.

<sup>e</sup>Valores calculados mediante regresión lineal con los 10 primeros puntos (las primeras 24 h).

#### **IV.1.4. Efecto de las condiciones de agitación y de los nutrientes en la biodegradación**

También se estudiaron los efectos de la agitación y de los componentes individuales del fertilizante oleofílico sobre la biodegradación. La mineralización de fenantreno presente en el fuel/HMN se midió en matraces agitados con el NAPL libremente suspendido en el medio acuoso y, por tanto, la interfase NAPL y medio acuoso no se mantuvo constante. Aunque las tasas de reparto no se midieron en estas condiciones, de acuerdo con investigaciones previas (Carroquino y Alexander, 1998), se esperaba un aumento como resultado de una mayor superficie interfacial y mejor mezcla. El efecto promotor del bioestimulante oleofílico fue menos evidente en estas condiciones (Figura IV.8). De hecho, la mineralización en ausencia de bioestimulante fue todavía lineal ( $r = 0.98$ ) y ocurrió a una tasa de  $0.31 \pm 0.04 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , que fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que la detectada con el área interfacial constante,  $0.11 \pm 0.01 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (Tabla IV. 3). La adición del bioestimulante también indujo un cambio en la curva de mineralización de forma "S" (Figura IV.8.A) y un aumento en la tasa de mineralización ( $0.66 \pm 0.04 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), pero esta tasa fue significativamente menor ( $P < 0.05$ ) que la observada con el área interfásica constante ( $1.13 \pm 0.07 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ).

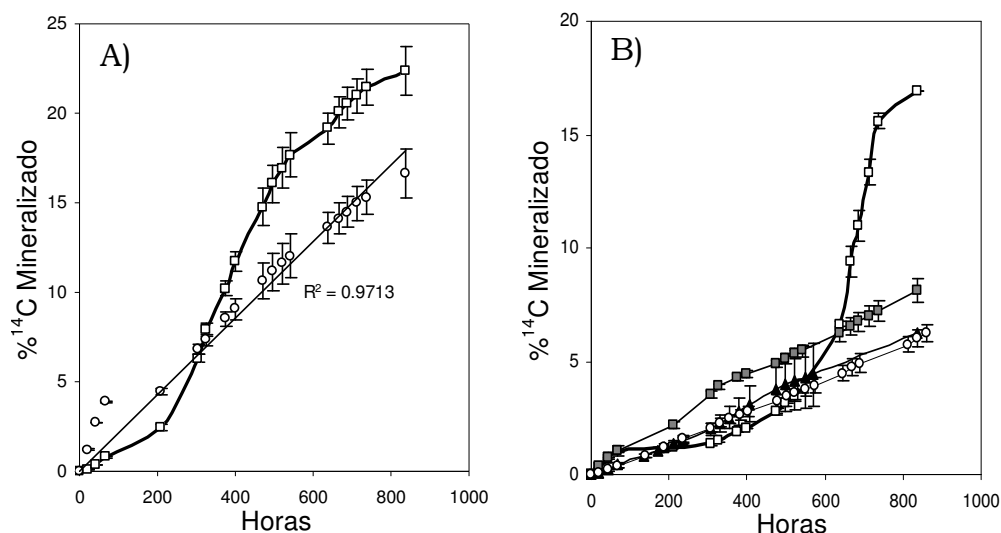


Figura IV. 8.- A) Efecto del bioestimulante oleofílico (S-200) sobre la mineralización del fenantreno presente en fuel/HMN libremente suspendidas en el agua (sin cilindros). Los símbolos representan %<sup>14</sup>C mineralizado sin bioestimulante (o) y con bioestimulante (□). La línea continua representa el ajuste lineal a los datos sin bioestimulante. B) Mineralización del fenantreno presente en fuel/HMN con el área interfacial constante (con cilindros) en el control sin añadir ningún nutriente (o), con urea y Brij 35 (□), con Brij 35 (■) y con urea (▲). En ambas gráficas, las barras de error representan una desviación estándar de los duplicados.

## IV.2. RIZOSFERA Y EXUDADOS DE RAÍZ

### IV.2.1. Caracterización de los exudados de raíz

Se eligieron dos variedades de césped para la producción de exudados debido a que las gramíneas destacan por tener unas raíces muy fasciculadas, característica muy importante a la hora de elegir una planta para su uso en fitorremediación. Un sistema de raíces fasciculadas proporciona una mayor superficie de colonización del suelo y, en consecuencia, un mayor contacto con los microorganismos del mismo, estimulando así la actividad microbiana. Según Aprill y Sims (1990), el sistema radicular de algunas gramíneas puede alcanzar una zona de influencia de unos 3

metros de profundidad. Las gramíneas utilizadas fueron *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea* por su conocido efecto fitorremediador de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Germida y col., 2002; Huang y col., 2004; Parrish y col., 2005; Olson y col., 2007). También se seleccionó otra especie distinta a las gramíneas, *Helianthus annuus*, girasol, por su acción fitorremediadora tanto de metales pesados (Kim y col., 2010) como de HAPs (Chaineau y col., 1997; Maliszewska-Kordybach y Smreczak, 2000; Kummerova y col., 2001; Olson y col., 2007). Como ya se indicó en la introducción, se eligió esta especie pensando además en su aprovechamiento para la producción de biocombustible después de realizar su función fitorremediadora, dentro de un esquema de recuperación sostenible.

En el primer ensayo para la producción *in vitro* de exudados de raíces de *Lolium* y *Festuca*, utilizando tubos de ensayo como contenedores, se obtuvo un desarrollo adecuado de la planta transcurridos 45 días desde su inicio (ver Figura IV.9).

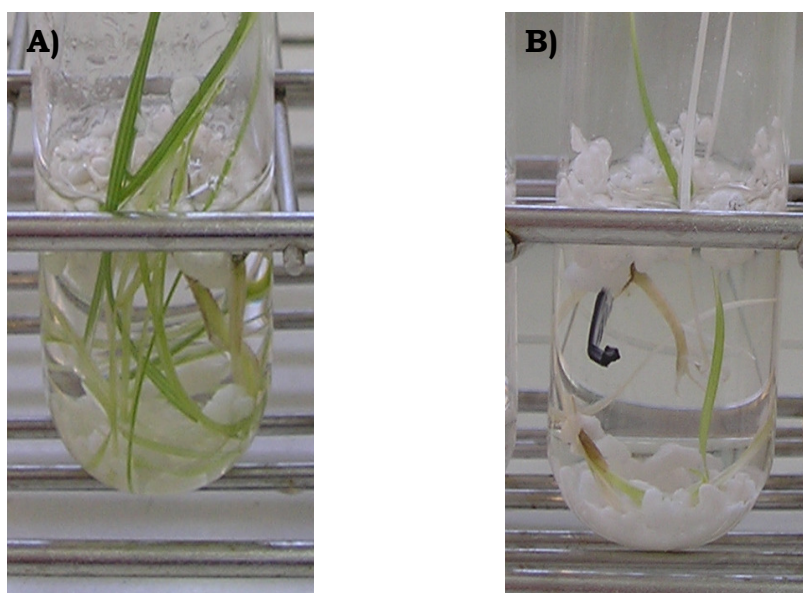


Figura IV. 9.- a) Sistema radicular de *Festuca* y b) de *Lolium*.

Los pesos frescos de las raíces y los resultados obtenidos de los análisis de carbono inorgánico y carbono

orgánico total de los exudados de este primer ensayo, se presentan en la Tabla IV. 5.

Tabla IV. 5.- Análisis de los exudados producidos en el primer ensayo de producción *in vitro*.

<b>Medio-Planta</b>	<b>Peso fresco raíz (mg)</b>	<b>Carbono inorgánico (mg·L<sup>-1</sup>)</b>	<b>COT (mg·L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Carbono total (mg·L<sup>-1</sup>)</b>
SW-Lolium	5.4	17.5	29.4	46.9
VD-Lolium	7.9	8.7	41.7	50.4
SW-Festuca	9.3	15.6	55.4	71
VD-Festuca	8.4	9.1	68.9	78

Los exudados recogidos en la rizosfera de *Festuca* produjeron unas concentraciones de carbono orgánico total (COT) de 55.4 y 68.9 mg·L<sup>-1</sup> respectivamente para los medios SW y VD, estos niveles de COT fueron superiores a los producidos por *Lolium* con 29.4 y 41.7 mg·L<sup>-1</sup> para cada medio respectivamente. Con independencia de la especie utilizada, como se indica en la tabla, las raíces cultivadas en medio VD dieron lugar a unos valores mayores de COT que las cultivadas en medio SW. Por otro lado, existió una correlación directa, aunque no significativa, ( $r=0.7927$ ) entre el peso fresco de la raíz y los valores de COT. En cualquier caso los niveles obtenidos de COT fueron muy próximos a los ya publicados según las referencias bibliográficas existentes como Yoshitomi y Shann (2001), que utilizaron exudados de diferentes plantas con un COT entre 5-90 mg de C·L<sup>-1</sup> o Rentz y col., (2005) que también usaron exudados con una concentración de COT entre 50-70 mg de C·L<sup>-1</sup>, ambos estudios emplearon estos exudados para mejorar la biodegradación de HAPs.

A pesar del buen desarrollo de las plantas en este sistema de producción *in vitro*, se diseñó otro sistema de obtención de exudados a mayor escala (Apartado III.7.1) y con

el que se aseguró que la procedencia del COT obtenido fuera exclusivamente de las raíces. Con este segundo sistema de obtención *in vitro* de exudados y en medio MM, se consiguió un buen desarrollo del sistema radicular (Figura IV.10).

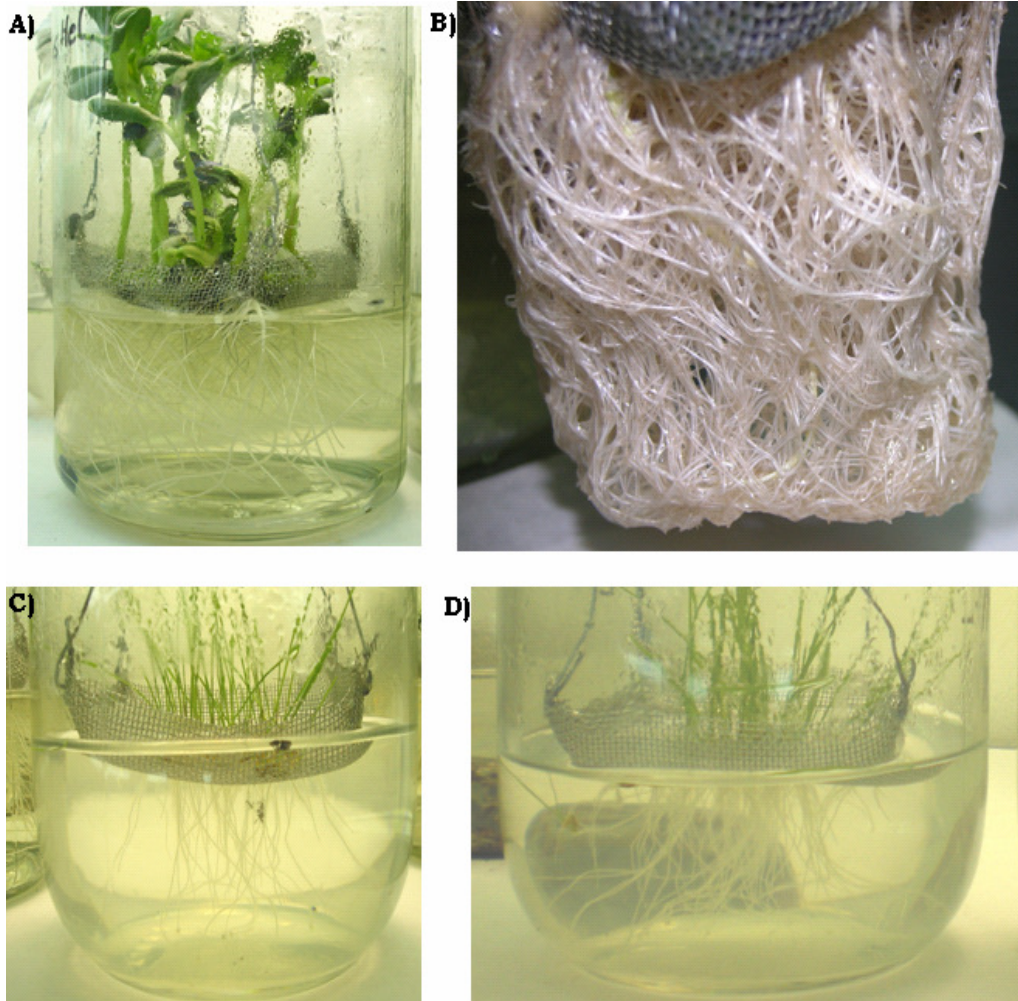


Figura IV. 10.- A) Plantas de girasol obtenidas de la germinación de semillas para la obtención de exudados en MM. B, C y D) Detalle de la calidad del sistema radicular en el medio de cultivo MM, B) girasol, C) *Lolium* y D) *Festuca* durante un mes de cultivo *in vitro*.

Finalmente se utilizó MM para que la planta excretase los exudados en el medio habitual utilizado en estudios de radiorespirometría con bacterias, y así estudiar la influencia de estas sustancias en dicho proceso. Los resultados del análisis del COT fueron los siguientes:  $10.07 \pm 4.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para *Lolium*,  $17.87 \pm 0.35 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para *Festuca* y  $71.73 \pm 7.18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para girasol. El peso fresco del sistema radicular de girasol (10 g) fue el más alto comparado con los 0.21 g de *Lolium* y los 0.05 g de *Festuca*.

Dada la mayor concentración de COT en los exudados producidos por la raíz de girasol y su mejor crecimiento *in vitro*, se utilizó esta planta en los ensayos posteriores. Después de un periodo de incubación de 30 días en los sistemas descritos en el apartado de materiales y métodos III.7.1, Figura III.5, se obtuvo una germinación media para los diferentes cultivos de girasol realizados del 49%, con un crecimiento RGR de 70 mg/día. Los pesos fresco y seco de las raíces fueron 10.39 y 0.88 g respectivamente, los niveles de COT producidos por los exudados estuvieron entre 54.4 y 339  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  con una media de 145.28  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Existió una correlación lineal directa y significativa entre RGR y el peso fresco de la raíz ( $r=0.9125$ , para  $P \leq 0.05$ ). También se encontró una correlación lineal directa entre COT y tasa de crecimiento relativo (RGR,  $r=0.7293$ ) y entre COT y peso fresco de la raíz ( $r=0.6031$ ).

Se realizaron análisis de la composición química de los exudados obtenidos, tras los 30 días de incubación, mediante la colaboración de la Dra. Magdalena Grifoll y su grupo de investigación. Los resultados se muestran en la **Tabla 6**.



**Tabla IV. 6.-** Compuestos detectados en la composición química de exudados de raíz de girasol, tras 30 días de cultivo *in vitro* en medio MM líquido.

<b>Grupo</b>	<b>Compuestos</b>
Carbohidratos	Fructosa y Glucosa
Aminoácidos y derivados	Taurina, Fenil-serina, Fosfoetanolamina, Ácido Aspártico, Treonina, Serina, Asparagina, Glutamina, Glicina, Alanina, Cisteína, Isoleucina, Leucina, Tirosina, Fenilalanina, Ornitina, Lisina, Histidina, Arginina
Ácidos grasos	Ácido palmítico y Ácido esteárico
Ácidos orgánicos aromáticos	Ácido ftálico y Ácido protocatéquico

Identificación basada en el análisis de estándares auténticos.

Dentro del grupo de los carbohidratos perteneciente a la composición química de los exudados se detectaron principalmente fructosa y glucosa. Dentro de los aminoácidos esenciales se detectaron: treonina, asparagina y glutamina con grupos R polares (sin carga), lisina, arginina e histidina con grupos R cargados positivamente (a pH=7, poseen carga positiva neta), isoleucina y leucina con grupos R no polares (aparecen en forma ionizadas entre pH=6 a 7) y por último, ornitina (intermedio de la síntesis de la arginina). Pertenecientes a los no esenciales se encontraron glutamina, tirosina, serina, glicina y cisteína. Dentro de los aminoácidos aromáticos se determinó fenilalanina. También se hallaron aminoácidos como la taurina que es un derivado de la cisteína y serina. Es de destacar que dentro de los considerados esenciales no se hallaron metionina ni valina. Los ácidos grasos representativos de los exudados de girasol fueron el palmítico y esteárico, mientras que de los ácidos orgánicos analizados se hallaron el ácido ftálico y el protocatéquico.

Se determinó la tensión superficial de los exudados a 25°C mediante un tensiómetro de anillo de platino (TD1 Lauda, Hucha-Erlös) (Laha y Luthy, 1992; Garcia-Junco y col., 2003). El valor obtenido fue muy próximo al del medio MM ( $62 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ), lo cual indicó ausencia de actividad tensioactiva en los exudados.

### IV.2.2. Influencia de la rizosfera de girasol sobre la eliminación de HAPs procedentes de un suelo contaminado con creosota

Como se ha dicho anteriormente, los resultados obtenidos en las experiencias de producción de exudados condujeron a un estudio más en profundidad con las plantas de girasol. La influencia de la rizosfera sobre la desaparición de los HAPs se estudió mediante un experimento en invernadero, utilizando suelo contaminado con creosota y macetas plantadas con girasol (apartado III.7.3). El muestreo para análisis de los HAPs residuales se realizó tras 45 y 90 días del inicio del experimento. La Tabla IV. 6 contiene los resultados obtenidos para el crecimiento de girasol tras los 90 días de duración de la prueba. Se observa en esta prueba que a los 15 días de iniciado el experimento, todas las semillas de girasol habían germinado tanto en suelo contaminado como en no contaminado. Sin embargo, las plantas desarrolladas en suelo contaminado fueron significativamente más altas ( $P \leq 0.05$ ) que las crecidas en suelo no contaminado. En consecuencia, el peso seco de la planta completa desarrollada en el suelo contaminado fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) en relación al obtenido en suelo no contaminado debido al mayor peso seco del tallo. En la Figura IV.11 se puede apreciar el buen desarrollo del sistema radicular en el suelo contaminado donde las raíces abarcan la totalidad de la maceta.

Tabla IV. 7.- Evolución del desarrollo de las plantas de girasol en suelo contaminado con creosota (mezcla 1:1) y suelo control (no contaminado) a los 90 días

Suelo	Germinación	LT <sup>a</sup> (cm)	Peso fresco (g)			Peso seco (g)		
			Tallo	Raíz	PC <sup>a</sup>	Tallo	Raíz	PC <sup>a</sup>
Contaminado	100A	67.00B	18.03A	4.99A	23.02A	4.96A	1.56A	6.51B
Control	100A	57.92A	17.20A	2.90A	20.1A	3.83A	0.63A	4.46A

<sup>a</sup>LT es la longitud del tallo y PC es la planta completa.

<sup>b</sup>Letras mayúsculas diferentes en columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ).



Figura IV. 11.- Desarrollo del sistema radicular del girasol en una maceta con suelo contaminado.

El nivel total de HAP disminuyó en un 89 y un 93.1% en 45 y 90 días respectivamente en presencia de girasol, existiendo una mejora del 17.3 y 16% para cada período con respecto al suelo contaminado sin planta (Ver Tabla IV. 7).

Entre los HAPs analizados destaca la desaparición de fluoreno del que a los 45 días se detectaron  $0.18 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , sólo un 14.6% del nivel inicial, mientras que en presencia de las raíces de girasol el porcentaje detectado en ese mismo período fue de  $0.04 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (3.25% del inicial). Transcurridos 90 días no se detectó presencia de fluoreno en ninguna de las pruebas ensayadas.

En las comparaciones efectuadas entre los niveles de concentración residual de los HAPs estudiados (Tabla IV. 7), se observa un comportamiento similar para 4 de los HAPs analizados (antraceno, fluoranteno, pireno y criseno), de tal forma que existe un descenso significativo ( $P \leq 0.05$ ) de estos compuestos en presencia de los microorganismos autóctonos para el control a los 45 días. Este descenso no se ve aumentado significativamente a los 90 días. Sin embargo, la participación de las raíces de girasol produce una mayor

desaparición de estos 4 HAPs de manera estadísticamente significativa a los 45 días respecto al control. A los 90 días en presencia de la rizosfera de girasol, también se aprecia una disminución de estos 4 HAPs con respecto al control aunque las concentraciones residuales obtenidas a los 45 días no se diferencian estadísticamente de las concentraciones residuales a los 90 días en presencia de girasol.

