

010803531  
120767742



T/1239



**BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS: INFLUENCIA DE LOS AGENTES TENSIOACTIVOS EN LA BIODISPONIBILIDAD MICROBIANA DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.**

Memoria que presenta

**Marisa Bueno Montes**

para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas.

Sevilla, Mayo de 2005

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 017 número 275 del libro  
Correspondiente.

Sevilla, 24-05-05

El Jefe del Negociado de Teoría

*Alena de la Torre*

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

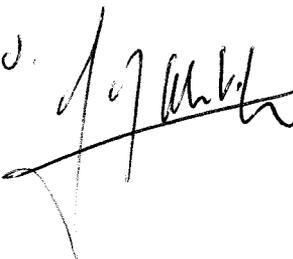
Depositado en el Dpto. de Cristal. Min.,  
de la Facultad de Química  
de esta Universidad desde el día 1/6/05  
hasta el día 18/6/05.

Sevilla 5 de Julio de 2005  
EL DIRECTOR DEL DPTO.

*N. presidente*

Dr. D. Luis Clemente Salas DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada "*Biorrecuperación de suelos contaminados: Influencia de los agentes tensioactivos en la biodisponibilidad microbiana de hidrocarburos aromáticos policíclicos*", presentada por Dña. Marisa Bueno Montes para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas, ha sido realizada en el Departamento de Biogeoquímica y Dinámica de Contaminantes, bajo la dirección del Dr. D. José Julio Ortega Calvo, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

P.D. 

En Sevilla, a 5 de Mayo de 2005

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar mi agradecimiento a todos los que de alguna forma han contribuido a la realización de éste trabajo de investigación:

En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. José Julio Ortega Calvo, director de este trabajo de investigación, por confiar desde un primer momento en mí y abrirme las puertas del mundo de la investigación. Su trabajo, consejos y comprensión en todo momento han sido de gran ayuda para el desarrollo de esta tarea.

Al prof. Dr. D. Guillermo Paneque Guerrero por haber aceptado la Tutoría de esta tesis.

Al convenio Universidad de Sevilla-CSIC, dentro del cual ha sido posible la realización de prácticas y el desarrollo de este trabajo de investigación en el IRNAS (CSIC).

Al proyecto europeo BIOSTIMUL "Use of bioavailability-promoting micro-organisms to decontaminate PAH-polluted soils: preparation towards large-scale field exploitation" y a la Empresa para la Gestión de Residuos Industriales, EMGRISA, por la financiación de esta tesis doctoral.

A las empresas EMGRISA y SOILREM por la provisión de las muestras de suelos contaminados utilizadas en este trabajo de investigación.

Al Dr. Dirk Springael, a mi compañero Maarten y a la Universidad Católica de Lovaina, por la grata acogida en su grupo de trabajo durante mi estancia en Bélgica.

A mis compañeros de laboratorio José Luis y Alfonso y en especial a "mis niñas" Patricia y Rosa por su sincera amistad y compañerismo. Siempre os llevaré conmigo.

A mis compañeros de almuerzo Agui, Fátima, Trini, Jaime, Jose María y Alegría, por hacer más amenas las largas jornadas vividas en el instituto.

A Mercedes, Angeles y M<sup>a</sup> Angeles, porque sin ellas el instituto no sería el mismo.

A mis amigas del alma Fátima y Ana, por vuestra amistad incondicional.

A mis padres Fernando y Marisa, por su inagotable sacrificio y apoyo incondicional y constante. A mi hermano Fernando, por hacerme reír siempre que lo he necesitado. Gracias a los tres. Os quiero mucho.

A Darío, porque desde el principio de este largo camino ha estado a mi lado en los buenos y malos momentos. Sin su apoyo no lo habría conseguido. Gracias por estar siempre ahí, por escucharme, entenderme y quererme tal como soy, una química loca...loca por la química.