Tabla IV.7.- Efecto del crecimiento de girasol sobre los HAPs residuales ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) contenidos en el suelo contaminado con creosota en invernadero, después de 45 y 90 días.

<b>HAPs</b>	<b><sup>a</sup>C<sub>0</sub></b> <b>(<math>\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}</math>)</b>	<b><sup>b</sup>T<sub>45</sub></b>		<b><sup>b</sup>T<sub>90</sub></b>	
		<b>Control</b> <b>(<math>\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Girasol</b> <b>(<math>\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Control</b> <b>(<math>\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Girasol</b> <b>(<math>\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}</math>)</b>
Fluoreno	1.23 ± 0.08A	0.18 ± 0.03B	0.04 ± 0.01C	< 0.00C	< 0.00C
Fenanteno	3.98 ± 0.29A	0.77 ± 0.06B	0.39 ± 0.03B	0.54 ± 0.05B	0.12 ± 0.05B
Antraceno	8.14 ± 0.39A	2.14 ± 0.45B	0.67 ± 0.14C	1.63 ± 0.37B	0.36 ± 0.13C
Fluoranteno	5.10 ± 0.07A	1.51 ± 0.53B	0.46 ± 0.01C	1.47 ± 0.14B	0.37 ± 0.11C
Pireno	2.04 ± 0.05A	0.39 ± 0.13B	0.15 ± 0.001C	0.34 ± 0.03B	0.14 ± 0.05C
Criseno	1.26 ± 0.05A	1.16 ± 0.08A	0.68 ± 0.12B	1.02 ± 0.07A	0.51 ± 0.16B
<b>Σ HAPs</b>	<b>21.75 ± 0.9A</b>	<b>6.15 ± 1.26B</b>	<b>2.39 ± 0.30C</b>	<b>4.99 ± 0.66B</b>	<b>1.50 ± 0.5C</b>

<sup>a</sup>C<sub>0</sub> es la concentración inicial de HAP en el suelo.

<sup>b</sup>T<sub>45</sub> y T<sub>90</sub> son el tiempo de muestreo a los 45 días y a los 90 días respectivamente desde que se inició el experimento.

<sup>c</sup>Los valores mostrados son la media ± desviación estándar de los triplicados. Los valores en una fila seguidos por la misma letra mayúscula no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ). Resultados estadísticos mediante Anova de un factor y HSD de Tukey.

El criseno fue el hidrocarburo más retenido en la matriz del suelo porque, tanto a los 45 como a los 90 días, fue el único de los HAPs estudiados que no disminuyó significativamente su concentración en el control. Sin

embargo, su nivel a los 45 días se redujo a  $0.68 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  debido al efecto de la rizosfera de girasol, lo que significó una reducción del 46% con respecto a la concentración inicial. Esta desaparición se incrementó de manera no significativa a los 90 días hasta alcanzar una concentración residual igual a  $0.51 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  en presencia de girasol. Resultando de esta manera el tratamiento con planta más beneficioso para la eliminación de este contaminante, con la estructura molecular más compleja que los otros HAPs analizados.

A los 90 días se hizo un análisis del suelo en presencia de girasol para comprobar las posibles alteraciones ocasionadas en las propiedades del suelo, donde sólo se observó unas variaciones en: el pH del suelo pasando de 8.09 correspondiente al suelo inicial (mezcla 1:1) a 8.48 en presencia de la planta y en la concentración de carbono orgánico total, que pasó de 0.9% del suelo inicial al 2.1% en presencia de la planta. La distribución del tamaño de partícula después de los 90 días y con girasol se mantuvo igual por lo que la textura del suelo siguió siendo franco-arcillo-arenosa.

Además del análisis de las concentraciones residuales de HAPs en el experimento del invernadero, se realizó una cuantificación de poblaciones, gracias a la colaboración del grupo de investigación de la Dra. Magdalena Grifoll, para conocer la flora autóctona del suelo contaminado en presencia y en ausencia de la rizosfera de girasol después de los 45 y 90 días.

La cuantificación de la población heterótrofa y la población degradadora de hidrocarburos tanto de bajo como de alto peso molecular, se realizó mediante la técnica del número más probable (NMP) con el fin de conocer la evolución de la población microbiana del suelo en presencia de girasol a lo largo del tiempo transcurrido en el ensayo de invernadero (Figura IV. 12).

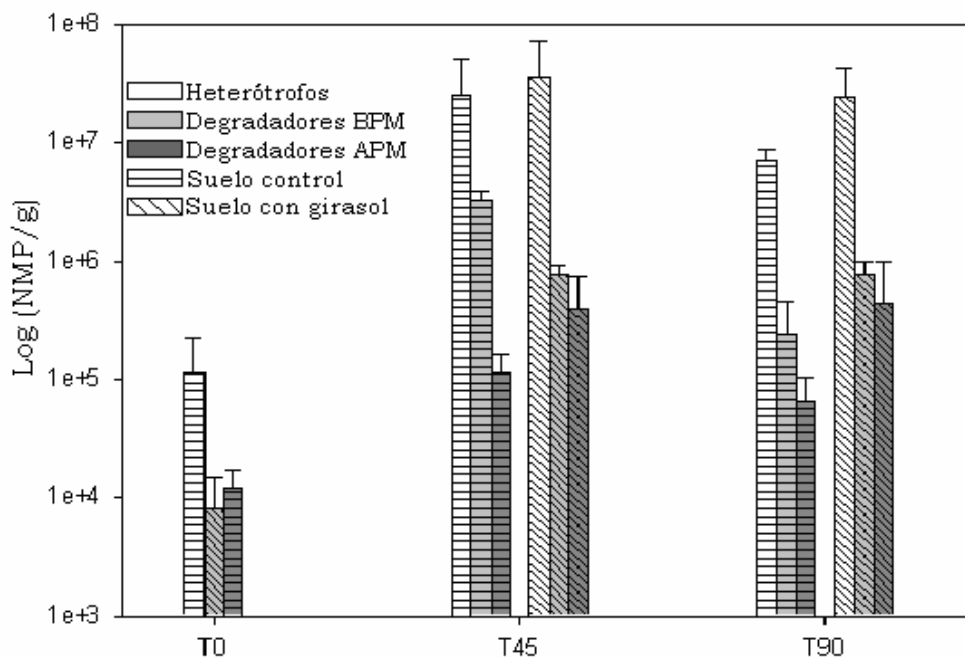


Figura IV. 12.- Recuento de poblaciones del suelo contaminado con creosota (mezcla, 1:1) con los diferentes tratamientos realizados en el invernadero. BPM significa bajo peso molecular y APM, alto peso molecular. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de los cuadruplicados.

En la Figura IV. 12 se observa que la presencia de heterótrofos aumentó significativamente (el aumento fue entre 100-200 órdenes) a los 45 y 90 días, sin existir diferencias significativas entre los distintos tratamientos a lo largo del tiempo.

Los degradadores de HAPs de bajo peso molecular (BPM) aumentaron también en número a los 45 días (300 veces mayor que la población inicial) en el control pero a los 90 días este grupo no pudo mantenerse, posiblemente al encontrarse los HAPs menos accesibles a los microorganismos (solamente 27 veces mayor que la población inicial). En presencia de girasol, además de observarse un aumento de la población a los 45 días (87 veces mayor que la población inicial), esta población se mantuvo a los 90 días. Para este grupo de microorganismos, el tratamiento con girasol además de aumentar el número de poblaciones hizo que se mantuviese a

lo largo del tiempo, por lo que la presencia de girasol hizo disminuir en mayor cantidad los HAPs de menor peso molecular (como fluoreno o antraceno) a lo largo del tiempo en comparación con los tratamientos sin planta (Tabla IV. 7).

Los degradadores de alto peso molecular (APM) presentaron un comportamiento parecido a los de bajo peso molecular en el control a los 45 días, donde se produjo un aumento de la población 10 veces mayor que la población inicial. A los 90 días hubo un descenso de la población siendo sólo 5 veces mayor que la población inicial. En presencia de girasol a los 45 días se produjo un aumento de la población (33 veces mayor que la población inicial) y se mantuvo constante hasta los 90 días.

El estudio de la composición de las comunidades microbianas también se realizó por el grupo de la Dra. Magdalena Grifoll (Figura IV. 13), mediante una metodología independiente de cultivo como es la técnica molecular de secuenciación directa de bandas de DGGE (gel de gradiente desnaturante químico) para el análisis de genes que codifican el 16S rRNA.

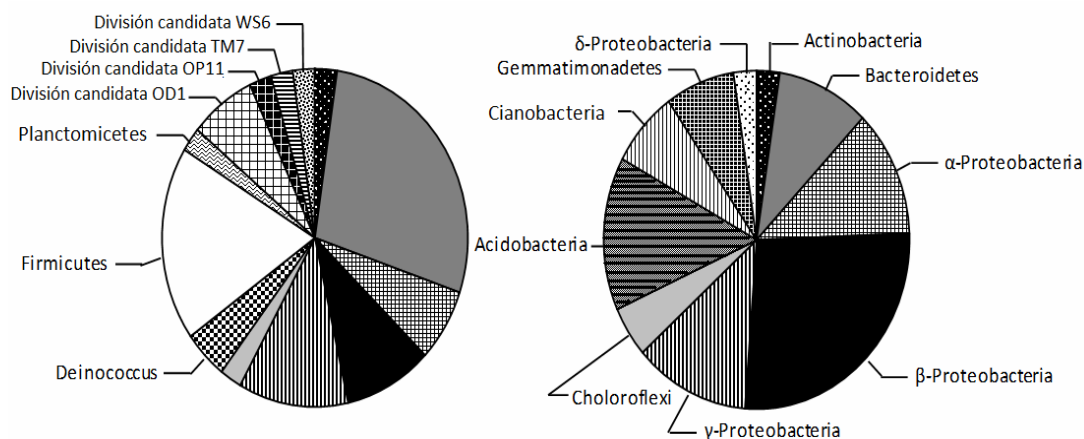


Figura IV. 13.- Abundancia relativa de los grupos filogenéticos de las eubacterias identificados en suelos contaminados con creosota (mezcla 1:1, invernadero): (A) control y (B) rizosfera de girasol para muestras de suelo después de los 90 días en invernadero.

En la Figura IV. 13 se observa que sin la influencia de la rizosfera del girasol, existían 3 grupos filogenéticos que no se encontraron a los 90 días en presencia de girasol como son *Plantomycetes* (gram negativa), *Firmicutes* (gram positiva) y *Deinococcus* (gram negativa). Además de estos 3 grupos filogenéticos, se incluyó a un linaje de organismos procariotas para los que no se han encontrado representantes cultivados en laboratorio, pero se ha obtenido evidencia de su existencia mediante el análisis metagenómico de 16S rRNA de muestras ambientales (Hugenholtz y col., 1998). Dentro de este linaje se encontró la División candidata OD1, OP11, TM7 y WS6. El término “División candidata”, de hecho, quiere decir que se trata de una especie de la que no hay suficiente información para nombrarla en base al Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias (Sly, 1995). Que estos grupos no se detectaran en presencia de la rizosfera de girasol, no significa que no se encontraran presentes, puede que se encuentren en una proporción menor en comparación al aumento de diversidad en presencia del girasol.

En presencia de girasol, a los 90 días, aparecieron otros 5 grupos filogenéticos como  $\delta$ -*Proteobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Cyanobacterias*, y *Acidobacterias* (todas gram-negativas). Aumentó la presencia de  $\alpha$ -*Proteobacteria*,  $\beta$ -*Proteobacteria* y *Chloroflexi* (también gram-negativas). Se mantuvo constante el grupo de *Actinobacteria* (gram-positiva) y  $\gamma$ -*Proteobacteria* (gram-negativa). Y disminuyó el grupo *Bacteroidetes* (gram-negativa) en comparación con los grupos presentes inicialmente sin planta.

#### **IV.2.3. Influencia de exudados de raíces de girasol sobre la biodegradación de HAPs presentes en un suelo contaminado con creosota**

Se realizó un ensayo de biodegradación con suspensiones de suelo contaminado con creosota (mezcla 1:1, del invernadero) en medio MM en presencia y ausencia de exudados de raíces de girasol para discriminar los posibles efectos positivos de los exudados, frente al efecto directo de



las raíces sobre el proceso de biodegradación. La influencia positiva de los exudados sobre la mineralización de  $^{14}\text{C}$ -pireno por las bacterias autóctonas puede observarse en la Figura IV. 14.

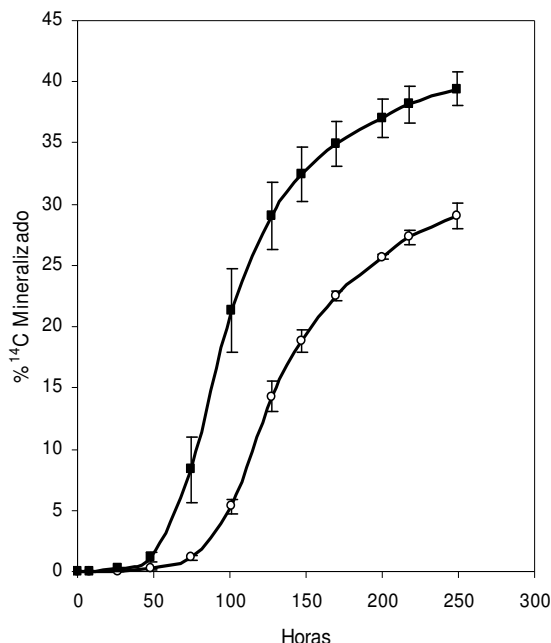


Figura IV. 14.- Mineralización de  $^{14}\text{C}$ -pireno en una suspensión de 1 g de suelo contaminado con creosota (mezcla, 1:1) por bacterias autóctonas del suelo contaminado, en presencia de exudados de raíces de girasol (■) y en ausencia de exudados de raíces de girasol (○). Las barras de error representan una desviación estándar de medidas duplicadas.

Se observó una fase de latencia de 30 días en presencia de exudados y de 75 días en ausencia de exudados, lo que indicó que la presencia de exudados adelantó el proceso de biodegradación del pireno en aproximadamente 45 h. La biodegradación ocurrió en primer lugar en presencia de los exudados de raíces de girasol, alcanzándose una mineralización máxima del  $40 \pm 1.41\%$  y en segundo lugar en ausencia de exudados de raíces de girasol, con una mineralización máxima del  $29 \pm 1.01\%$  para un período total de 250 horas.

El retraso en el comienzo de la fase máxima de mineralización de pireno puede atribuirse al tiempo necesario para que los microorganismos autóctonos se aclimaten a las nuevas condiciones de hábitat propuesto por el experimento en medio acuoso, siendo la fase de latencia menor en presencia de exudados.

De igual forma que ocurría con los experimentos de mineralización con fenantreno disuelto en NAPLs puros para ver la influencia del fertilizante oleofílico (apartado IV.3), se observó que las bacterias autóctonas tenían un comportamiento similar en las curvas de mineralización de pireno presente en el suelo contaminado (Figura IV. 14), siguiendo una gráfica en forma “S” con una fase lenta ( de 0 a 30 horas en presencia de exudados y de 0 a 75 horas en ausencia de exudados), seguida de una fase rápida que termina con la fase de meseta. Esto sugirió que las especies presentes inicialmente en el suelo, adaptadas a las condiciones *in situ*, estuvieron más adaptadas a la utilización de los HAPs más ligeros, como fluoreno o antraceno (Tabla IV. 8), que a la utilización de HAPs de 4 o más anillos en la primera fase. Las tasas de mineralización calculadas en la fase rápida indicaron una mayor capacidad catabólica de los microorganismos autóctonos por biodegradar el pireno en presencia de exudados ( $0.052 \pm 0.007 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) siendo esta tasa el doble que en ausencia de exudados ( $0.024 \pm 0.002 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ).

Para estudiar las fracciones residuales de HAPs en la biodegradación de las suspensiones de 1 g de suelo contaminado con creosota (mezcla, 1:1) por microorganismos autóctonos, se dispusieron una serie de matraces en paralelo sometidos a las mismas condiciones experimentales utilizadas para los matraces con  $^{14}\text{C}$ . Al final del proceso de biodegradación (250h), se decantó la fase sólida para extraer los HAPs residuales por Soxhlet y su posterior análisis por HPLC.

La Tabla IV. 8 muestra los resultados de 6 HAPs residuales después de las 250 h de incubación en presencia de microorganismos autóctonos donde se observó una reducción de estos HAPs en presencia de exudados de raíces de girasol.

Tabla IV. 8.- HAPs residuales después de 240 h de incubación en presencia de microorganismos autóctonos. Efecto de la presencia de exudados de raíces de girasol.

<b>PAHs</b>	<b><math>C_0</math> (<math>mg \cdot kg^{-1}</math>)</b>	<b>Control (<math>mg \cdot kg^{-1}</math>)</b>	<b>Exudados (<math>mg \cdot kg^{-1}</math>)</b>
Fluoreno	0.47 ± 0.21A	0.02 ± 0.009B	0.09 ± 0.07B
Fenantreno	4.55 ± 0.18A	1.55 ± 0.06B	1.02 ± 0.16C
Antraceno	5.83 ± 2.43A	0.10 ± 0.02B	0.09 ± 0.02B
Fluoranteno	4.73 ± 0.44A	1.73 ± 0.85B	0.69 ± 0.19B
Pireno	0.98 ± 0.12A	0.53 ± 0.09B	0.15 ± 0.007C
Criseno	1.54 ± 0.20A	0.79 ± 0.15B	0.47 ± 0.02C
<b>∑ HAPs</b>	<b>19.28 ± 1.40A</b>	<b>4.77 ± 0.55B</b>	<b>2.50 ± 0.16C</b>

$C_0$  es la concentración de hidrocarburo inicial.

Los valores mostrados son la media ± desviación estándar de los duplicados. Los valores con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ), resultados estadísticos aplicando ANOVA de un factor con HSD de Tukey.

Comparando todos los tratamientos de la Tabla IV. 8, entre microorganismos autóctonos mediante análisis estadístico (ANOVA de 1 factor con HSD de Tukey,  $P \leq 0.05$ ), se demuestra que:

- No hay diferencias significativas entre los tratamientos (con o sin exudados) para fluoreno, antraceno y fluoranteno, donde sólo se observa un descenso de concentración residual en comparación con la concentración inicial de hidrocarburo.
- En presencia de microorganismos autóctonos, la biodegradación de fenantreno, pireno y criseno

añadiendo exudados es más acusada. Siendo para el fenantreno una concentración residual 1.52 veces menor en presencia de exudados que en el control, para el pireno 3.5 veces menor y para el criseno 1.7 veces menor.

- En el caso del sumatorio de los HAPs también se aprecia un importante descenso de la concentración residual en presencia de exudados de girasol, siendo este descenso 1.9 veces mayor en presencia de exudados.

Se tomaron muestras de las suspensiones con bacterias autóctonas en medio de mineralización (MM) y en presencia de exudados de raíces de girasol después de las 240 h (10 días) de incubación para ver la presencia de la microflora autóctona mediante Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), Figura IV.15.

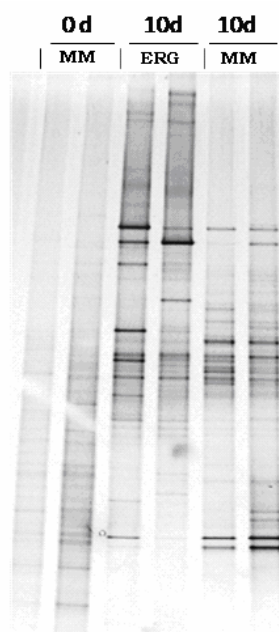


Figura IV. 15.- Perfil del DGGE de fragmentos del gen 16S rRNA amplificados con PCR de las suspensiones de suelo contaminado con creosota (mezcla, 1:1) con bacterias autóctonas en medio de mineralización (MM ) a tiempo cero (0d) y en medio de mineralización (MM) y exudados de raíces de girasol (ERG) después de 240 h de incubación (10 días, 10d).

Se contempla en la Figura IV.15 una mayor intensidad de las bandas a los 10 días en presencia de exudados de raíces de girasol, indicándonos que hay un mayor número de poblaciones bacterianas. Esto confirmó que la presencia de exudados estimula el crecimiento bacteriano autóctono proporcionando una situación favorable para la biodegradación de los contaminantes orgánicos presentes en la creosota.

En presencia de exudados hay una mayor biodegradación de los HAPs debido a la influencia de estos exudados sobre las poblaciones autóctonas degradadoras de HAPs ya que no se observaron efectos de difusión ni una mayor captación o solubilización de estos hidrocarburos en presencia de exudados de plantas mediante ensayos de reparto con polidimetilsiloxano. Siendo la relación de velocidades de transferencia de masa ( $\frac{a_{\text{medio-con-exudados}}}{a_{\text{medio-acuoso}}}$ ) igual a 1.32 para pireno y por tanto no muy superior a la unidad para que exista tal efecto de difusión del hidrocarburo en presencia de exudados. El aumento de la capacidad de los exudados por solubilizar al pireno ( $\frac{C_t}{C_{ld}}$ ) fue igual a 0.99 y no superior a la unidad para que exista un efecto de captación o solubilización de los exudados.

#### **IV.2.4. Efecto de los exudados de raíces de girasol sobre la biodegradación de pireno**

Se estudió el efecto de los exudados de raíces de girasol en presencia de pireno puro para evitar los procesos de adsorción que se pueden producir en el suelo y poder ver el efecto directo de los exudados sobre la biodegradación de este hidrocarburo por *Mycobacterium gilvum* VM552. De esta manera además controlamos la presencia de microorganismos inoculando una cantidad conocida de *M. gilvum* VM552.

Se realizaron ensayos de biodegradación de pireno por debajo y por encima de la solubilidad de este hidrocarburo ( $S=0.135 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), para estudiar su mineralización y la influencia de los exudados de raíces de girasol para cada caso.

Existió una estimulación en presencia de exudados de raíces de girasol por debajo y por encima de la solubilidad del pireno (Figura IV.16). En ambos casos la estimulación fue casi el doble comparando las tasas de mineralización con y sin exudados.

La forma de las gráficas fue diferente, por debajo de la solubilidad de pireno (Figura IV.16.A) fue una cinética de primer orden mientras que por encima de la solubilidad (Figura IV.16.B) presentó una cinética logística donde se puede apreciar un crecimiento bacteriano, tal y como se explicó en apartados anteriores.

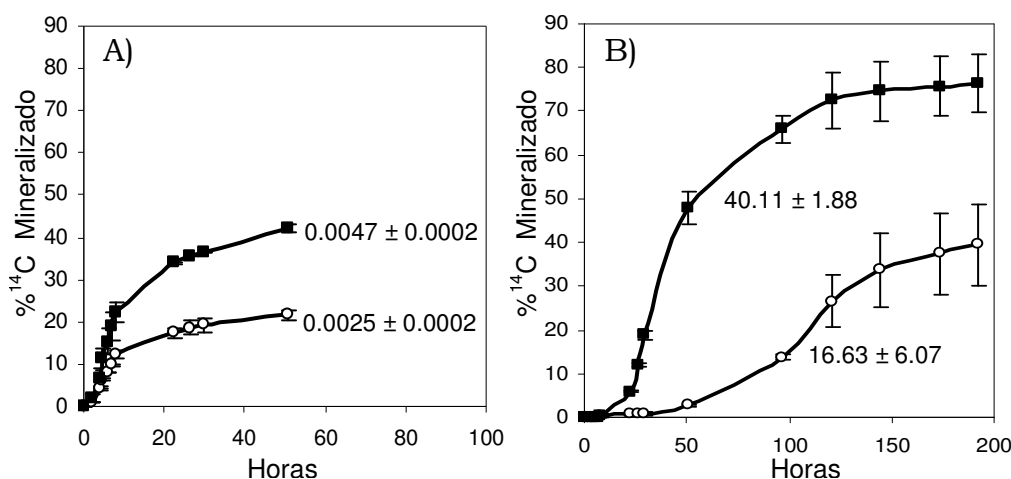


Figura IV. 16.- Mineralización de pireno en presencia de exudados de raíces de girasol (■) y en ausencia de exudados de raíces de girasol (○) a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ : A)  $6.4 \cdot 10^{-4} \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de pireno (por debajo de su solubilidad) y B)  $27.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de pireno (por encima de su solubilidad). Condiciones de incubación a  $25^\circ\text{C}$  y 80 rpm. Las barras de error representan una desviación estándar de medidas duplicadas. Los números nos indican las tasas de mineralización en  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1} \pm$  la desviación estándar de los duplicados.

Destacar que en el caso de la biodegradación de pireno puro por encima de la solubilidad se obtuvo un porcentaje final de mineralización mayor (casi el doble) en presencia de exudados y con *M. gilvum* VM552 que en el caso de las suspensiones de suelo contaminado con creosota y con microorganismos autóctonos. Esto pudo ser debido a la mayor complejidad de la muestra en las suspensiones con creosota, ya que las suspensiones están constituidas por una mezcla de HAPs, que puede alterar el potencial metabólico de las bacterias presentes.

### **IV.3. ÁCIDOS HÚMICOS**

#### **IV.3.1. Caracterización de los ácidos húmicos**

La fracción de ácidos húmicos (AH) fue purificada en un estudio previo del grupo (Lahlou y col. , 2000) de un suelo del Parque Nacional de Doñana (Huelva), de una zona cerca del lago de Santa Olalla. El suelo era un Typic Humaquept, con 4.3% de materia orgánica y pH 6.5. El análisis de  $^{13}\text{C}$ -RMN de esta fracción dió señales indicando ácidos carboxílicos (200-170 ppm), grupos aromáticos (160-100 ppm) y carbonos alquílicos (50-0 ppm). Los resultados de los análisis elementales fueron, C: 47.0%, H: 5.31%, O: 43.72% y N: 3.97% (Lahlou y col. , 2000).

Los ácidos húmicos sintéticos proporcionados por Aldrich tenían una proporción de carbono del 38.28 % (nº del producto H16752) (Mayer y col., 2007).

Se prepararon las disoluciones con ácidos húmicos como se describió en el apartado III.8.2, hasta conseguir una concentración de 10 ó 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . El análisis del COT de una disolución de ácidos húmicos a 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  obtuvo un resultado de 13.9  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , lo cual confirmó la completa disolución de los ácidos húmicos.

### **IV.3.2. Estudio físico-químico de los HAPs en presencia de ácidos húmicos mediante ensayos de reparto con polidimetilsiloxano**

A pesar de la baja solubilidad de los HAPs en soluciones acuosas, la difusión puede ser un mecanismo importante para controlar el transporte de masa y biodisponibilidad de los HAPs desorbidos.

Si la fase acuosa limita el transporte de los contaminantes entre los microorganismos degradadores y el medio que les rodea, se producirá un gradiente de concentración en la capa acuosa cerca del microorganismo. Esta capa donde se produce el gradiente es la capa de difusión acuosa (ter Laak y col. , 2009). Las capas de difusión acuosa pueden contener materiales orgánicos disueltos y coloidales, así como materiales minerales. Estos materiales pueden mejorar el transporte de contaminantes orgánicos hidrofóbicos a través de estas capas por asociación con el contaminante donde su actividad química es alta, difundir y liberar el compuesto donde su actividad es baja.

En la Tabla IV. 9, se observan las tasas relativas de velocidad de difusión ( $a_x/a_{agua}$ , véase sección III.9.3) obtenidos del estudio de difusión de los HAPs a través de las disoluciones con diferentes tipos de ácidos húmicos en microcámaras que contienen polidimetilsiloxano (Mayer y col. , 2007). El efecto de difusión es mayor en presencia de las disoluciones con ácidos húmicos sintéticos, en comparación con los ácidos húmicos extraídos de suelo, debido a las diferencias químicas entre los ácidos sintéticos y el natural. Y dentro de los ácidos sintéticos vemos que el efecto de difusión aumenta con la concentración de carbono orgánico utilizado.



Tabla IV. 9.- Valores de la relación de velocidades de transferencia de masa  $a_x/a_{agua}$  obtenidos para cada disolución en presencia de ácidos húmicos.

<b>HAP</b>	<b><math>K_{ow}</math></b>	<b><math>^a\text{AHA}</math> <math>15.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math></b>	<b><math>^a\text{AHA}</math> <math>76.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math></b>	<b><math>^a\text{AH Olalla}</math> <math>100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math></b>
Fenantreno	4.57	0.86	1.07	0.63
Fluoranteno	5.23	1.05	1.18	0.85
Pireno	5.13	1.11	1.32	0.88
Benzo(a)antraceno	5.91	1.13	1.64	1.30
Criseno	5.81	1.16	1.63	1.12
Benzo(k)fluoranteno	6.11	0.86	3.35	2.49
Benzo(a)pireno	6.13	1.33	3.79	3.03

<sup>a</sup>AHA, son ácidos húmicos sintéticos de la casa comercial Aldrich. Los valores se obtuvieron del artículo de Mayer y col., (2007) para compararlos con los ácidos húmicos extraídos del suelo de Santa Olalla (AH Olalla). Las desviaciones estándar de los triplicados fueron menores de 0.001.

En general, no hay un efecto promotor significativo sobre la transferencia de masa por difusión en presencia de ácidos húmicos extraídos de suelo, a excepción de benzo(k)fluoranteno y benzo(a)pireno donde la relación entre  $a_{AH}/a_{agua}$  es mucho mayor que la unidad. Se observa un efecto de difusión mayor a medida que aumenta la constante  $K_{ow}$ . Por otra parte, los valores inferiores a la unidad observados para fenantreno, fluoranteno y pireno indican una difusión más lenta.

Además de la determinación de la transferencia de masa de los HAPs en presencia o ausencia de ácidos húmicos, se desarrolló un sistema analítico nuevo de liberación de HAPs desde un polímero (PDMS) en lugar del muestreo por difusión. Este sistema analítico nuevo se basó en los principios de dopaje pasivo desarrollados para el control de concentraciones libres disueltas, mediante el reparto en el equilibrio de los HAPs desde un polímero previamente cargado con los HAPs en estudio. Con esta técnica se puede cuantificar el aumento de la capacidad de la muestra en estudio (disoluciones a diferentes concentraciones de ácidos

húmicos) para los HAPs con respecto a una fase acuosa de referencia.

La Tabla IV. 10 muestra el aumento de la capacidad del medio mineral (MM) como control y las disoluciones con diferentes concentraciones de ácidos húmicos de Santa Olalla en MM. Se observa que, al añadir  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos en el medio, se mejora la capacidad de captación de pireno en el medio aproximadamente un 50% con respecto al control.

Tabla IV. 10.- Aumento de la capacidad de los ácidos húmicos por captar los HAPs retenidos en la silicona de los viales de dopaje pasivo,  $C_{\text{total}}/C_{\text{libre disuelta}}$ .

<b>HAP</b>	<b><math>K_{ow}</math></b>	<b>MM</b>	<b>HA Olalla <math>10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math></b>	<b>HA Olalla <math>100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math></b>
Naftaleno	3.33	$0.96\pm 0.01$	$0.92\pm 0.04$	$0.89\pm 0.03$
Fenantreno	4.57	$0.96\pm 0.02$	$1.07\pm 0.06$	$2.18\pm 0.07$
Antraceno	4.68	$0.89\pm 0.03$	$1.04\pm 0.04$	$2.33\pm 0.11$
Fluoranteno	5.23	$0.86\pm 0.03$	$1.48\pm 0.07$	$6.40\pm 0.09$
Pireno	5.13	$0.86\pm 0.07$	$1.53\pm 0.02$	$6.78\pm 0.26$

<sup>a</sup>Los valores mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de los triplicados.

### **IV.3.3. Estimación de la velocidad de degradación de fenantreno y pireno en cultivos líquidos en presencia de ácidos húmicos**

Se estudió la biodegradación de HAPs por *M. gilvum* VM552 mediante una serie de experimentos de mineralización a diferentes concentraciones de pireno y fenantreno en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de ácidos húmicos incubados a 80 rpm y a una temperatura controlada de 25°C (resultados mostrados en la Tabla IV. 11).

Los resultados de biodegradación de pireno y fenantreno por debajo de su solubilidad ( $6\cdot 10^{-4} \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) nos indicaron, al no existir diferencias significativas, que los ácidos húmicos no

tenían ningún efecto tóxico sobre los microorganismos degradadores.

Tabla IV. 11.- Efecto de los ácidos húmicos (AH) en la mineralización de fenantreno y pireno a diferentes concentraciones en cultivos líquidos incubados a 25°C y 80 rpm.

<b>HAP</b>	<b><math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math></b>	<b>AH (<math>\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}</math>)</b>	<b>Tasa de Mineralización (<math>\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}</math>)<sup>a</sup></b>	<b>Mineralización Final (%)<sup>a</sup></b>	<b>Días<sup>b</sup></b>
Pireno	$6\cdot 10^{-4}$	0	0.0068 ± 0.0001a	68.2 ± 0.87a	8
		10	0.0066 ± 0.0002a	64.7 ± 3.89a	8
		100	0.0065 ± 0.0001a	65.3 ± 0.42a	8
Pireno	1.62	0	4.19 ± 0.29a	69.6 ± 2.73a	12
		10	3.95 ± 0.45a	65.4 ± 8.1a	12
		100	2.34 ± 0.28b	61.8 ± 7.5a	12
Pireno	50	0	30.51 ± 3.47a	36.6 ± 1.84a	13
		10	67.68 ± 3.42b	54.1 ± 3.52b	13
		100	49.05 ± 5.53c	38.4 ± 5.82a	13
Fenantreno	$6\cdot 10^{-4}$	0	0.003 ± 0.0001a	46.6 ± 1.98a	8
		10	0.004 ± 0.0003a	34.0 ± 0.02b	8
		100	0.001 ± 0.0003a	26.5 ± 4.72b	8
Fenantreno	14.4	0	20.3 ± 0.63a	59.9 ± 4.76a	12
		10	22.45 ± 1.23a	67.6 ± 0.18b	12
		100	16.88 ± 1.89b	67.8 ± 1.37b	12
Fenantreno	50	0	98.7 ± 8.57a	50.8 ± 1.25a	12
		10	118.2 ± 4.38a	71.6 ± 0.33b	12
		100	54.14 ± 5.54b	59.2 ± 1.22c	12

<sup>a</sup> Los valores mostrados son la media ± una desviación estándar de los duplicados. Para cada cantidad de HAP, los valores en una columna seguidos con la misma letra minúscula no son significativamente diferentes ( $P = 0.05$ , Anova de un factor y HSD de Tukey) para cada concentración de HAP.

<sup>b</sup> Período de tiempo empleado para las medidas de los experimentos de mineralización.

Se estudió además una concentración de pireno y fenantreno 12 veces por encima de la solubilidad para cada compuesto ( $1.62$  y  $14.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente). Para estas concentraciones no existió ningún efecto de estimulación. Sólo en presencia de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos, se observó un efecto inhibitorio de la biodegradación del orden de 1.79 veces para el pireno y 1.2 veces para el fenantreno. Esto concuerda con numerosos estudios donde se afirma que la presencia de materia orgánica disuelta retiene este tipo de contaminantes de tal forma que se convierten menos accesibles para los microorganismos (Amador y Alexander, 1988).

A  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (370 veces por encima de la solubilidad de pireno y 42 veces por encima de la solubilidad de fenantreno) se observó un comportamiento diferente entre ambos compuestos (Figura IV. 17).

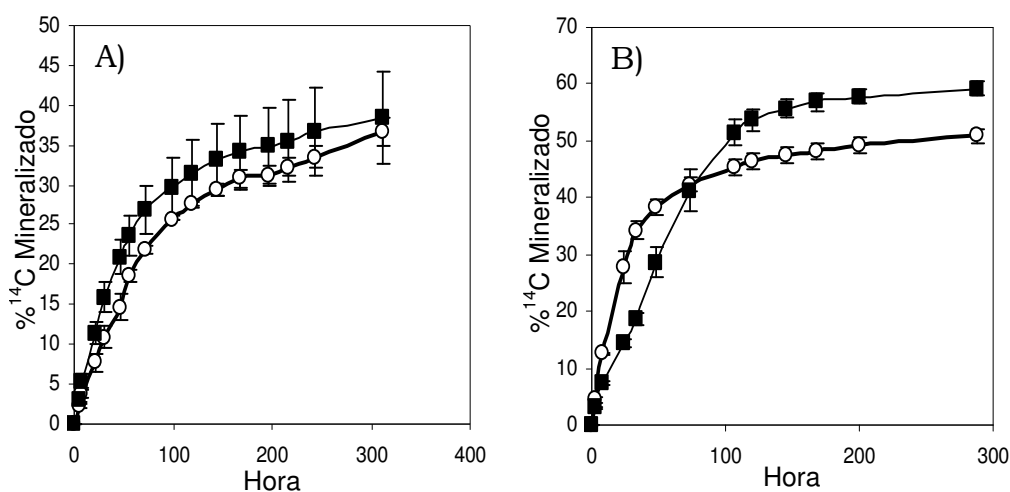


Figura IV. 17.- Mineralización de pireno (A) y de fenantreno (B) a una concentración de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en presencia de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos (■) o en ausencia (○). Las barras de error representan una desviación estándar de medias duplicadas.

El fenantreno presentó una inhibición de la biodegradación en presencia de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos mientras que en el caso de pireno, el efecto fue de estimulación (Figura IV.17). La estimulación de la

biodegradación de pireno fue más acusada en presencia de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  que con  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos (1.38 veces mayor) y a su vez, 2.2 veces mayor que el control. Esto puede ser debido a que en algunas circunstancias la materia orgánica disuelta puede actuar como transportador de contaminantes hidrófobos haciendo que sean más biodisponibles (Haftka y col., 2008).

Los resultados de la Tabla IV. 11 mostraron que los ácidos húmicos sólo actuaban como bioestimulante para la biodegradación de pireno a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , y con  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos se obtuvo un mejor resultado que con  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Por esto, se realizó otro ensayo de mineralización equilibrando las disoluciones antes de añadir los microorganismos degradadores de pireno para ver si esta condición podría afectar a la tasa de mineralización. En la Figura IV.18.A y IV.18.B, observamos que al cambiar las condiciones de incubación de los experimentos se obtuvieron resultados distintos, existiendo solamente un efecto de bioestimulación en presencia de ácidos húmicos y sin un equilibrio previo de las disoluciones (Figura IV.18.A).

En la Figura IV.18.B modificamos sólo la condición de equilibrio de las disoluciones para saber si existía alguna diferencia entre un medio donde la mayor parte del pireno se encontraba inicialmente sólo en la fase sólida, y los microorganismos iban degradándolo progresivamente a medida que se iba liberando al medio por difusión (comportamiento de la Figura IV.18.A), y entre un medio equilibrado previamente a la adición de las bacterias (Figura IV.18.B). Las disoluciones se equilibraron durante 24 h a 80 rpm y  $25^{\circ}\text{C}$  antes de la inoculación, observándose para este tratamiento una tasa de mineralización mayor. Esto pudo ser debido a que el equilibrio hizo que la presencia de pireno fuera mayor en el medio acuoso que en ausencia de equilibrio previo. El efecto de los ácidos húmicos fue, por tanto, diferente en presencia de una concentración de pireno ya establecida en el equilibrio, donde no se vio la estimulación de la mineralización, sino una inhibición.

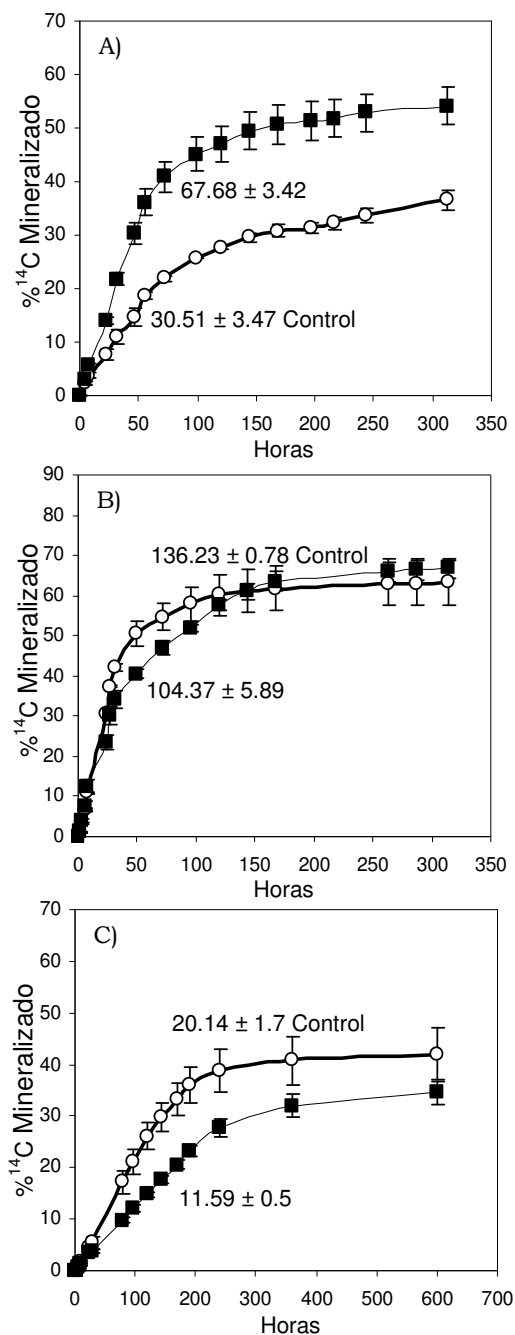


Figura IV. 18.- Mineralización de pireno a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en presencia de ácidos húmicos a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (■) y en ausencia (○) en tubos de ensayo a 80 rpm y  $25^\circ\text{C}$ : A) sin equilibrar el medio, B) equilibrando el medio 24h antes de añadir las bacterias y C) sin equilibrio y en presencia de PDMS cargada con la misma cantidad de pireno. Las barras de error representan una desviación estándar de medidas duplicadas. Los números nos indican las tasas de mineralización en  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  con la desviación estándar de los duplicados.