## INDICE

Resumen	VII
Capítulo I: Introducción Y Antecedentes Bibliográficos.	1
I.1 Introducción.	2
I.2 Contaminación de suelos por Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.	3
I.2.1 Estructura y propiedades de los HAPs.	3
I.2.2 Origen de los HAPs.	9
I.2.2.1 ¿Qué es la creosota?	9
I.2.2.2 Legislación vigente sobre el uso de la creosota.	10
I.2.2.3 Creosota en el suelo de Andújar.	12
I.2.3 Cinética de desorción de HAPs.	12
I.2.4 Toxicidad de los HAPs. Efectos sobre la salud humana.	14
I.2.5 Legislación vigente sobre suelos contaminados por HAPs.	16
I.3 Biorrecuperación de suelos contaminados.	21
I.3.1 Factores que afectan a la biorrecuperación.	23
I.3.2 Biodisponibilidad.	28
I.3.3 Otras técnicas de recuperación de suelos.	29
I.4 Tensioactivos.	31
I.4.1 Propiedades físico-químicas de los tensioactivos.	31
I.4.2 Tensioactivos no-iónicos.	34
I.4.3 Adsorción de los tensioactivos al suelo.	34
I.4.4 Modelo de desorción micelar.	37
I.4.5 Interacciones tensioactivo – microorganismo.	39
I.4.5.1 Toxicidad.	39
I.4.5.2 Biodegradabilidad.	40
I.4.5.3 Influencia en la movilidad bacteriana.	40
I.4.5.4 Tensioactivo y biodisponibilidad del contaminante.	41

Capítulo II: Materiales Y Metodología.	43
II.1 Reactivos.	44
II.2 Suelos.	44
II.3 Determinación de los parámetros físico-químicos del suelo.	47
II.4 Extracción de los HAPs del suelo y purificación de la muestra.	49
II.5 Análisis de HAPs por cromatografía líquida de alta resolución.	50
II.6 Bacterias, medios, condiciones de cultivo y preparación de inóculos.	51
II.7 Cinética de desorción de HAPs con Tenax.	54
II.8 Cálculo de la CMC de los tensioactivos.	56
II.9 Cinética de desorción de HAPs con tensioactivos.	56
II.10 Absorción de los tensioactivos al suelo.	57
II.11 Ensayos de afinidad.	57
II.12 Ensayos de mineralización Y biodegradación.	59
II.12.1 Mineralización Y biodegradación de fenantreno en sistemas acuosos en presencia de tensioactivos.	59
II.12.2 Mineralización Y biodegradación de HAPs en suspensiones de suelo por poblaciones microbianas autóctonas.	60
II.12.3 Mineralización Y biodegradación de HAPs en suspensiones de suelo inoculadas.	60
II.12.4 Mineralización Y biodegradación de HAPs en suspensiones de suelo inoculadas en presencia de tensioactivos.	61
II.13 Técnicas de análisis molecular.	62
II.13.1 Extracción del DNA.	62
II.13.2 Purificación del DNA extraído.	63
II.13.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	63
II.13.4 Electroforesis en gel de agarosa.	65
II.13.5 Limite de detección para PCR en muestras de suelo.	65
II.13.6 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).	66
Capítulo III: Objetivos.	67

Capítulo IV: Resultados Y Discusión.	71
IV.1 Caracterización de los tensioactivos ensayados: cálculo de la concentración crítica micelar (CMC).	72
IV.2 Estimación de la velocidad de degradación de fenantreno en cultivos líquidos en presencia de tensioactivos.	75
IV.3 Caracterización físico-química de los suelos estudiados.	79
IV.3.1 Clasificación y características generales de los suelos.	79
IV.3.2 Análisis del contenido en HAPs en los suelos estudiados.	81
IV.3.3 Extracción y análisis de HAPs de suelos en presencia de tensioactivos.	84
IV.3.4 Capacidad de adsorción de tensioactivos por el suelo.	85
IV.4 Desorción de HAPs presentes en suelos contaminados.	89
IV.4.1 Cinética de desorción de HAPs con Tenax.	89
IV.4.2 Fracción de desorción rápida de HAPs en suelos contaminados como predicción de la extensión de la biorremediación.	96
IV.4.3 Desorción de HAPs en presencia de tensioactivos: sistemas en equilibrio.	99
IV.4.4 Cinética de desorción de HAPs en presencia de tensioactivos.	103
IV.4.4.1 Estudio de la desorción de HAPs en el suelo B con diferentes concentraciones de tensioactivos	103
IV.4.4.2 Estudio de la desorción de HAPs en el suelo E6068 con Brij 35	107
IV.5 Biodegradación bacteriana de HAPs en suelos arcillosos.	109
IV.5.1 Biodegradación de HAPs por bacterias autóctonas del suelo.	109
IV.5.2 Biodegradación de HAPs en suspensiones de suelo inoculadas.	116
IV.5.3 Estudio de la población microbiana presente en el suelo.	118
IV.6 Influencia de los agentes tensioactivos en la biodisponibilidad de HAPs en suelos.	121
IV.6.1 Efecto de los tensioactivos sobre la mineralización de HAPs y el crecimiento bacteriano en suelos.	121
IV.6.2 Influencia de Brij 35 en la biodegradación de HAPs en suelos.	129
IV.6.3 Biodisponibilidad de HAPs en presencia de Brij 35.	135
IV.6.4 Influencia de Brij 35 en la capacidad de biodegradación de la población microbiana del suelo.	138
IV.7 Influencia de los tensioactivos en la fracción de HAPs resistente a biodegradación.	143