El comportamiento diferente de las Figuras IV.18.A y IV.18.B pudo ser debido a las siguientes causas:

- Sin equilibrio, el pireno queda fijado en el fondo del tubo de ensayo, por lo que la concentración disuelta de pireno se fue degradando por los microorganismos, teniendo una tasa de mineralización mayor en presencia de ácidos húmicos por la capacidad de esta materia orgánica en solubilizar a los compuestos orgánicos no-polares (Chin y col., 1997) como el pireno en medio acuoso.

- Al equilibrar antes de añadir las bacterias degradadoras, el pireno no queda fijado en el fondo del matraz como consecuencia de este equilibrio. Con este equilibrio se obtuvieron unas tasas de mineralización mayores al tener desde el principio una concentración de pireno disuelta hasta su máximo de solubilidad,  $135 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Cuando se inoculó, se observó una ligera inhibición de la mineralización de pireno en presencia de ácidos húmicos, posiblemente por quedar adsorbido parte del pireno disuelto en él. Al encontrarse el pireno adsorbido a los ácidos húmicos durante el proceso de equilibrio y añadir inmediatamente después los microorganismos a la disolución, estos microorganismos toman fácilmente el pireno disuelto pero se dificulta la toma del pireno adsorbido a los ácidos húmicos provocando la inhibición.

En definitiva, sin equilibrio previo, se va produciendo un gradiente de concentración, de tal forma que a medida que el microorganismo toma el pireno, el mismo se va disolviendo desde el fondo del tubo, siendo la concentración inicial de pireno en disolución más pequeña (menor actividad química) que cuando se realiza un equilibrio previo (mayor actividad química en la disolución). En esta situación, sin equilibrio previo, se favorece el efecto de solubilización de los ácidos húmicos sobre el pireno sólido. Mientras que con equilibrio, en la disolución existe una concentración de pireno que es su concentración máxima de solubilización, de tal forma que el aporte extra a la solución acuosa por el efecto solubilizador de los ácidos húmicos es compensado por su adsorción.

Asímismo, la presencia de cristales en el medio garantizó la concentración máxima de solubilidad del pireno durante el proceso de degradación.

Aparentemente la presencia de ácidos húmicos solubilizó al pireno a 80 rpm sin equilibrio previo, siendo este hidrocarburo inmediatamente disponible para el consumo microbiano. Algo parecido fue observado por Holman y col., (2002) que estudió la influencia de ácidos húmicos procedentes de suelos de Elliot sobre la degradación de una película delgada de pireno depositada sobre la superficie de una magnetita por *Mycobacterium* sp. JLS y sugirió que el pireno insoluble en agua se solubilizó dentro de unos núcleos de pseudomicelas, siendo de esta manera directamente biodisponible para la toma y consumo bacteriano, basándose en el estudio de (Engebretson y Vonwandruszka, 1994).

Con objeto de controlar la concentración libre disuelta de pireno en medio acuoso con las mismas condiciones de incubación a 80 rpm, 25°C y sin equilibrio previo, donde se observó estimulación de la mineralización de pireno en presencia de 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos, se utilizaron unos viales de 20 mL de capacidad con silicona en el fondo. En esta silicona se fijó mediante la técnica de dopaje pasivo la misma cantidad de pireno (para dar 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) que en el experimento donde se consiguió estimulación (Figura IV.18.A).

Las tasas de mineralización fueron diferentes, tanto para el sistema con dopaje pasivo como para el tratamiento sin silicona (ver Figura IV.18.C y IV.18.A). Las tasas de mineralización fueron menores para los ensayos con dopaje pasivo (1.5 menor para el control y 5.8 veces menor en presencia de ácidos húmicos). Esto posiblemente fue debido a la afinidad de la silicona por el pireno, de tal forma que el compuesto está menos accesible en el medio que sin la silicona.



#### **IV.3.4. Caracterización de la concentración total y libre disuelta de pireno en presencia de ácidos húmicos**

Para comprender lo que ocurrió en el ensayo de mineralización de pireno a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en presencia y ausencia de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos a 80 rpm y  $25^\circ\text{C}$  de incubación, se realizaron experimentos de disolución en las mismas condiciones que en los experimentos de mineralización, pero en ausencia de bacterias degradadoras. Con estos experimentos se midieron las concentraciones de pireno total en disolución y las concentraciones de pireno libre disuelto mediante espectrofotómetro de fluorescencia sincrónica y centelleo líquido, en presencia y ausencia de ácidos húmicos.

En la Figura IV. 19 se observa que, en ausencia de ácidos húmicos, las concentraciones total y libre disueltas (Figura IV. 19.A y IV. 19.B) alcanzaron el equilibrio más rápidamente (a las 2h), mientras que en presencia de ácidos húmicos existió un aumento progresivo de estas concentraciones (fijándonos en el último punto para ambas concentraciones, total y libre disueltas). Esto explicaría la bioestimulación en la degradación del pireno observadas en estas condiciones. Asimismo, estos resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos de aumento de la capacidad extractora de los ácidos húmicos presentes en la disolución sobre el pireno (Tabla IV. 10).

En ausencia de ácidos húmicos, tanto el pireno detectado por fluorescencia sincrónica (Figura IV. 19.B) como el detectado por centelleo líquido (Figura IV. 19.A) siguieron el mismo comportamiento y tuvieron una velocidad de disolución igual (sin diferencias significativas para  $P \leq 0.05$ , Tabla IV. 12), por lo que la única concentración presente en la disolución fue la concentración de pireno disuelto. La concentración en equilibrio estimada mediante  $^{14}\text{C}$  fue  $137.86 \pm 6.99 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  y mediante fluorimetría fue  $128.81 \pm 1.85 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Se apreció en cambio una diferencia de concentraciones, entre la total y la libre disuelta, en presencia de ácidos húmicos, donde la concentración total disuelta de pireno fue mayor que la concentración libre disuelta. En este caso, la concentración total incluye al pireno que está asociado a los ácidos húmicos. La velocidad de disolución del pireno libre disuelto fue muy baja ( $7.7 \pm 0.58 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) en comparación con la tasa de disolución del pireno total disuelto en presencia de ácidos húmicos ( $231.8 \pm 44.3 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Por tanto, el aumento de la tasa de mineralización en presencia de ácidos húmicos de la Figura IV.18.A, no se explicaría sólo con la biodegradación de esta fracción libre disuelta sino que además, los microorganismos pueden adquirir el pireno unido a los ácidos húmicos.

Tabla IV. 12.- Resultados de los experimentos de biodegradación y disolución comparados con los obtenidos utilizando técnicas de dopaje pasivo.

<b>Pireno</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	<b>AH</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	<b>MINERALIZACIÓN</b>		<b>DISOLUCIÓN</b>							
		<i>Sin</i> <sup>a</sup> PDMS	<i>Con</i> <sup>a</sup> PDMS	<i>Sin</i> <sup>a</sup> PDMS		<i>Con</i> <sup>a</sup> PDMS		<i>Sin</i> <sup>a</sup> PDMS		<i>Con</i> <sup>a</sup> PDMS	
		<i>Tasa</i> ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	<i>Tasa</i> ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	<i>Tasa</i> <sup>b</sup> <i>C</i> <sub>Total</sub> ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	<i>Tasa</i> <sup>b</sup> <i>C</i> <sub>Libre</sub> ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	<i>Tasa</i> <sup>b</sup> <i>C</i> <sub>Total</sub> ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	<sup>b</sup> <i>C</i> <sub>Total</sub> ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	<sup>b</sup> <i>C</i> <sub>Libre</sub> ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	<sup>b</sup> <i>C</i> <sub>Total</sub> ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	<sup>b</sup> <i>C</i> <sub>Libre</sub> ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	
50	0	30.5 ± 3.5aA	20.1 ± 1.7aB	239.9 ± 81.6aC	248.8 ± 35.2aC	254.9 ± 24.0aC	137.8 ± 6.9aA	128.8 ± 1.8aA	66.8 ± 1.9aB	66.8 ± 1.9aB	
	10	67.7 ± 3.4bA	11.6 ± 0.5bB	231.8 ± 44.3aC	7.7 ± 0.58bD	135.4 ± 24.9bE	167.1 ± 7.4bA	99.1 ± 9.7bB	76.9 ± 1.0bC	66.8 ± 1.9aD	

<sup>a</sup>PDMS, son las siglas de polidimetilsiloxano indicando si el resultado se obtuvo usando dopaje pasivo.

<sup>b</sup>C, se refiere a la concentración en disolución.

<sup>c</sup>Los valores en una columna seguidos por la misma letra minúscula, son significativamente iguales para  $P \leq 0.05$  (utilizando análisis estadístico con T de student). Los valores en una fila seguidos por la misma letra mayúscula comparando entre sí tasas o concentraciones, son significativamente iguales para  $P \leq 0.05$  (utilizando análisis estadístico con Anova de un factor y HSD de Tukey).

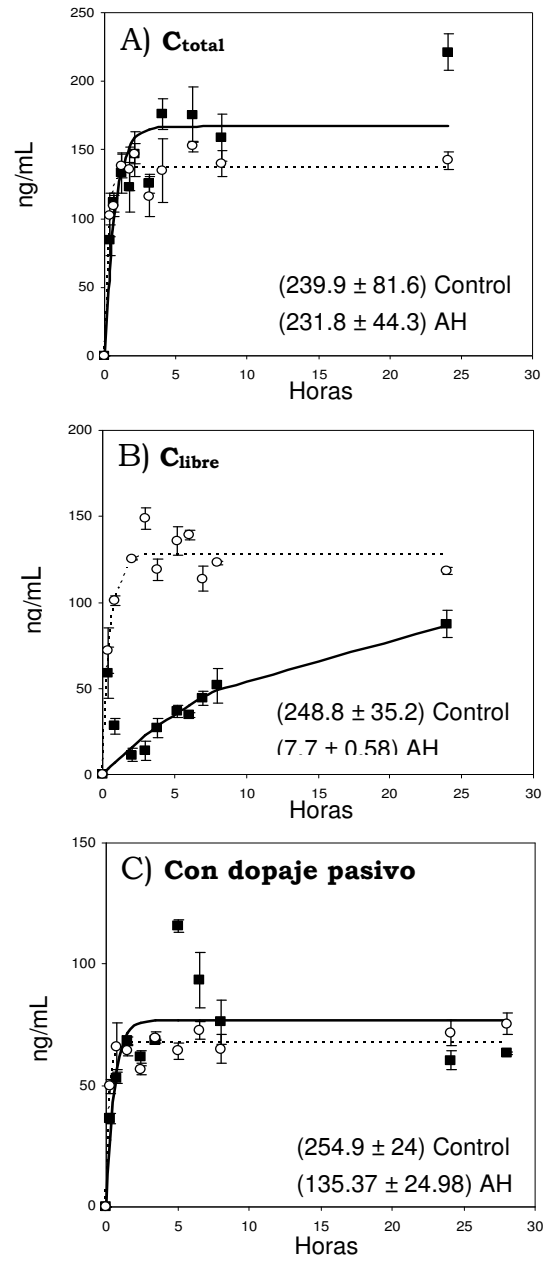


Figura IV. 19.- Estudio de la disolución de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de pireno a 80 rpm y  $25^\circ\text{C}$ : A) concentración de pireno total disuelto, B) concentración de pireno libre disuelto y C) concentración de pireno total con dopaje pasivo. Los símbolos nos indican: ausencia de ácidos húmicos (Control, o) y presencia de ácidos húmicos (■). Las líneas continuas y discontinuas representan al ajuste experimental de la ecuación 3 (III.6.2) con y sin ácidos húmicos respectivamente. Las barras de error indican la desviación estándar de las medidas por triplicado y los números, las tasas de disolución en  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  con la desviación estándar de los triplicados.

En la Figura IV. 19.C, se midió la concentración de pireno total disuelto en presencia y ausencia de ácidos húmicos cuando se fijó  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de pireno en la silicona del sistema de dopaje pasivo, siendo la concentración libre disuelta constante en el equilibrio e igual en ambas situaciones (con y sin ácidos húmicos presente,) ya que la silicona nos permite esta situación en el equilibrio. En este ensayo se obtuvieron diferencias significativas para  $P=0.05$  en las velocidades de disolución del pireno siendo la tasa del control ( $254.9 \pm 24 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) el doble que en presencia de ácidos húmicos ( $135.4 \pm 24.9 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Esto explicaría la inhibición de la mineralización que ocurrió en las mismas condiciones (Figura IV.18.C), y que concuerda con los resultados obtenidos en el estudio de difusión utilizando las microcámaras (Tabla IV. 9), donde la velocidad de difusión en presencia de los ácidos húmicos fue menor que en su ausencia (según la relación  $\alpha_{AH}/\alpha_{agua} < 1$ ). Además, la concentración total en el equilibrio del experimento de disolución con dopaje pasivo (Figura IV. 19.C) fue  $76.97 \pm 1.03 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  en presencia de ácidos húmicos y  $66.78 \pm 1.93 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  existiendo diferencias significativas para estas dos concentraciones. Esto concuerda con la capacidad de solubilización que poseen los ácidos húmicos y que fue media por la técnica de dopaje pasivo (Tabla IV. 10).

En cuanto a las medidas de las concentraciones totales mediante centelleo líquido con y sin dopaje pasivo (Tabla IV. 12), se observó que en ausencia de ácidos húmicos (control), las tasas de disolución no fueron significativamente diferentes para  $P=0.05$  ( $239.9 \pm 81.6 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  sin dopaje pasivo y  $254.9 \pm 24 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  con dopaje pasivo). Sólo existieron diferencias significativas en las tasas de disolución en presencia de ácidos húmicos, siendo la tasa sin dopaje pasivo igual a  $231.8 \pm 44.3 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  y con dopaje pasivo igual a  $135.1 \pm 24.9 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Se observó de esta manera un comportamiento diferente en la disolución del pireno con y sin la influencia de la silicona empleada en el dopaje pasivo, existiendo una disminución de la tasa de disolución en presencia de ácidos húmicos y con silicona. Con esta

observación, se podría explicar la inhibición producida en el ensayo de mineralización en el sistema de dopaje pasivo (Figura IV.18.C).

Se debe destacar que sin dopaje pasivo, las tasas de disolución del pireno total con y sin ácidos húmicos son significativamente iguales y la concentración en disolución continúa aumentando sólo en presencia de ácidos húmicos, por lo que este aumento de la concentración total de pireno podría explicar la estimulación de la mineralización de la Figura IV.18.A.

Mediante el ajuste realizado a los resultados de las medidas de pireno total y libre disuelto en presencia de ácidos húmicos (en el supuesto de que ambas concentraciones alcanzaran el equilibrio), obtuvimos una concentración total en el equilibrio igual a  $167.12 \pm 7.39 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , mientras que la concentración libre disuelta en el equilibrio fue igual a  $99.06 \pm 9.67 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

El comportamiento de las dinámicas de disolución para el pireno total y libre disuelto en presencia y ausencia de la silicona fue diferente.

#### **IV.3.5. Evolución de la concentración de pireno libre disuelta durante su biodegradación en presencia y ausencia de ácidos húmicos**

Se realizó otro ensayo para ver la evolución de la concentración de pireno libre disuelta a lo largo del experimento de biodegradación de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de pireno en presencia y ausencia de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos por *Mycobacterium gilvum* VM552 a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y 80 rpm (Figura IV. 20), medidas por espectrofotómetro de fluorescencia sincrónica.

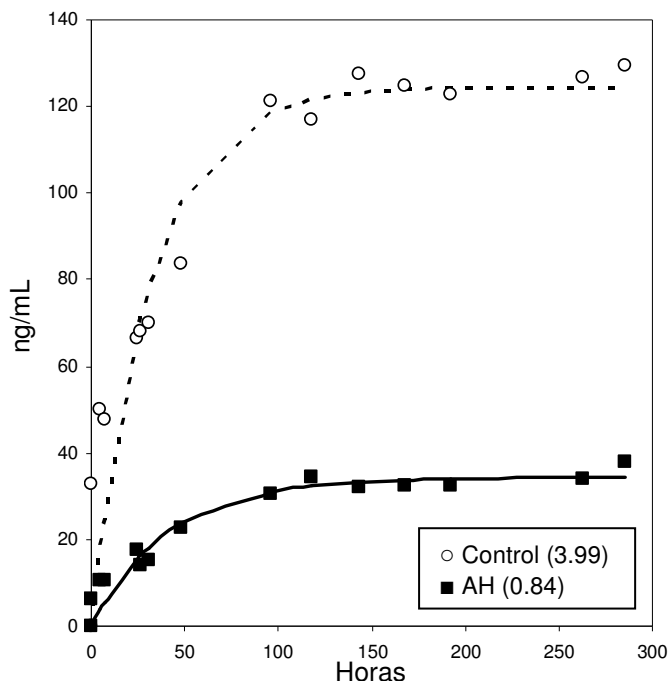


Figura IV. 20.- Concentraciones libres disueltas medidas en la biodegradación de pireno en ausencia ( $\circ$ ) y en presencia de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos ( $\blacksquare$ ) medidas por espectrofotómetro sincrónico de fluorescencia. Las líneas discontinua y continua representan al ajuste experimental de la ecuación 3 (III.6.2) sin y con ácidos húmicos respectivamente. Los números nos indican la velocidad de aparición de la concentración de pireno libre disuelto durante la biodegradación en  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

Las tasas de disolución durante la biodegradación se calcularon por los ajustes de la Figura IV. 20, siendo para el control igual a  $3.99 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  y en presencia de ácidos húmicos igual a  $0.84 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Aunque la velocidad de disolución del pireno fue 4.7 veces superior para el control, la concentración residual fue menor en presencia de ácidos húmicos ( $34.3 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) que en su ausencia ( $124.5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Estos resultados indican que existió una mayor biodegradación de pireno en presencia de ácidos húmicos, aunque la cinética fuera lenta, debido a que el pireno residual no alcanzó su valor máximo de solubilidad ( $135 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Mientras que en el control, al existir una concentración de pireno mayor (debido a una menor biodegradación comparado

con la presencia de ácidos húmicos), se alcanzó su concentración máxima de solubilidad.

En presencia de ácidos húmicos, la concentración de pireno libre disuelta residual fue menor debido a la biodegradación del pireno y a la unión del pireno a los ácidos húmicos mediante las pseudomicelas.

La velocidad con que aumentó la concentración libre disuelta de pireno en el control fue mayor que en presencia de ácidos húmicos. Esto fue debido a que, en el control, sólo se midió la concentración de disolución mientras que los microorganismos degradaban el pireno. Sin embargo, en presencia de ácidos húmicos se debería tener en cuenta, además de la biodegradación, la asociación a los ácidos húmicos. Al comparar la tasa de biodegradación del pireno en presencia de ácidos húmicos en la Figura IV.18.A ( $67.68 \pm 3.42 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) con la tasa medida en la Figura IV. 20 ( $0.84 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), se observó una gran diferencia. Esta diferencia se debe a que la mayor parte del pireno se une a los ácidos húmicos mejorando su accesibilidad bacteriana por lo que el pireno es mayormente degradado en forma de pseudomicelas.

Se realizó otro experimento de biodegradación en la cubeta del espectrofotómetro de fluorescencia sincrónica. Se introdujo una disolución de medio de mineralización (MM) con  $53.4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de pireno disuelto con  $1.24\cdot 10^8$  células/mL de *M. gilvum* VM552. Después se limpió la cubeta y se colocó otra disolución de MM con  $53.4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de pireno con  $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos de Santa Olalla y  $1.24\cdot 10^8$  células de *M. gilvum* VM552/mL. En ambas situaciones el volumen total introducido en la cubeta fue de 3.01 mL y se hizo un ciclo de medidas durante 20 minutos, es decir, se hizo una medida por minuto para ver la degradación del pireno en presencia y ausencia de ácidos húmicos de Santa Olalla (Figura IV. 21). En esta figura, se presentan las intensidades de fluorescencia del experimento de biodegradación de pireno en presencia y ausencia de ácidos húmicos, revelando un único pico por la presencia de pireno en la disolución. El pico disminuye a



medida que se va biodegradando el pireno del medio. Cada línea indica una media de la intensidad de fluorescencia por cada minuto de biodegradación transcurrido hasta una totalidad de 20 minutos donde ya no se distingue pireno en el medio.

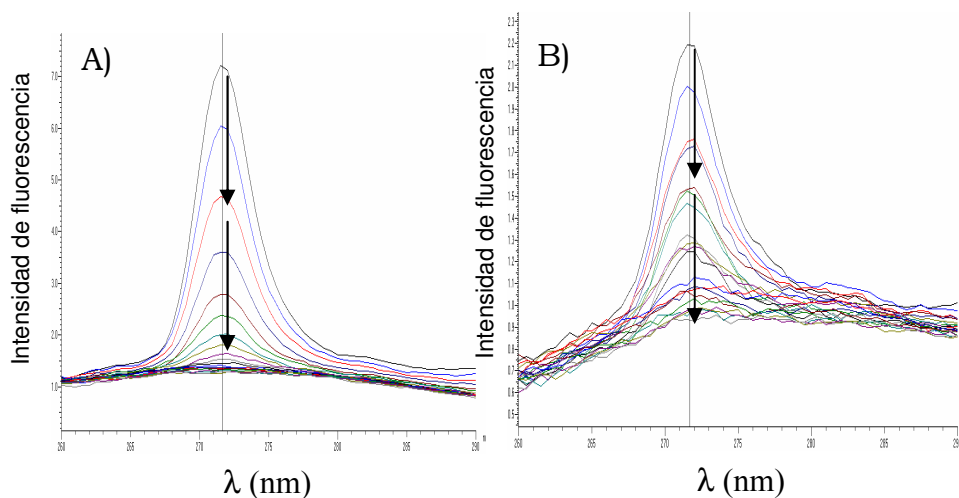


Figura IV. 21.- Variación de la intensidad de fluorescencia mediante espectrofotómetro de fluorescencia sincrónica de las medidas de biodegradación en cubeta de pireno a  $53.4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  y en ausencia (A) y presencia (B) de  $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos. Las flechas indican el descenso en intensidad con el tiempo debido al proceso de biodegradación.

Las concentraciones correspondientes a estas intensidades de fluorescencia se representan en la Figura IV. 22. Estas concentraciones se estimaron aplicando los factores internos (apartado III.8.3) a las intensidades de fluorescencia para conseguir la conversión adecuada.

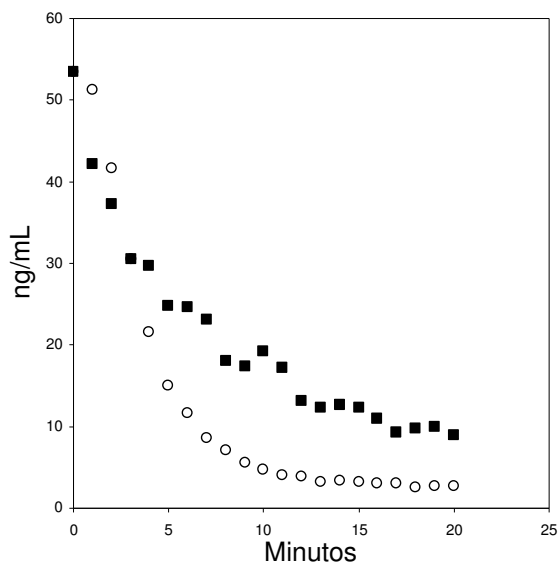


Figura IV. 22.- Medidas de pireno disuelto en  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante la biodegradación de una disolución de medio de mineralización (MM) con una concentración de  $53.4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  en cubeta de espectrofluorímetro sincrónico en ciclos de 20 minutos. Los símbolos representan: (○) control y (■) en presencia de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos de Santa Olalla.

Examinando las concentraciones del experimento de biodegradación por debajo de la solubilidad del pireno (casi tres veces más pequeña), resultó que en presencia de ácidos húmicos se produjo una inhibición siendo la tasa de desaparición del pireno  $0.71 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  mientras que para el control fue de  $1.54 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ . Esto pudo ser debido a que el pireno se adsorbiera rápidamente a los ácidos húmicos disueltos, de tal forma que al añadir después las bacterias, éstas tuvieron que competir por el pireno unido a los ácidos húmicos limitando la biodegradación. Esta situación fue parecida a la situación con dopaje pasivo (Figura IV.18.C), en ambos casos la concentración en disolución fue por debajo de la solubilidad (en un orden aproximado de casi 3 veces por debajo de la solubilidad de pireno) y en ambos casos se obtuvo una inhibición de la biodegradación de pireno en presencia de ácidos húmicos.

# CAPÍTULO V

## *Discusión*

- *“El científico encuentra su recompensa en lo que Henri Poincaré llama el placer de la comprensión, y no en las posibilidades de aplicación que cualquier descubrimiento pueda conllevar”.*

**Albert Einstein**  
(1879-1955).



## **V.1. FERTILIZACIÓN DIRIGIDA DE LA INTERFASE NAPL/AGUA MEDIANTE FERTILIZANTES OLEOFÍLICOS**

La presencia de una cinética lineal en la mineralización de HAPs del fuel es consistente con una biodisponibilidad limitada. Además, las medidas de tasas de reparto de fenantreno, utilizado como representante de los HAPs, en ausencia del bioestimulante oleofílico, dieron valores que no tenían diferencias significativas con respecto a las tasas de mineralización. Por lo tanto, se puede concluir que la transferencia de masa hacia la fase acuosa fue el paso limitante principal para la biodegradación de los HAPs. Sin embargo, la mejora en la biodegradación observada en presencia del bioestimulante oleofílico no fue el resultado de un aumento en la tasa de reparto, según lo revelado por estimaciones independientes en ausencia de bacterias (Tabla IV. 3). La mejora no fue causada por la compensación de una deficiencia nutricional en el medio, ya que las cantidades adicionales de N y P aportados por la baja concentración de bioestimulante presente no fueron significativos (0.4% y 0.003% de N y P respectivamente), en comparación con los que ya estaban presentes en exceso en la solución de sales minerales utilizadas. La naturaleza oleofílica del bioestimulante sugiere además que el aumento fue causado por un enriquecimiento localizado de nutrientes (N y P) en la interfase de NAPL/fase acuosa que promovió el crecimiento de bacterias adheridas, lo que dio como resultado mayores tasas de biodegradación de HAPs de lo previsto por reparto abiótico. El apoyo adicional para saber que existió una fertilización en la interfase, siendo ésta fertilización dirigida la causa de la mejora de la biodegradación, fue dado por:

- La degradación de los n-alcenos, sólo en presencia de bioestimulante oleofílico y el grado más alto de degradación de los componentes de cadena larga (C21-C29), con una alta afinidad por el NAPL (Efroymsen y Alexander, 1995).

- El aumento (10 veces) de la producción de metabolitos desde vías de producción conocidas (metil ftalatos) en presencia del fertilizante.
- La dependencia del efecto de la mejora de la biodegradación con urea en presencia de un tensioactivo (Brij 35). En este último caso, el tensioactivo muy probablemente se repartió en el NAPL y finalmente facilitó, a través de interacciones con su parte hidrófila, la asociación de la fuente de nitrógeno con la interfase NAPL/agua.

El cambio observado en la cinética de biodegradación del fuel de orden cero a una cinética logística ("en forma de S") causada por el bioestimulante (Figura IV.1) también fue consecuente con la promoción del crecimiento bacteriano en la interfase NAPL/agua. La cinética logística ha sido observada comúnmente en estudios de biodegradación de compuestos orgánicos disueltos como único componente en NAPLs, y la cinética de esto se atribuye a bacterias adheridas (Ortega-Calvo y Alexander, 1994; Law y Aitken, 2003). En este estudio, el fenantreno inicialmente disuelto en HD, HMN y DEHP también fue mineralizado siguiendo una cinética logística y alcanzó tasas máximas superiores a las tasas de reparto (Tabla IV. 4), confirmando los resultados anteriores. El efecto del bioestimulante oleofílico sólo se observó en las etapas iniciales de la mineralización de fenantreno disuelto en HD como único componente y NAPL biodegradable, y fue más importante con NAPLs no biodegradables (HMN y DEHP), posiblemente como resultado de la mejora en la tasa de reparto (Tabla IV. 2). Estas observaciones indicaron que el fuel reacciona de manera muy diferente a la estudiada con NAPLs como único componente ante la fertilización de la interfase.

Los resultados pueden ser explicados postulando la existencia de limitaciones nutricionales en la interfase NAPL/agua causada por los componentes del fuel. Estas limitaciones restringen el crecimiento de las bacterias adheridas al fuel, a menos que la fertilización se realizara en

la interfase causando la cinética logística y una mayor mineralización frente al reparto. La causa exacta de estas limitaciones nutricionales se desconoce, pero puede implicar una biodegradación simultánea de sustratos presentes en el fuel (PAHs, sus alquil-derivados y alcanos) por bacterias adheridas. La utilización eficiente de estas fuentes múltiples de carbono pudo haber causado una mayor demanda de biodegradación de N y P que cuando se produjo la biodegradación en NAPLs como único componente, donde sólo uno o dos fuentes de carbono se consumieron al mismo tiempo. De acuerdo con este mecanismo, la mayor demanda de nutrientes por las bacterias adheridas al fuel se suplió con la fertilización en la interfase, pero no por la difusión de las fuentes inorgánicas de N y P en la fase acuosa ya presentes en la solución mineral. Como alternativa al suministro de nutrientes en la interfase, los componentes del bioestimulante (ácidos grasos y tensioactivos) pudieron mejorar la biodegradación por la disminución de la viscosidad del NAPL y, por lo tanto mejorar la difusión del HAP dentro del NAPL, lo que facilitó el crecimiento de bacterias degradadoras en la interfase NAPL/agua. Sin embargo, varios indicios experimentales demostraron que esta explicación alternativa de los resultados es poco probable: (1) la ausencia del efecto sobre las tasas de reparto por el bioestimulante [un aumento que se podía esperar en el caso de una disminución de la viscosidad del NAPL (Chen y col., 1994), (2) la incapacidad de los ácidos grasos (ácido oleico) para promover la biodegradación a un COT comparable, y (3) el efecto limitado del bioestimulante en mediciones directas de la viscosidad del NAPL.

Durante la degradación de mezclas complejas de HAPs, una porción variable de los compuestos originales empobrecidos se transformaron en metabolitos parcialmente oxidados que se acumulan en el medio como resultado de procesos de degradación cometabólica o incompleta (Lopez y col., 2008; Vila y Grifoll, 2009). En este caso, la mejora de la biodegradación por el fertilizante oleofílico fue acompañado de una mayor producción y acumulación de metabolitos ácidos y neutros en la fase acuosa, algunos de los cuales no habían

sido identificados previamente en los estudios de biodegradación con mezclas de petróleo. Esta mayor producción de hidrocarburos aromáticos policíclicos parcialmente oxidados, algunos de los cuales son metabolitos intermedios resultantes de las reacciones bacterianas del consumo de carbono (como ácidos ftálicos), también fue consecuente con el aumento del crecimiento de bacterias en presencia del bioestimulante. Además, se demostró que la biodegradación mejorada producida por el bioestimulante pudo ir acompañada de compuestos polares que se repartieron en la fase acuosa, siendo más móvil y biodisponible que los productos originales.

En resumen, los datos mostraron que la fertilización de la interfase fue un mecanismo eficaz para mejorar la biodegradación de HAPs disueltos en NAPLs cuando se presentó en mezclas complejas, como fuel. Este estudio ofrece, evidenciando experimentalmente la mejora del metabolismo de las bacterias en la superficie de mezclas de fuel, nuevos conocimientos sobre las causas de la persistencia de NAPLs asociados a productos químicos y el mecanismo por el cual el bioestimulante oleofílico promueve la biodegradación de hidrocarburos del petróleo. Lo mismo cabría decir de la biorremediación de NAPLs en el subsuelo como fuentes de contaminantes, que a menudo es limitada por la lenta cinética de reparto en la fase acuosa. Determinar los efectos de la fertilización en las tasas de crecimiento de bacterias adheridas a la interfase NAPL/agua es esencial a fin de elaborar estrategias prácticas de bioestimulación, y esto será objeto de futuras investigaciones.



## **V. 2. EFECTO ECOFISIOLÓGICO DE LA RIZOSFERA DEL GIRASOL SOBRE LA ACCESIBILIDAD MICROBIANA DE HAPs**

Los resultados muestran claramente un efecto positivo del crecimiento de girasol sobre la desaparición de los compuestos orgánicos del suelo contaminado con creosota en el experimento de invernadero. En la Tabla IV. 6 se puede apreciar que el peso seco de la planta completa es 1.46 veces mayor en el suelo contaminado, por lo que se encuentra bien adaptada a la concentración inicial de de contaminantes ( $21.75 \pm 0.9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de HAPs iniciales totales, ver Tabla IV. 7) y el buen desarrollo radicular mostrado en la Figura IV.11. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por (Chaineau y col., 1997), quienes trabajaron con varias especies para comprobar la resistencia de estas plantas ante la contaminación con fuel, siendo el girasol la especie más resistente. (Huang y col., 2004) sugieren que el PGPR (crecimiento de la planta a través de rizobacterias) es la razón por el que las plantas pueden sobrevivir y desarrollarse en suelos contaminados con creosota, aumentando así la efectividad del proceso de fitorremediación.

Por otro lado, el girasol tiene una serie de valores añadidos de gran interés actualmente ya que, como se ha indicado anteriormente, aparte del uso tradicional de su aceite para la alimentación, se usa para la obtención de biocombustible (Tavares y col , 2011); Bazooyar y col., 2011) y sus cenizas como fertilizante en agricultura debido a su alto contenido en potasio (Zuen y Tianyi, 1986; Helmy y Ramadan, 2009).

Durante el experimento en invernadero se pudo conocer la influencia de la rizosfera del girasol sobre la eliminación de los HAPs pertenecientes al suelo contaminado con creosota, observando una mayor influencia para fluoreno, antraceno, fluoranteno, pireno y criseno a los 45 días (Tabla IV. 7). En esta experiencia se consiguió un mayor efecto de eliminación

de estos 5 HAPs en comparación con el control donde no había planta.

En la Figura IV. 12 se muestra que el suelo utilizado en invernadero es altamente enriquecido en degradadores de HAPs. La población heterótrofa aumentó en más de dos órdenes de magnitud entre los 0 y 45 días en todos los tratamientos, lo que indicó que la homogeneización, aireación y el riego de los suelos contaminados con creosota tuvieron un efecto general de activación en el crecimiento de estas poblaciones. La población degradadora de compuestos de alto peso molecular (APM) aumentó en número en presencia de girasol comparado con el control, demostrando de esta forma la influencia selectiva de la rizosfera de girasol en el aumento de estas poblaciones capaces de degradar a los contaminantes en estudio. Autores como (Parrish y col., 2005) también observaron que tras 12 meses de desarrollo de la planta, las poblaciones degradadoras de HAPs se multiplicaron 100 veces frente a los tratamientos sin planta. (Corgie y col., 2004), encontraron que el número de bacterias degradadoras de HAPs disminuían a medida que se alejaban de las raíces de la plantas, de esta manera se puede explicar las diferencias entre suelo rizosférico y no rizosférico mediante el *efecto de la rizosfera*.

En la Figura IV. 13 se resumen las abundancias relativas de los diferentes grupos filogenéticos detectados en el suelo con creosota sin planta. Las dos terceras partes (60 y 68%) de las bacterias encontradas en ambos tratamientos (con y sin planta) pertenecieron a  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ -*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Cloroflexi*, variando sustancialmente la abundancia relativa de cada grupo con el tratamiento. La mayoría de las bacterias detectadas fueron gram-negativas (97.56% en presencia del girasol frente a un 79.15% del control), concordando estos resultados con estudios previos (Anderson y Coats, 1995), donde afirman que la mayor parte de las bacterias rizosféricas son gram-negativas. También, Joner y Leyval (2003) afirmaron que los exudados de raíces podían modificar la composición microbiana y aumentar su actividad. Se obtuvo una mayor

abundancia relativa de las  $\alpha$  y  $\beta$ -*Proteobacterias* en presencia de los exudados de las raíces de girasol debido a que toman fácilmente el carbón procedente de los azúcares y residuos de la planta (Fierer y Jackson, 2006; Bernard y col., 2007). Mientras que la abundancia de Planctomicetes junto a la División candidata OD1, OP11, TM7 y WS6, disminuyeron llegando a ser incluso indetectables como les ocurrió a Bernard y col., (2007) aunque ellos también detectaron una disminución de los grupos pertenecientes a *Actinobacteria*, *Cianobacteria*, *Gemmatimonadetes* y *Verrucomicrobia*, lo que nos indicó la gran variabilidad existente entre el comportamiento microbiano y la planta seleccionada para el estudio de rizorremediación.

Los HAPs fueron generalmente degradados por  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -*Proteobacteria* y también por bacterias gram positivas como *Actinobacteria*, siendo  $\beta$ -*Proteobacteria* un ejemplo claro de microorganismos que prevalecen en un ambiente rico en HAPs (Fierer y col. , 2007a; Fierer y col. , 2007b).

Aunque la abundancia relativa del grupo *Actinobacteria* no cambia en presencia de girasol, se conoce que es un grupo caracterizado por su habilidad para degradar compuestos orgánicos recalcitrantes, como por ejemplo, *Actinomicetes* que puede competir con los hongos para la degradación de la lignina (de Boer y col., 2005) y *Mycobacteria* que puede degradar HAPs especialmente en lugares donde hay un bajo nivel de nutrientes (Uyttebroek y col. , 2006).

El grupo *Acidobacteria* normalmente se encuentra en suelos originales, siendo este grupo el más abundante de todos los grupos filogenéticos, y suele disminuir cuando se añaden HAPs al suelo (Yrjala y col., 2010). En la Figura IV. 13 se aprecia una mayor abundancia relativa de este grupo en presencia de girasol, lo que garantiza que el suelo tenga una menor proporción de HAPs gracias al *efecto de la rizosfera*. Algo parecido se observó en el caso del grupo Bacteroidetes, que disminuyó en presencia de la rizosfera de girasol, probablemente debido a que esta especie normalmente se encuentra en mayor proporción en suelos no enriquecidos o

faltos de nutrientes (Vinas y col. , 2005) como es el caso de un suelo contaminado con creosota.

El conocimiento del efecto producido por los exudados de las raíces de girasol sobre la concentración residual de HAPs (procedentes del suelo con creosota) tanto en invernadero como en los experimentos realizados en paralelo a los respirométricos en laboratorio, proporciona información sobre la accesibilidad microbiana de los HAPs. Existen algunos casos descritos en que los exudados de raíces son capaces de solubilizar el contaminante haciéndolo más accesible a la degradación bacteriana o activando rutas de degradación del contaminante (Miya y Firestone, 2000; Kamath y col., 2004). Con las técnicas de reparto empleando polidimetilsiloxano, se pudo comprobar que los exudados obtenidos de las raíces de girasol *in vitro*, no tenían propiedades de difundir ni de solubilizar estos contaminantes para aumentar la bioaccesibilidad tal y como vieron Mayer y col., (2007) al estudiar la influencia de exudados de sauce con un COT igual a  $483 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en la difusión de una mezcla de HAPs. Es necesario indicar que el experimento de difusión con exudados de raíz de girasol se realizó con un COT igual a  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y se obtuvo una difusión de los HAPs parecidos a los resultados que obtuvo Mayer, por lo que no se puede excluir que un aumento del COT de los exudados de las raíces de girasol dentro de una película acuosa en la superficie de la raíz pueden afectar la transferencia de masa por difusión de los HAPs estudiados. Los exudados de raíces de girasol obtenidos *in vitro* presentaron una tensión superficial cercana a la tensión superficial del medio de mineralización (MM), evidenciando la ausencia de tensioactivos que pudieran mejorar la accesibilidad (Garcia-Junco y col., 2001). Es importante decir, que la producción de exudados de raíces de girasol *in vitro* puede alterar la composición y cantidad de los mismos comparados con los excretados por las raíces que crecen en el suelo. Por ejemplo, las raíces que se desarrollan en condiciones normales en el suelo, a medida que avanza la raíz, se produce desprendimiento de mucílago y restos de la misma, los cuales son sustancias orgánicas que junto a los exudados forman parte de la rizodeposición (Grayston y col.,

1996). Este efecto y, en consecuencia, estas sustancias no están presentes en los exudados obtenidos *in vitro*. Por otro lado, se conoce un aumento de la creación de exudados en presencia de contaminante y también en presencia de microorganismos (Anderson y Coats, 1995). Aún así, mediante la obtención y análisis de los exudados *in vitro* podemos conocer el efecto de los componentes químicos excretados exclusivamente por las raíces, sobre la biodegradación de HAPs. Dentro de los compuestos pertenecientes a la composición de los exudados de girasol (Tabla IV.6), se incluyen hidratos de carbono como la glucosa y fructosa que proporcionan un entorno favorable para el crecimiento de microorganismos (Grayston y col., 1996; Bertin y col., 2003), además de que presentan un efecto quimiotáctico positivo para los mismos (Reinhold y col., 1985). Los exudados de raíz pueden ser una fuente de compuestos nitrogenados fácilmente degradables como aminoácidos y péptidos pequeños capaces de inducir síntesis de proteasas (García-Gil y col., 2004). La glutamina, ácido aspártico e isoleucina poseen un efecto quimiotáctico positivo de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium japonicum* (Pandya y col., 1999). En relación a los ácidos grasos presentes en la mayoría de los exudados de plantas, (Yi y Crowley, 2007) investigaron la degradación de pireno y benzo(a)pireno en presencia de raíces de plantas que eran ricas en ácido linoleico (tanto las raíces de apio trituradas como el cultivo de esta planta en suelos contaminados) aunque obtuvieron resultados mejores con la sal de este compuesto, linoleato de sodio. Estos autores propusieron varias hipótesis del modo de acción del ácido linoleico: una de ellas fue que este ácido graso proporciona un enriquecimiento selectivo de las bacterias degradadoras de HAPs y otra hipótesis consistió en que si los ácidos grasos se encontraban a una concentración por encima de la concentración micelar crítica, el pireno podría estar ocluido en las micelas de tal forma que mejoraría su transporte hacia las bacterias degradadoras, aumentando la bioaccesibilidad de este contaminante a ser degradado. Según el estudio de Clapham y col., (2005), el 93% de los ácidos grasos en las células de las plantas derivan de tres ácidos grasos: linoleico (18:2) y linolénico (18:3) que son insaturados y palmítico

(16:0) que es saturado, siendo la concentración de estos ácidos más baja en las variedades de césped. De estos tres ácidos grasos se encuentran presente en los exudados de raíces de girasol el ácido palmítico junto al ácido esteárico (18:0) que es también saturado.

Las estimaciones de bioaccesibilidad se basaron en la determinación de las concentraciones residuales de los HAPs (ensayos de biodegradación de las suspensiones) cuando se redujo el pireno marcado con  $^{14}\text{C}$  en los ensayos respirométricos, ambos ensayos llevados a cabo en paralelo. Este método ha sido aplicado en estudios anteriores (Niqui-Arroyo y Ortega-Calvo, 2010; Bueno-Montes y col., 2011) para determinar la eficiencia de los diseños enfocados a la biorremediación, para aumentar la bioaccesibilidad de HAPs fuertemente retenidos mediante aging y para determinar la naturaleza recalcitrante de los PAHs de fondo en el suelo (Posada-Baquero y Ortega-Calvo, 2011). Curiosamente, los resultados mostraron que las concentraciones de los HAPs iniciales en las suspensiones de suelo, disminuyeron significativamente en presencia de los exudados de girasol (Tabla IV. 8). Esto demuestra la influencia positiva de los exudados en la biodegradación de los HAPs iniciales. Por otra parte, los valores residuales de los HAPs en las suspensiones, con y sin exudados, no fueron estadísticamente diferentes a los alcanzados en los tratamientos correspondientes en invernadero (Tabla IV. 7) para ( $P < 0.05$ ). Podemos resumir diciendo, por tanto, que los efectos producidos por las plantas de girasol en el experimento de invernadero pueden ser reproducidos en el laboratorio mediante la incubación de las suspensiones de suelo contaminado, con agitación y con la adición de los exudados excretados por el girasol.

El efecto positivo sobre la reducción de la concentración de HAPs inicial, tanto en presencia de la raíz de la planta como sólo en presencia de los exudados que excretó esta planta de manera artificial, confirma la no adsorción de los contaminantes a las raíces del girasol y por lo tanto, que la desaparición de estos contaminantes orgánicos no fue debida

a la fijación de estos contaminantes a la superficie de las raíces, sino a un aumento de la accesibilidad microbiana.

Al comparar la gráfica de la biodegradación de suspensiones de suelo contaminado con creosota por microorganismos autóctonos (Figura IV. 14) con la biodegradación de pireno puro por encima de la solubilidad por *Mycobacterium gilvum* VM552 (Figura IV.16.B), se observó que ambas gráficas tienen una cinética logística, existiendo en ambos casos una estimulación de la mineralización en presencia de exudados.

En resumen y analizando los resultados obtenidos, se puede concluir que existió un mayor efecto de eliminación de los contaminantes tanto en presencia de la planta en la experiencia de invernadero como en presencia de los exudados en ensayos de biodegradación en laboratorio. Esto se produjo porque en presencia de la rizosfera de girasol se originó un microcosmos más favorable fisiológicamente para los microorganismos degradadores de los HAPs presentes en la creosota, sin descartar la posibilidad de un aumento de la difusión y solubilización de los contaminantes a un COT de los exudados mayor del que se estudió, que pudiera explicar la bioaccesibilidad en el microcosmos generado por la planta. Por otro lado, los resultados obtenidos de los experimentos de las suspensiones de suelo contaminado y de las experiencias con pireno puro, evidenciaron la importancia de la complejidad de los contaminantes en estudio, existiendo una biodegradación del compuesto puro más acusada que la obtenida por la biodegradación de la suspensión de suelo contaminado con creosota.

### **V.3. PAPEL DE LA ACTIVIDAD QUÍMICA EN EL EFECTO BIOESTIMULANTE DE LOS ÁCIDOS HÚMICOS**

Las tasas de mineralización de fenantreno y pireno variaron dependiendo de la concentración y de la identidad del HAP, así como de la concentración de ácidos húmicos (Tabla

IV. 11). Existieron claras evidencias de que los ácidos húmicos no eran tóxicos para las bacterias, ya que, a concentraciones muy por debajo de la solubilidad de los HAPs en estudio, no afectaron a las velocidades de mineralización. El efecto de los ácidos húmicos para las concentraciones de HAPs por encima de la solubilidad fue, en general, inhibitorio para una concentración de ácidos húmicos de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , excepto para el caso del pireno a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A esta concentración de pireno por encima de su solubilidad hubo estimulación de la mineralización, tanto a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  como a  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácidos húmicos, aunque fue más acusada a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Normalmente en la naturaleza se suelen encontrar concentraciones de carbono orgánico disuelto inferiores a  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  en el agua intersticial del suelo, por lo que una concentración más alta, no sería representativa de una situación natural (Smith y col. , 2009). En base a estos resultados, se demostró una mejora de la mineralización con el compuesto más hidrófobo en presencia de ácidos húmicos, siempre que este compuesto estuviera a unas concentraciones muy por encima de su solubilidad. Por esta razón, se decidió estudiar su comportamiento utilizando ensayos de disolución y ensayos de reparto con polidimetilsiloxano (PDMS).

Mediante los ensayos de reparto con polidimetilsiloxano, se demostró que los ácidos húmicos difundían más lentamente el pireno que el medio acuoso sin ácidos húmicos (Tabla IV. 9, experimento realizado en las microcámaras de PDMS) y además, tenían una mayor capacidad de disolución de este HAP en presencia de ácidos húmicos que en su ausencia (Tabla IV. 10, experimento realizado con dopaje pasivo). El comportamiento de difusión lenta explica la inhibición producida en el ensayo de mineralización utilizando dopaje pasivo (Figura IV.18.C), ya que en ambas situaciones se estudia el gradiente de concentración que pasa de la fase sólida dominante a la disolución.

Estudiando la capacidad de disolución de estos ácidos frente a otros y frente a concentraciones diferentes, se obtuvieron resultados distintos, tal y como estudió Chin y col., (1997), quienes comprobaron que la solubilidad del pireno



cambiaba según la concentración y el tipo de sustancia húmica disuelta (ácidos fúlvicos o ácidos húmicos), siendo mayor la solubilidad para una concentración mayor de ácidos húmicos.

Estas propiedades fueron fundamentales para explicar el modo de actuación de los ácidos húmicos sobre la estimulación observada en la Figura IV.18.A (experimento de mineralización sin dopaje pasivo).

De acuerdo con la teoría de Thomas y col., (1986), dado que los microorganismos no pueden utilizar directamente la forma insoluble del pireno, cabe esperar que el organismo metabolice primero el pireno disuelto, siendo la tasa de mineralización limitada por su tasa de disolución.

Según los resultados obtenidos mediante las técnicas de reparto desde una fase sólida dominante, se demostró que los ácidos húmicos pueden actuar como bioestimulantes de la biodegradación favoreciendo la bioaccesibilidad de los contaminantes orgánicos, como el pireno, debido a una mayor solubilización de estos contaminantes en el medio acuoso además de un aumento de la bioaccesibilidad del pireno unido a los ácidos húmicos para su degradación. Las pruebas de que existió un aumento de la accesibilidad se obtuvieron mediante los ensayos de disolución conociendo la concentración total y la concentración libre en disolución, donde se observó un aumento progresivo de ambas concentraciones en disolución en presencia de ácidos húmicos (Figura IV. 19.A y IV.19.B). Lo más interesante fue que la concentración total fue mayor que la concentración libre de pireno en disolución (Tabla IV. 12). Este hecho indicó que el aumento de la biodegradación de pireno en presencia de ácidos húmicos no fue debida sólo a la concentración libre (al tener una cinética de disolución de pireno muy lenta, Tabla IV. 12, además de una concentración libre baja) sino que además los microorganismos eran capaces de utilizar la concentración total en disolución. De esta manera, la asociación producida por el pireno y los ácidos húmicos hace que los microorganismos degraden pireno mejor, aumentando

la accesibilidad en presencia de ácidos húmicos. Aparentemente, los microorganismos degradan directamente el pireno asociado a los ácidos húmicos. Numerosos estudios que utilizan tensioactivos artificiales no tóxicos o tensioactivos naturales, han demostrado que se obtienen unas tasas de degradación más altas que las esperadas para los compuestos en disolución y sugieren que una fracción de los HAPs asociados a las micelas es directamente biodisponible para las células bacterianas, sin necesidad de que se produzca una desorción de los compuestos en disolución (Guha y Jaffe, 1996; Brown, 2007). Existen otros estudios (Ortega-Calvo y Saiz-Jimenez, 1998; Haftka y col., 2008) que aportan otro punto de vista, como que los ácidos húmicos pueden actuar como transportadores de los HAPs evaluando el impacto de las fracciones húmicas derivadas de sedimentos y del suelo sobre la captación y mineralización de HAPs mediante microorganismos degradadores de HAPs. Estos autores observaron que aunque los HAPs se adsorben a la materia orgánica disuelta, existiendo menos concentración disponible en la fase acuosa, la mineralización aumenta de tal forma que la materia orgánica disuelta ha actuado como transportador del HAPs hacia las células de las bacterias degradadoras.

Con los ensayos de disolución del pireno en presencia de la fase sólida dominante, se obtuvieron tanto las tasas de disolución de la concentración total de pireno en disolución como la concentración total en el equilibrio, en presencia y ausencia de los ácidos húmicos (resultados recogidos en la Tabla IV. 4). Los datos obtenidos de estos ensayos concordaron con los resultados obtenidos de la técnica de difusión utilizando microcámaras compuestas de PDMS y de la medida de la capacidad de solubilización mediante dopaje pasivo. Contrastando estas experiencias, se concluyó a que los ácidos húmicos ralentizaban la difusión de los HAPs mientras que aumentaban su capacidad de disolución con respecto a la disolución acuosa tomada como control. Utilizando la fase sólida dominante, se controló la concentración libre disuelta de pireno, por lo que fue la misma concentración tanto en presencia como en ausencia de ácidos húmicos. Este control

fue debido gracias al proceso de reparto conocido como “partitioning driven administering” (PDA, Figura I.6).

La combinación de los ensayos de disolución junto a los ensayos de biodegradación desarrollando técnicas analíticas para la determinación de la concentración libre y la concentración total de pireno en disolución, resultó una buena herramienta para la comprensión de los mecanismos implicados en la accesibilidad microbiana de este tipo de contaminantes en presencia de materia orgánica disuelta en el medio, como los ácidos húmicos. A su vez, el desarrollo de técnicas de fluorescencia para medir concentraciones de pireno libres en disoluciones acuosas, permitieron conocer la evolución de estas concentraciones de pireno en disolución durante su biodegradación. En estos ensayos de disolución durante la biodegradación, también se observó una estimulación en presencia de ácidos húmicos (Figura IV. 20), obteniéndose una concentración de pireno libre disuelto residual menor en presencia de ácidos húmicos que con el control. Además, estas técnicas de fluorescencia sincrónica se desarrollaron para medir todo el proceso de biodegradación en la cubeta del espectrofotómetro (Figura IV. 21 y IV. 22) en presencia o ausencia de ácidos húmicos.

#### **V.4. VISIÓN GENERAL Y COMPARACIÓN ENTRE LOS BIOESTIMULANTES UTILIZADOS**

El trabajo de investigación que se resume en esta Memoria de Tesis Doctoral, se ha centrado básicamente en conocer los mecanismos de actuación de bioestimulantes relacionados con la bioaccesibilidad de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs). Para este fin, se utilizaron tres tipos de bioestimulantes: S-200, raíces de girasol y ácidos húmicos.

A menudo, es necesario utilizar un tratamiento diferente dependiendo de las características del medio a descontaminar. Según (Aprill y col., 1990) lo primero que se debe hacer ante un emplazamiento contaminado, es un estudio de tratabilidad

para evaluar los procesos de descontaminación y degradación que afectan al destino y comportamiento de contaminantes peligrosos. Estos estudios de tratabilidad pueden proporcionar información específica, como conocer la migración (lixiviación) de los contaminantes o evaluar diferentes enfoques para el tratamiento. Con esta información, se puede conocer si un tratamiento biológico es adecuado para la descontaminación de un emplazamiento. Mediante los estudios de tratabilidad, además se puede conocer las poblaciones microbianas degradadoras del contaminante, así como los diferentes parámetros físico-químicos y biológicos que condicionan el proceso de biorremediación. Una vez conocidos todos los factores que pueden limitar la biorremediación, ya se puede implementar la tecnología más adecuada.

La información derivada de los resultados de esta Tesis Doctoral proporciona una serie de ideas influyentes a la hora de realizar un tratamiento mediante bioestimulación. Por ejemplo, del **fertilizante oleofílico S-200**, se conoce su eficacia en vertidos marinos (Diez y col., 2005; Gallego y col., 2006b; Jimenez, 2006; Gallego y col., 2007) pero en ninguno de los estudios citados se ha demostrado cómo se produce el aumento de la biodegradación de los HAPs presentes en el fuel, en presencia del fertilizante oleofílico. Se asume que es por un aporte de nutrientes. El estudio de la acción del S-200, es lo que se aporta de nuevo en esta Tesis Doctoral, puede tener implicaciones no sólo para el tratamiento de vertidos marinos sino también en otras situaciones de contaminación por NAPLs. Sin contribuir con un aporte significativo de nutrientes, se ha demostrado que la acción de este bioestimulante fue una fertilización dirigida a la interfase NAPL/fase acuosa, donde los microorganismos son capaces de biodegradar el contaminante más rápidamente debido a una mejora de la accesibilidad.

Las **raíces de girasol**, se han utilizado para la descontaminación tanto de productos procedentes de la industria farmacéutica (Gujarathi y col., 2005), como de metales pesados (Kim, 2010; Kim y col., 2010) y para fitorremediación de HAPs (Olson y col., 2007). Lo novedoso de

este estudio, es la relación existente entre los microorganismos autóctonos de un suelo contaminado con creosota y las raíces de girasol, siendo una relación de simbiosis donde ambas partes resultaron beneficiadas. Se observó en la experiencia de rizodegradación en invernadero un claro efecto ecofisiológico de los exudados sobre la población bacteriana autóctona, enriqueciendo selectivamente las poblaciones degradadoras de HAPs. Destacar los valores residuales de HAPs, significativamente parecidos entre la experiencia de invernadero en la rizosfera de girasol y la obtenida en laboratorio mediante suspensiones en presencia de exudados de la planta. Este hecho evidenció la clara influencia de los exudados sobre la desaparición de estos contaminantes, mediante un aumento de la accesibilidad por acción de estos exudados. Sin descartar que este aumento de la bioaccesibilidad fuera debido a una difusión o solubilización de los contaminantes siempre que COT fuera mayor que el obtenido por la producción artificial de exudados.

En cuanto a los **ácidos húmicos**, existen numerosos estudios acerca de su influencia sobre la biodegradación de HAPs, ya sean estudiando su modo de acción como única fuente de materia orgánica disuelta (Engebretson y Vonwandruszka, 1994; Chin y col., 1997; Smith y col., 2009), asociados a arcillas (Ortega-Calvo y col., 1997; Lahlou, 1999; Ortega-Calvo y Saiz-Jmenez, 1998) o ambos casos (Laor y col., 1999). Los datos expuestos en esta Tesis Doctoral, explican el mecanismo de estas sustancias y su modo de actuación tanto como bioestimulantes, cuando actúan como transportadores de los contaminantes, mejorando la accesibilidad de los contaminantes orgánicos, como de inhibidores cuando retienen estos contaminantes, de tal forma que disminuyen las tasas de biodegradación. Lo novedoso de este estudio fue compaginar ensayos de biodegradación con técnicas de dopaje pasivo porque, hasta la fecha, no se han encontrado estudios que lo hayan hecho. Sólo ter Laak y col., (2009) diseñaron un sistema parecido al dopaje pasivo para conocer la acumulación de contaminantes en el tejido de lombrices controlando la concentración libre disuelta del HAPs en estudio. De este modo, pudo comprenderse el mecanismo del

transporte de los contaminantes entre organismos acuáticos (como la lombriz) y el medio que le rodea. Otro contrapunto novedoso, en esta Tesis Doctoral, es el estudio de la concentración libre disuelta de pireno durante su biodegradación en presencia y ausencia de ácidos húmicos. Para este fin, se puso a punto una técnica poco utilizada en biodegradación, la espectrometría de fluorescencia sincrónica, donde se pudo observar la variación de la intensidad de fluorescencia a medida que el compuesto fue biodegradado. Esta técnica fue utilizada por Ortega-Calvo y Gschwend, (2010) para medir continuamente la biodegradación de pireno en presencia de *Mycobacterium gilvum* VM552, pero no presentó la variación de la intensidad de fluorescencia como exponemos en esta Tesis.

Es importante destacar, que mediante el estudio de la cinéticas de biodegradación utilizando sistemas modelo, se pudieron obtener conclusiones de cómo afectaba cada bioestimulante sobre la población bacteriana. En el caso del S-200, la cinética fue logística indicando una mayor colonización en la interfase tanto en la fase orgánica pura (HMN, HD y DEHP) como para el fuel. El mismo tipo de cinética se presentó en la mineralización de los HAPs presentes en la creosota en presencia de exudados, indicando en este caso, un crecimiento bacteriano originado por los componentes de los exudados. Sólo en los estudios de mineralización de pireno por debajo de su solubilidad bajo la influencia de los exudados de girasol y en los estudios de mineralización de pireno y fenantreno en presencia de ácidos húmicos, se observó una cinética de primer orden. Esta cinética de primer orden, indicó que existían limitaciones nutricionales para los microorganismos.

Comparando los tres bioestimulantes empleados, se puede decir, que si el emplazamiento a descontaminar tiene una población bacteriana con un buen potencial metabólico para transformar los HAPs en sustancias menos nocivas, se puede utilizar tanto S-200 como raíces de girasol, pero en todos los casos habría que estudiar el efecto de la materia orgánica presente, ya sea en forma de sustancias húmicas u

otro aporte de compuestos orgánicos diferentes como los componentes orgánicos (ácidos grasos) de los exudados en el caso de las plantas. En el caso de que el emplazamiento a descontaminar fuera rocoso, la presencia de materia orgánica y el desarrollo de las plantas sería complicado. Por esta causa, en este tipo de ambientes, sería una mejor elección el empleo de fertilizantes oleofílicos.

El estudio de estos tres bioestimulantes en las experiencias desarrolladas en laboratorio puede ayudar a la hora de desarrollar nuevas técnicas de biorremediación a gran escala, debido a la resolución de los posibles problemas que se pueden plantear cuando se realizan este tipo de técnicas en emplazamientos contaminados con HAPs.





# CAPÍTULO VI

## *Conclusiones*

- *“Dejamos de temer  
aquello que se ha  
aprendido a entender”.*

**Marie Curie**  
(1867-1934).



Las conclusiones más importantes obtenidas tras el desarrollo de esta Tesis Doctoral centrada en la influencia de bioestimulantes sobre la accesibilidad microbiana de hidrocarburos aromáticos policíclicos, se exponen a continuación:

**Primera:** Los resultados obtenidos en los ensayos de biodegradación con el fertilizante oleofílico S-200 mostraron que existe mayor velocidad de desaparición y porcentaje de mineralización final en todos los HAPs estudiados.

**Segunda:** Las propiedades de los NAPLs utilizados influyeron tanto en el porcentaje de mineralización, como en la velocidad máxima de desaparición y en la tasa de reparto. Cuanto más viscoso, menos soluble es el NAPL y menor será la difusión del HAP presente del NAPL a la fase acuosa donde la bacteria degradadora puede asimilar estos compuestos.

**Tercera:** Las tasas de reparto de fenantreno presente en el fuel pesado con S-200 no varían significativamente con respecto a las tasas de reparto sin S-200, por lo que el fertilizante oleofílico no interfiere en el reparto de los HAPs del NAPL a la fase acuosa.

**Cuarta:** El efecto que causa el S-200 sobre la biodegradación de fuel es la proliferación de los microorganismos degradadores de HAPs en la interfase, probablemente debido a un efecto combinado de aumento de concentración local de nutrientes (P, N), más la eliminación de efectos tóxicos de los componentes del fuel en la interfase.

**Quinta:** El sistema *in vitro* puesto a punto para la producción artificial de exudados, permitió la caracterización de los procesos fisico-químicos y biológicos en la rizosfera del girasol.

**Sexta:** Se diseñó una experiencia piloto en invernadero para controlar la fitorremediación de un suelo contaminado con cresota, utilizando girasoles como plantas

fitorremediadoras. Las plantas desarrollaron un habitat más favorable en la rizosfera para la mejora de la biodegradación de los contaminantes presentes en el suelo. Se comprobó que esta mejora fue debida a la influencia fisico-química de los exudados sobre las poblaciones degradadoras autóctonas, sin descartar la posible influencia de los exudados para promover la difusión y solubilización de los HAPs.

**Séptima:** La semejanza entre el microcosmo originado en los ensayos con suspensiones de suelo con creosota, junto al microcosmos generado en la experiencia piloto en invernadero, verificaron una mayor bioaccesibilidad de los HAPs en presencia de los exudados de raíces de girasol. Las fracciones residuales de los HAPs al final de ambos tratamientos, coincidieron y fueron menores en presencia de exudados comparado con el control.

**Octava:** Los datos proporcionados de los experimentos de mineralización en presencia de ácidos húmicos, mostraron comportamientos diferentes. Bioestimulación cuando el HAP en estudio era más hidrófobo y se encontraba a una concentración muy por encima de su solubilidad. Inhibición en los demás casos estudiados.

**Novena:** Los ensayos de disolución combinando diferentes técnicas analíticas (fluorescencia sincrónica y centelleo líquido) fueron muy útiles para discernir entre la concentración total y la concentración libre de pireno en disolución en presencia y ausencia de ácidos húmicos.

**Décima:** Las técnicas con dopaje pasivo empleadas tanto en los ensayos de mineralización como en los ensayos de disolución, fueron un buen complemento para conocer el mecanismo de actuación de los ácidos húmicos sobre la accesibilidad microbiana de pireno.

**Undécima:** El desarrollo de la técnica analítica de espectrometría de fluorescencia sincrónica, permitió conocer cómo fue la evolución de desaparición del contaminante

durante su biodegradación, sin necesidad de alterar la muestra durante el muestreo.



# CAPÍTULO VII

## *Bibliografía*

- *“Un experto es aquel que ya ha cometido todos los errores posibles en una materia muy concreta”.*

**Niels Henrik David Bohr**  
(1885-1962).





Aceves, M., Grimalt, J.O., 1993. Seasonally dependent size distributions of aliphatic and polycyclic aromatic-hydrocarbons in urban aerosols from densely populated areas. *Environmental Science & Technology* 27, 2896-2908.

Akkanen, J., Lyytikäinen, M., Tuikka, A., Kukkonen, J.V.K., 2005. Dissolved organic matter in pore water of freshwater sediments: Effects of separation procedure on quantity, quality and functionality. *Chemosphere* 60, 1608-1615.

Alexander, M., 1999. *Biodegradation and bioremediation*, Second Edition ed. Academic Press: San Diego, CA.

Alexander, M., 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science & Technology* 34, 4259-4265.

Amador, J.A., Alexander, M., 1988. Effect of humic acids on the mineralization of low concentrations of organic-compounds. *Soil Biology & Biochemistry* 20, 185-191.

Anderson, T.A., Guthrie, E.A., Walton, B.T., 1993. Bioremediation in the rhizosphere. *Environmental Science & Technology* 27, 2630-2636.

Anderson, T.A., Coats, J.R., 1995. An overview of microbial degradation in the rhizosphere and its implications for bioremediation, *Bioremediation: Science and Applications*, pp. 135-143.

Aprill, W., Sims, R.C., 1990. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* 20, 253-265.

Aprill, W., Sims, R.C., Sims, J.L., Matthews, J.E., 1990. Assessing detoxification and degradation of wood preserving and petroleum wastes in contaminated soil. *Waste Management & Research* 8, 45-65.

Arfsten, D.P., Schaeffer, D.J., Mulveny, D.C., 1996. The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic

hydrocarbons in animals and plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 33, 1-24.

Atlas, R.M., 1995. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin* 31, 178-182.

ATSDR (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades). 1995. Reseña toxicológica de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Departamento de Salud y Servicios Humanos de los E.E.U.U., Atlanta, GA.

Bamforth, S.M., Singleton, I., 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 80, 723-736.

Banks, M.K., Lee, E., Schwab, A.P., 1999. Evaluation of dissipation mechanisms for benzo[a]pyrene in the rhizosphere of tall fescue. *Journal of Environmental Quality* 28, 294-298.

Bernard, L., Mougél, C., Maron, P.A., Nowak, V., Leveque, J., Henault, C., Haichar, F.e.Z., Berge, O., Marol, C., Balesdent, J., Gibiat, F., Lemanceau, P., Ranjard, L., 2007. Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from C-13-labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environmental Microbiology* 9, 752-764.

Berrios, E.F., Gentzbittel, L., Alibert, G., Griveau, Y., Berville, A., Sarrafi, A., 1999. Genetic control of in vitro-organogenesis in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Plant Breeding* 118, 359-361.

Bertin, C., Yang, X.H., Weston, L.A., 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil* 256, 67-83.

Binet, P., Portal, J.M., Leyval, C., 2000. Dissipation of 3-6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 2011-2017.

Birch, H., Gouliarmou, V., Lutzhoft, H.C.H., Mikkelsen, P.S., Mayer, P., 2010. Passive Dosing to Determine the Speciation of

Hydrophobic Organic Chemicals in Aqueous Samples. Analytical Chemistry 82, 1142-1146.

Birman, I., Alexander, M., 1996. Effect of viscosity of nonaqueous-phase liquids (NAPLs) on biodegradation of NAPL constituents. Environmental Toxicology and Chemistry 15, 1683-1686.

Brown, D.G., 2007. Relationship between micellar and hemimicellar processes and the bioavailability of surfactant-solubilized hydrophobic organic compounds. Environmental Science & Technology 41, 1194-1199.

Bueno-Montes, M., Springael, D., Ortega-Calvo, J.J., 2011. Effect of a Nonionic Surfactant on Biodegradation of Slowly Desorbing PAHs in Contaminated Soils. Environmental Science & Technology 45, 3019-3026.

Cao, M.X., Huang, J.Q., He, Y.L., Liu, S.J., Wang, C.L., Jiang, W.Z., Wei, Z.M., 2006. Transformation of recalcitrant turfgrass cultivars through improvement of tissue culture and selection regime. Plant Cell Tissue and Organ Culture 85, 307-316.

Carroquino, M.J., Alexander, M., 1998. Factors affecting the biodegradation of phenanthrene initially dissolved in different nonaqueous-phase liquids. Environmental Toxicology and Chemistry 17, 265-270.

Cavallini, A., Lupi, M.C., 1987. Cytological study of callus and regenerated plants of sunflower (*Helianthus annuus* L). Plant Breeding 99, 203-208.

Clapham, W.M., Foster, J.G., Neel, J.P.S., Fedders, J.M., 2005. Fatty acid composition of traditional and novel forages. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 10068-10073.

Conde, G., 2000. Regeneración de suelos: Técnicas y costes de recuperación de suelos., Infoambiental, pp. 211-214. <http://www.infoambiental.es/html/files/pdf/amb/iq/369/17articulo.pdf>

Corgie, S.C., Beguiristain, T., Leyval, C., 2004. Spatial distribution of bacterial communities and phenanthrene degradation in the

rhizosphere of *Lolium perenne* L. Applied and Environmental Microbiology 70, 3552-3557.

Cornelissen, G., Gustafsson, O., Bucheli, T.D., Jonker, M.T.O., Koelmans, A.A., Van Noort, P.C.M., 2005. Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal, and kerogen in sediments and soils: Mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation, and biodegradation. Environmental Science & Technology 39, 6881-6895.

Creemersmolenaar, J., Loeffen, J.P.M., Vanrossum, M., Colijnhooymans, C.M., 1992. The effect of genotype, cold-storage and ploidy level on the morphogenic response of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) suspension-cultures. Plant Science 83, 87-94.

Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P., Hsu, F.C., 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. Advances in Agronomy, Vol 56 56, 55-114.

Chaîneau, C.H., Morel, J.L., Oudot, J., 1997. Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. Journal of Environmental Quality 26, 1478-1483.

Chalumot, G., Yao, C., Pino, V., Anderson, J.L., 2009. Determining the stoichiometry and binding constants of inclusion complexes formed between aromatic compounds and beta-cyclodextrin by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A 1216, 5242-5248.

Cheema, S.A., Khan, M.I., Tang, X.J., Zhang, C.K., Shen, C.F., Malik, Z., Ali, S., Yang, J., Shen, K.L., Chen, X.C., Chen, Y.X., 2009. Enhancement of phenanthrene and pyrene degradation in rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*). Journal of Hazardous Materials 166, 1226-1231.

Chen, C.S.H., Delfino, J.J., Rao, P.S.C., 1994. Partitioning of organic and inorganic components from motor oil into water. Chemosphere 28, 1385-1400.

Child, R., Miller, C., Liang, Y., Narasimham, G., Chatterton, J., Harrison, P., Sims, R., Britt, D., Anderson, A., 2007. Polycyclic

aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* isolates: their association with plant roots. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 655-663.

Chin, Y.P., Aiken, G.R., Danielsen, K.M., 1997. Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: The role of molecular weight and aromaticity. *Environmental Science & Technology* 31, 1630-1635.

de Boer, D., Erps, M.M., Wodzig, W., van Dieijen-Visser, M.P., 2005. Inadequate attempts to measure the microheterogeneity of transthyretin by low-resolution mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 51, 1299-1300.

de Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I.H.M., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G.V., Vanderleyden, J., De Mot, R., Lugtenberg, B.J.J., 2002. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15, 1173-1180.

Ditoro, D.M., Zarba, C.S., Hansen, D.J., Berry, W.J., Swartz, R.C., Cowan, C.E., Pavlou, S.P., Allen, H.E., Thomas, N.A., Paquin, P.R., 1991. Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic-chemical using equilibrium partitioning. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10, 1541-1583.

Edwards, N.T., 1983. Polycyclic aromatic-hydrocarbons (PAHs) in the terrestrial environment - A review. *Journal of Environmental Quality* 12, 427-441.

Efroymsen, R.A., Alexander, M., 1995. Reduced mineralization of low concentrations of phenantrene because of sequestering in nonaqueous-phase liquids. *Environmental Science & Technology* 29, 515-521.

Ehlers, G.A.C., Loibner, A.P., 2006. Linking organic pollutant (bio)availability with geosorbent properties and biomimetic methodology: A review of geosorbent characterisation and (bio)availability prediction. *Environmental Pollution* 141, 494-512.

Eiroa, A.A., Blanco, E.V., Mahia, P.L., Lorenzo, S.M., Rodriguez, D.P., 1998. Simultaneous determination of 11 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by second-derivative synchronous spectrofluorimetry considering the possibility of quenching by some PAHs in the mixture. *Analyst* 123, 2113-2117.

Engelbreton, R.R., Vonwandruszka, R., 1994. Microorganization in dissolved humic acids. *Environmental Science & Technology* 28, 1934-1941.

Epuri, V., Sorensen, D.L., 1997. Benzo(a)pyrene and hexachlorobiphenyl contaminated soil: phytoremediation potential. *ACS symposium series* 664, 200-222.

Erickson, L.E., Davis, L.C., Narayanan, M., 1995. Bioenergetics and bioremediation of contaminated soil. *Thermochimica Acta* 250, 353-358.

European Environment Agency, 2006. Contamination from local sources. <http://www.eea.europa.eu/themes/soil/soil-threats>.

Eweis, J.B., Ergas, S.J., Chang, D.P.Y., Schroeder, E.D., 1998. Principios de biorrecuperación. Tratamientos para descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos. McGraw-Hill/ Interamericana de España, Madrid.

Fernández-Bremauntz, A., Ramírez-Yarto, M.A., Castro-Díaz, J., 2004. Capítulo 5.6: Hidrocarburos aromáticos policíclicos., Las sustancias tóxicas persistentes., Primera ed. Instituto Nacional de Ecología. México. [http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/consultaPublicacion.html?id\\_publicacion=447](http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/consultaPublicacion.html?id_publicacion=447).

Ferro, A.M., Sims, R.C., Bugbee, B., 1994. Hycrest crested wheatgrass accelerates the degradation of pentachlorophenol in soil. *Journal of Environmental Quality* 23, 272-279.

Fierer, N., Jackson, R.B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 626-631.

Fierer, N., Bradford, M.A., Jackson, R.B., 2007a. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88, 1354-1364.

Fierer, N., Morse, J.L., Berthrong, S.T., Bernhardt, E.S., Jackson, R.B., 2007b. Environmental controls on the landscape-scale biogeography of stream bacterial communities. *Ecology* 88, 2162-2173.

Fu, Q.S., Barkovskii, A.L., Adriaens, P., 1999. Reductive transformation of dioxins: An assessment of the contribution of dissolved organic matter to dechlorination reactions. *Environmental Science & Technology* 33, 3837-3842.

Gallego, J.R., Gonzalez-Rojas, E., Pelaez, A.I., Sanchez, J., Garcia-Martinez, M.J., Ortiz, J.E., Torres, T., Llamas, I.F., 2006. Natural attenuation and bioremediation of Prestige fuel oil along the Atlantic coast of Galicia (Spain). *Organic Geochemistry* 37, 1869-1884.

Gallego, J., Fernandez, J., Diez-Sanz, F., Ordonez, S., Sastre, H., Gonzalez-Rojas, E., 2007. Bioremediation for shoreline cleanup: In situ vs. on-site treatments. *Environmental engineering science* 24, 493-504.

Garagorri, M.T.U., Intxaurza, I.E., Navaridas, E.U., 1999. Optimization of the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in road asphalts by HPLC with fluorimetric detection. *Quimica Analitica* 18, 197-202.

Garcia-Gil, J.C., Plaza, C., Senesi, N., Brunetti, G., Polo, A., 2004. Effects of sewage sludge amendment on humic acids and microbiological properties of a semiarid Mediterranean soil. *Biology and Fertility of Soils* 39, 320-328.

Garcia-Junco, M., De Olmedo, E., Ortega-Calvo, J., 2001. Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid (NAPL)-dissolved phenanthrene to the biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ. *Environmental Microbiology* 3, 561-569.

Garcia-Junco, M., Gomez-Lahoz, C., Niqui-Arroyo, J.L., Ortega-Calvo, J.J., 2003. Biosurfactant- and biodegradation-enhanced partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from nonaqueous-phase liquids. *Environmental Science & Technology* 37, 2988-2996.

Garrigues, P., Bellocq, J., 1989. Rapid cleanup of natural organic extracts for the recovery of polycyclic aromatic-hydrocarbons by solid-phase extraction. *HRC-Journal of High Resolution Chromatography*, 12, 400-403.

Gauthier, T.D., Shane, E.C., Guerin, W.F., Seitz, W.R., Grant, C.L., 1986. Fluorescence quenching method for determining equilibrium-constants for polycyclic aromatic-hydrocarbons binding to dissolved humic materials. *Environmental Science & Technology* 20, 1162-1166.

Gerhardt, K.E., Huang, X.D., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science* 176, 20-30.

Germida, J.J., Frick, C.M., Farrell, R.E., 2002. Phytoremediation of oil-contaminated soils, in: Violante, A., Huang, P.M., Bollag, J.M., Gianfreda, L. (Eds.), *Developments in soil science*, First Edition ed. Elsevier Science B. V., Amsterdams, pp. 169-186.

Grayston, S.J., Vaughan, D., Jones, D., 196. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology* 5, 29-56.

Guha, S., Jaffe, P.R., 1996. Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environmental Science & Technology* 30, 605-611.

Gujarathi, N.P., Haney, B.J., Park, H.J., Wickramasinghe, S.R., Linden, J.C., 2005. Hairy roots of *Helianthus annuus*: A model system to study phytoremediation of tetracycline and oxytetracycline. *Biotechnology Progress*, 21, 775-780.

Gyulai, G., Murenyetz, L., Janovsky, J., Tárczi, M., Rácz, I., 1995. Initiation of monocot plant development in vitro for studying plant-



microbe interaction. Azospirillum VI and Related Microorganisms. NATO ASI Series, Vol. G 37.

Gunther, T., Dornberger, U., Fritsche, W., 1996. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 33, 203-215.

Haftka, J.J.H., Parsons, J.R., Govers, H.A.J., Ortega-Calvo, J.J., 2008. Enhanced kinetics of solid-phase microextraction and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of dissolved organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1526-1532.

Haluska, L., Barancikova, G., Balaz, S., Dercova, K., Vrana, B., PazWeisshaar, M., Furciová, E., Bielek, P., 1995. Degradation of PCB in different soils by inoculated *Alcaligenes xylosoxidans*. *Science of the Total Environment* 175, 275-285.

Heinonsalo, J., Jørgensen, K.S., Haahtela, K., Sen, R., 2000. Effects of *Pinus sylvestris* root growth and mycorrhizosphere development on bacterial carbon source utilization and hydrocarbon oxidation in forest and petroleum-contaminated soils. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 451-464.

Helmy, A.M., Ramadan, M.F., 2009. Agronomic performance and chemical response of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to some organic nitrogen sources and conventional nitrogen fertilizers under sandy soil conditions. *Grasas y Aceites*, 60, 55-67.

Huang, X.D., El-Alawi, Y., Penrose, D.M., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2004. A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental Pollution* 130, 465-476.

Hugenholtz, P., Goebel, B.M., Pace, N.R., 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity *Journal of Bacteriology* 180, 6793-6793.

Imhoff, U., Wingender, R., Dresen, B., Schnabl, H., 1996. Micropropagation of three *Helianthus* wild perennial species. *Journal of Applied Botany-Angewandte Botanik* 70, 137-139.

Jimenez, N., Vinas, M., Sabate, J., Diez, S., Bayona, J.M., Solanas, A.M., Albaiges, J., 2006. The Prestige oil spill. 2. Enhanced biodegradation of a heavy fuel oil under field conditions by the use of an oleophilic fertilizer. *Environmental Science & Technology* 40, 2578-2585.

Johnsen, A.R., Karlson, U., 2004. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 452-459.

Johnson, D.L., Maguire, K.L., Anderson, D.R., McGrath, S.P., 2004. Enhanced dissipation of chrysene in planted soil: the impact of a rhizobial inoculum. *Soil Biology & Biochemistry* 36, 33-38.

Joner, E.J., Leyval, C., 2003. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environmental Science & Technology* 37, 2371-2375.

Jones, K.C., Stratford, J.A., Waterhouse, K.S., Vogt, N.B., 1989. Organic contaminants in Welsh soils-polynuclear aromatic-hydrocarbons. *Environmental Science & Technology* 23, 540-550.

Kamath, R., Rentz, J.A., Schnoor, J.L., Alvarez, P.J.J., 2004. Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils: principles and applications. *Petroleum Biotechnology: Developments and Perspectives* 151, 447-478.

Kim, K.R., Owens, G., Naidu, R., Kwon, S. I., 2010. Influence of plant roots on rhizosphere soil solution composition of long-term contaminated soils. *Geoderma* 155, 86-92.

Kuiper, I., Kravchenko, L.V., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J., 2002. *Pseudomonas putida* strain PCL1444, selected for efficient root colonization and naphthalene degradation, effectively utilizes root exudate components. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15, 734-741.

Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J., 2004. Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 6-15.

Kummerova, M., Kmentova, E., Koptikova, J., 2001. Effect of fluoranthene on growth and primary processes of photosynthesis in faba bean and sunflower. *Rostlinna Vyroba* 47, 344-351.

LaGrega, M.D., Buckingham, P.L., Evans, J.C., 1994. Growth kinetics. In: *Hazardous Waste Management.*, in: Clark, B.J., Morris, J.M. (Ed.). McGraw Hill Inc. Publishers., p. 581.

Laha, S., Luthy, R., 1992. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems. *Biotechnology and bioengineering* 40, 1367-1380.

Lahlou, M., Ortega-Calvo, J.J., 1999. Bioavailability of labile and desorption-resistant phenanthrene sorbed to montmorillonite clay containing humic fractions. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2729-2735.

Lahlou, M., Harms, H., Springael, D., Ortega-Calvo, J.J., 2000. Influence of soil components on the transport of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria through saturated porous media. *Environmental Science & Technology* 34, 3649-3656.

Laor, Y., Strom, P.F., Farmer, W.J., 1999. Bioavailability of phenanthrene sorbed to mineral-associated humic acid. *Water Research* 33, 1719-1729.

Leal-Granadillo, I.A., Alonso, J.I.G., Sanz-Medel, A., 2000. Determination of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate and vapour phases in Oviedo, Spain, by GC-MS. *Journal of Environmental Monitoring* 2, 218-222.

Lee, K., Merlin, F.X., 1999. Bioremediation of oil on shoreline environments: development of techniques and guidelines. *Pure and Applied Chemistry*, 71, 161-171.

Leigh, M.B., Prouzova, P., Mackova, M., Macek, T., Nagle, D.P., Fletcher, J.S., 2006. Polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading bacteria associated with trees in a PCB-contaminated site. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2331-2342.

- Liste, H.H., Alexander, M., 2000a. Accumulation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere soil. *Chemosphere* 40, 11-14.
- Liste, H.H., Alexander, M., 2000b. Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere* 40, 7-10.
- Lopez, Z., Vila, J., Ortega-Calvo, J.J., Grifoll, M., 2008. Simultaneous biodegradation of creosote-polycyclic aromatic hydrocarbons by a pyrene-degrading *Mycobacterium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78, 165-172.
- Lynch, J.M., Whipps, J.M., 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil* 129, 1-10.
- Magee, B.R., Lion, L.W., Lemley, A.T., 1991. Transport of dissolved organic macromolecules and their effect on the transport of phenanthrene in porous-media. *Environmental Science & Technology* 25, 323-331.
- Maliszewska-Kordybach, B., Smreczak, B., 2000. Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) - Effect on plants. *Environmental Technology* 21, 1099-1110.
- Mastandrea, C., Chichizola, C., Luduena, B., Sanchez, H., Alvarez, H., 2005. Polyaromatic hidrocarbons. Health risk and biomarkers. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39, 27-36.
- Mastrangelo, G., Fadda, E., Marzia, V., 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environmental Health Perspectives* 104, 1166-1170.
- Mayer, P., Wernsing, J., Tolls, J., de Maagd, P.G.J., Sijm, D., 1999. Establishing and controlling dissolved concentrations of hydrophobic organics by partitioning from a solid phase. *Environmental Science & Technology* 33, 2284-2290.
- Mayer, P., Karlson, U., Christensen, P.S., Johnsen, A.R., Trapp, S., 2005. Quantifying the effect of medium composition on the diffusive mass transfer of hydrophobic organic chemicals through unstirred boundary layers. *Environmental Science & Technology* 39, 6123-6129.

Mayer, P., Fernqvist, M.M., Christensen, P.S., Karlson, U., Trapp, S., 2007. Enhanced diffusion of polycyclic aromatic hydrocarbons in artificial and natural aqueous solutions. *Environmental Science & Technology* 41, 6148-6155.

Meng, L.A., Zhu, Y.G., 2011. Pyrene Biodegradation in an Industrial Soil Exposed to Simulated Rhizodeposition: How Does It Affect Functional Microbial Abundance? *Environmental Science & Technology* 45, 1579-1585.

Merckx, R., Dijkstra, A., Denhartog, A., Vanveen, J.A., 1987. Production of root-derived material and associated microbial-growth in soil at different nutrient levels. *Biology and Fertility of Soils* 5, 126-132.

Miya, R.K., Firestone, M.K., 2000. Phenanthrene-degrader community dynamics in rhizosphere soil from a common annual grass. *Journal of Environmental Quality* 29, 584-592.

Miyata, N., Iwahori, K., Foght, J.M., Gray, M.R., 2004. Saturable, energy-dependent uptake of phenanthrene in aqueous phase by *Mycobacterium sp* strain RJGII-135. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 363-369.

Morgan, P., Watkinson, R.J., 1989a. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. *Critical Reviews in Biotechnology* 8, 305-333.

Morgan, P., Watkinson, R.J., 1989b. Microbiological methods for the cleanup of soil and ground-water contaminated with halogenated organic-compounds. *FEMS Microbiology Reviews*. 63, 277-299.

Morra, M.J., Corapcioglu, M.O., Vonwandruszka, R.M.A., Marshall, D.B., Topper, K., 1990. Fluorescence quenching and polarization studies of naphthalene and 1-naphthol interaction with humic acid. *Soil Science Society of America Journal*, 54, 1283-1289.

Musteata, F.M., Pawliszyn, J., Qian, M.G., Wu, J.T., Miwa, G.T., 2006. Determination of drug plasma protein binding by solid phase microextraction. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 95, 1712-1722.

Network for Industrially Contaminated Land in Europe, 2009. Soils Policy: Soil Contamination in Europe, [http://www.epa.gov/oswer/international/factsheets/pdfs/200906\\_eu\\_soils\\_contamination.pdf](http://www.epa.gov/oswer/international/factsheets/pdfs/200906_eu_soils_contamination.pdf).

Nikolaou, A., Kostopoulou, M., Lofrano, G., Meric, S., 2009. Determination of PAHs in marine sediments: Analytical methods and environmental concerns. *Global Nest*, 11, 391-405.

Nikolopoulou, M., Kalogerakis, N., 2008. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Marine Pollution Bulletin* 56, 1855-1861.

Niqui-Arroyo, J.L., Bueno-Montes, M., Posada-Baquero, R., Ortega-Calvo, J.J., 2006. Electrokinetic enhancement of phenanthrene biodegradation in creosote-polluted clay soil. *Environmental Pollution* 142, 326-332.

Niqui-Arroyo, J.L., Ortega-Calvo, J.J., 2007. Integrating biodegradation and electroosmosis for the enhanced removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from creosote-polluted soils. *Journal of Environmental Quality* 36, 1444-1451.

Niqui-Arroyo, J.L., Ortega-Calvo, J.J., 2010. Effect of electrokinetics on the bioaccessibility of polycyclic aromatic hydrocarbons in polluted soils. *Journal of Environmental Quality* 39, 1993-1998.

O'Connell, S.P., Lehman, R.M., Bala, G.A., 1997. Toxicological evaluation of hydrocarbon removal from soils by an extraction and solubilization remediation process. *Spill Science & Technology Bulletin*, 4, 147-154.

Olson, P.E., Castro, A., Joern, M., DuTeau, N.M., Pilon-Smits, E.A.H., Reardon, K.F., 2007. Comparison of plant families in a greenhouse phytoremediation study on an aged polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* 36, 1461-1469.

Ortega-Calvo, J.J., Alexander, M., 1994. Roles of bacterial attachment and spontaneous partitioning in the biodegradation of naphthalene initially present in nonaqueous-phase liquids. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2643-2646.

Ortega-Calvo, J.J., Lahlou, M., Saiz-Jimenez, C., 1997. Effect of organic matter and clays on the biodegradation of phenanthrene in soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* 40, 101-106.

Ortega-Calvo, J.J., Saiz-Jimenez, C., 1998. Effect of humic fractions and clay on biodegradation of phenanthrene by a *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3123-3126.

Ortega-Calvo, J.J., Marchenko, A.I., Vorobyov, A.V., Borovick, R.V., 2003. Chemotaxis in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from coal-tar- and oil-polluted rhizospheres. *FEMS Microbiology Ecology* 44, 373-381.

Ortega-Calvo, J.J., Gschwend, P.M., 2010. Influence of low oxygen tensions and sorption to sediment black carbon on biodegradation of pyrene. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4430-4437.

Pan, B., Xing, B.S., Liu, W.X., Xing, G.H., Tao, S., 2007. Investigating interactions of phenanthrene with dissolved organic matter: Limitations of Stern-Volmer plot. *Chemosphere* 69, 1555-1562.

Pandya, S., Iyer, P., Gaitonde, V., Parekh, T., Desai, A., 1999. Chemotaxis of *Rhizobium* SP.S2 towards *Cajanus cajan* root exudate and its major components. *Current Microbiology* 38, 205-209.

Parrish, Z.D., Banks, M.K., Schwab, A.P., Schwab, A.P., 2004. Effectiveness of phytoremediation as a secondary treatment for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in composted soil. *International Journal of Phytoremediation* 6, 119-137.

Parrish, Z.D., Banks, M.K., Schwab, A.P., 2005. Effect of root death and decay on dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of yellow sweet clover and tall fescue. *Journal of Environmental Quality* 34, 207-216.

Petitprez, M., Sarrafi, A., Flores-Berrios, E., Xuhan, X., Briere, C., Gentzbittel, L., 2005. Somatic embryogenesis by liquid culture of epidermal layers in sunflower: from genetic control to cell development. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81, 331-337.

Pinton, P., Varanini, Z., Nannipieri, P., 2007. *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, Second Edition ed. CRC Press. Taylor & Francis Group.

Poerschmann, J., Zhang, Z.Y., Kopinke, F.D., Pawliszyn, J., 1997. Solid phase microextraction for determining the distribution of chemicals in aqueous matrices. *Analytical Chemistry* 69, 597-600.

Popielarska, M., Przywara, L., 2003. In vitro culture of isolated living sunflower (*Helianthus annuus* L.) embryo sacs. *Sexual Plant Reproduction* 16, 23-33.

Posada-Baquero, R., Ortega-Calvo, J.J., 2011. Recalcitrance of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil contributes to background pollution. *Environmental Pollution* 159, 3692-3699.

Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes de España, 2010. Información pública. Hidrocarburos aromáticos policíclicos totales. Todas las comunidades. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. <http://www.prtr-es.es/informes/pollutant.aspx>.

Reichenberg, F., Mayer, P., 2006. Two complementary sides of bioavailability: Accessibility and chemical activity of organic contaminants in sediments and soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1239-1245.

Reichenberg, F., Smedes, F., Jonsson, J.A., Mayer, P., 2008. Determining the chemical activity of hydrophobic organic compounds in soil using polymer coated vials. *Chemistry Central Journal* 2.

Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., 1985. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. *Journal of Bacteriology* 162, 190-195.



Renner, R., 1999. EPA draft almost doubles safe dose of perchlorate in water. *Environmental Science & Technology* 33, 110A-111A.

Rentz, J.A., Alvarez, P.J.J., Schnoor, J.L., 2005. Benzo[a]pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudates: Implications for phytoremediation. *Environmental Pollution* 136, 477-484.

Rogers, S.W., S.K.Ong, B., Kjartanson, J., Golchin, G.A., 2002. Natural Attenuation of PAH-Contaminated Sites: A Review. *ASCE Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management Practice Periodical* 6, 1-15.

Roote, D.S., Miller, R.R., Sacre, J.A., Merski, A.T., 1997. Groundwater clean-up options. *Chemical engineering* 104, 104-112.

Schnoor, J.L., Licht, L.A., McCutcheon, S.C., Wolfe, N.L., Carreira, L.H., 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants *Environmental Science & Technology* 29, A318-A323.

Seko, Y., Nishimura, M., 1996. Effect of CO<sub>2</sub> and light on survival and growth of rice regenerants grown in vitro on sugar-free medium. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 46, 257-264.

Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A., Harms, H., 2004. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environmental Science & Technology* 38, 228A-231A.

Shann, J.R., Boyle, J.J., 1994. Influence of plant-species on in-situ rhizosphere degradation, in: Anderson, T. A., Coats, J. R. (Eds), *Bioremediation through Rhizosphere Technology*. American Chemical Society, Washintong, DC, pp. 70-81.

Siciliano, S.D., Germida, J.J., Banks, K., Greer, C.W., 2003. Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon phytoremediation field trial. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 483-489.

Sly, L.I., 1995. Taxonomic note: V. B. D. Skerman (1921-1993), a reforming force in bacterial systematics and nomenclature. *International journal of systematic bacteriology* 45, 412-413.

Smith, K.E.C., Thullner, M., Wick, L.Y., Harms, H., 2009. Sorption to humic acids enhances polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. *Environmental Science & Technology* 43, 7205-7211.

Smith, K.E.C., Dom, N., Blust, R., Mayer, P., 2010. Controlling and maintaining exposure of hydrophobic organic compounds in aquatic toxicity tests by passive dosing. *Aquatic Toxicology* 98, 15-24.

Song, H.K., Ahn, J.K., Ahmad, A., Hahn, S.J., Kim, S.H., Chung, I.M., 2004. Identification of allelochemicals in rice root exudates at various phenological phases and their influence on barnyardgrass. *Allelopathy Journal* 13, 173-188.

Steinberg, C.E.W., Kamara, S., Prokhotskaya, V.Y., Manusadzianas, L., Karasyova, T.A., Timofeyev, M.A., Jie, Z., Paul, A., Meinelt, T., Farjalla, V.F., Matsuo, A.Y.O., Burnison, B.K., Menzel, R., 2006. Dissolved humic substances - ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? *Freshwater Biology* 51, 1189-1210.

Sujatha, M., Prabakaran, A.J., 2001. High frequency embryogenesis in immature zygotic embryos of sunflower. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 65, 23-29.

Tang, J., Petersen, E., Weber, W., 2008. Development of engineered natural organic sorbents for environmental applications. 4. Effects on biodegradation and distribution of pyrene in soils. *Environmental Science & Technology* 42, 1283-1289.

Tavares, M., Queiroz, N., Santos, I., Souza, A., Cavalcanti, E., Barros, A., Rosenhaim, R., Soledade, L., Souza, A., 2011. Sunflower biodiesel. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 1-5.

Tejeda-Agredano, M.C., Gallego, S., Niqui-Arroyo, J.L., Vila, J., Grifoll, M., Ortega-Calvo, J.J., 2011. Effect of interface fertilization on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons

present in nonaqueous-phase liquids. *Environmental Science & Technology* 45, 1074-1081.

ter Laak, T.L., ter Bekke, M.A., Hermens, J.L.M., 2009. Dissolved organic matter enhances transport of PAHs to aquatic organisms. *Environmental Science & Technology* 43, 9044-9044.

Thomas, J.M., Yordy, J.R., Amador, J.A., Alexander, M., 1986. Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic-compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 290-296.

Totsche, K.U., Danzer, J., KogelKnabner, I., 1997. Dissolved organic matter-enhanced retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil miscible displacement experiments. *Journal of Environmental Quality* 26, 1090-1100.

Traina, S.J., Spontak, D.A., Logan, T.J., 1989. Effects of cations on complexation of naphthalene by water-soluble organic-carbon. *Journal of Environmental Quality* 18, 221-227.

Trifi, M., Mezghani, S., Marrakchi, M., 1981. Invitro vegetative multiplication of sunflower. *Physiologie Vegetale* 19, 99-102.

Troncoso, A., Villegas, A., Mazuelos, C., Cantos, M., 1990. Growth and mineral-composition of grapevine rootstock cultured in vitro with different levels of ammonium-nitrate, *Plant Nutrition - Physiology and Applications*, pp. 653-654.

Uyttebroek, M., Ortega-Calvo, J.J., Breugelmans, P., Springael, D., 2006. Comparison of mineralization of solid-sorbed phenanthrene by polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Mycobacterium* spp. and *Sphingomonas* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72, 829-836.

Vaes, W.H.J., Ramos, E.U., Verhaar, H.J.M., Seinen, W., Hermens, J.L.M., 1996. Measurement of the free concentration using solid-phase microextraction: Binding to protein. *Analytical Chemistry* 68, 4463-4467.

Vila, J., Lopez, Z., Sabate, J., Minguillon, C., Solanas, A.M., Grifoll, M., 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of

pyrene by *Mycobacterium* sp strain AP1: Actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5497-5505.

Vila, J., Grifoll, M., 2009. Actions of *Mycobacterium* sp strain AP1 on the saturated- and aromatic-hydrocarbon fractions of fuel oil in a marine medium. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6232-6239.

van Herwijnen, R., 2003. Metabolic and cometabolic biodegradation of PAH. Tesis Doctoral. Universidad de Amsterdam.

Vinas, M., Sabate, J., Espuny, M.J., Solanas, A.M., 2005. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 7008-7018.

Wang, Z.D., Fingas, M., Blenkinsopp, S., Sergy, G., Landriault, M., Sigouin, L., Foght, J., Semple, K., Westlake, D.W.S., 1998. Comparison of oil composition changes due to biodegradation and physical weathering in different oils. *Journal of Chromatography A* 809, 89-107.

Watkins, J.W., Sorensen, D.L., Sims, R.C., 1994. Volatilization and mineralization of naphthalene in soil-grass microcosms, *Bioremediation through Rhizosphere Technology*, pp. 123-131.

Wells, M., Wick, L.Y., Harms, H., 2004. Perspectives on modeling the release of hydrophobic organic contaminants drawn from model polymer release systems. *Journal of Materials Chemistry*. 14, 2461-2472.

Wick, L.Y., Wattiau, P., Harms, H., 2002. Influence of the growth substrate on the mycolic acid profiles of mycobacteria. *Environmental Microbiology* 4, 612-616.

Wilson, S.C., Jones, K.C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) - A review. *Environmental Pollution* 81, 229-249.

Wiltse, C.C., Rooney, W.L., Chen, Z., Schwab, A.P., Banks, M.K., 1998. Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil phytoremediation potential among alfalfa genotypes. *Journal of Environmental Quality* 27, 169-173.

Wingender, R., Henn, H.J., Barth, S., Voeste, D., Machlab, H., Schnabl, H., 1996. A regeneration protocol for sunflower (*Helianthus annuus* L) protoplasts. *Plant Cell Reports* 15, 742-745.

Wosika, E., 1991. State water boards new monitoring requirements Environmental Engineering. Specialty conference of the environmental engineering division. American Society of Civil Engineers, Reno, NV, pp. 726-731.

Wrenn, B.A., Venosa, A.D., 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Canadian Journal of Microbiology* 42, 252-258.

Wu, Y.Y., Chen, Q.J., Chen, M., Chen, J., Wang, X.C., 2005. Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene. *Plant Science* 169, 65-73.

Yi, H., Crowley, D.E., 2007. Biostimulation of PAH degradation with plants containing high concentrations of linoleic acid. *Environmental Science & Technology* 41, 4382-4388.

Yoshitomi, K.J., Shann, J.R., 2001. Corn (*Zea mays* L.) root exudates and their impact on C-14-pyrene mineralization. *Soil Biology & Biochemistry* 33, 1769-1776.

Yrjala, K., Keskinen, A.K., Akerman, M.L., Fortelius, C., Sipila, T.P., 2010. The rhizosphere and PAH amendment mediate impacts on functional and structural bacterial diversity in sandy peat soil. *Environmental Pollution* 158, 1680-1688.

Yu, H.T., 2002. Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: photochemistry and phototoxicity. *Journal of Environmental Science and Health Part 20*, 149-183.

Yu, R., 2006. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Contaminated Soils in a Roller Baffled Bioreactor, Tesis Doctoral. Department of Chemical Engineering. University of Saskatchewan.

Zuen, X., Tianyi, L., 1986. Study on ash of sunflower stalk used as potassium fertilizer. *Soils* 18, 23-25.