IV.7.1 Biodegradación de HAPs en suelos con fracción resistente.	143
IV.7.2 Influencia de los tensioactivos en la fracción resistente a biodegradación.	145
IV.7.3 Biodegradación de HAPs en suelos bioremediados.	148
IV.7.4 Aplicación de tensioactivos a suelos bioremediados.	150
IV.8 Discusión final: influencia de los tensioactivos en la desorción y biodegradación de HAPs en suelos.	153
Capítulo V: Conclusiones.	157
Capítulo VI: Bibliografía.	159

## ABREVIATURAS

<sup>14</sup> C	Isótopo (14) del carbono.
16S rRNA	RNA ribosómico 16S.
Ace	Acenafteno.
Acei	Acenaftileno.
AEDT	Ácido etilen diamino tetracético.
AEMA	Agencia Europea de Medio Ambiente.
Ant	Antraceno.
BaA	Benzo(a)antraceno.
BaP	Benzo(a)pireno.
BbF	Benzo(b)fluoranteno.
Bper	Benzo(ghi)perileno.
BkF	Benzo(k)fluoranteno.
BOE	Boletín Oficial del Estado.
CFU	Unidades formadoras de colonias.
C:N:P	Proporción molar de carbono, nitrógeno y fósforo
CMC	Concentración crítica micelar.
COT	Carbono orgánico total
Cri	Criseno.
DE	Desviación estándar.
DGGE	Electroforesis en geles con gradiente desnaturalizante
DbA	Bibenzo(ah)antraceno.
DNA	Ácido desoxiribonucleico.
D.O	Densidad óptica.
dyn	dina
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos.
Fen	Fenantreno.
F <sub>ráp</sub>	Fracción de desorción rápida.
F <sub>len</sub>	Fracción de desorción lenta.
Flu	Fluoreno.
Flua	Fluoranteno.
F <sub>6h</sub>	Fracción de desorción tras 6 horas de extracción.
g	gramo
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos.
HLB	Balance Hidrofílico – Lipofílico.
HOCS	Compuestos orgánicos hidrofóbicos.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
lnP	Indeno[1,2,3-cd]pireno.

$K_d$	Coefficiente de distribución entre suelo y fase acuosa.
$K_m$	Coefficiente de distribución entre fase micelar y fase acuosa.
kg	kilogramo.
$K_{ráp}$	Constante de desorción rápida.
$K_{len}$	Constante de desorción lenta.
l	Litro.
LC	Límite de cuantificación.
LD	Límite de detección.
M	Molar.
MB	Medio Bélgica.
MM	Medio de mineralización.
mCi	millicurio.
mg	miligramo.
ml	mililitro.
mM	milimolar.
N	Normal.
Naf	Naftaleno.
NGR	Nivel genérico de referencia.
nm	nanometro.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
Pir	Pireno.
PM	Peso molecular.
POE	Polioxietileno
$Q_{surf}$	Coefficiente de adsorción de los tensioactivos al suelo.
RNA	Ácido ribonucleico.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Sodio dodecil sulfato.
SPE	Extracción en fase sólida.
SW	Medio Suiza.
TRIS	Hidroximetil amino etano.
TS	Tensión superficial.
TSA	Agar triptona y soja
UV	Radiación ultravioleta
$\mu\text{g}$	microgramo
$\mu\text{m}$	micrometro.

## RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) constituyen uno de los grupos de contaminantes más comunes en el medioambiente. La presencia de HAPs en los suelos, como consecuencia de las diversas actividades industriales desarrolladas por el hombre, constituye un grave problema para humanos, animales y plantas, debido a los efectos tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos mostrados por este tipo de compuestos. En respuesta a los serios problemas de contaminación de suelos originados, se han desarrollado numerosos métodos de remediación que traten de paliar esta situación.

En la última década, la biorremediación se ha utilizado frecuentemente para la recuperación de emplazamientos contaminados por HAPs. Sin embargo, a pesar de ser una de las técnicas más atractivas y de menor coste, la presencia tras el tratamiento de una fracción de contaminante resistente a la biodegradación, es uno de los principales factores que hace que en la práctica la biorremediación no sea un tratamiento totalmente efectivo. En la mayoría de los casos, la persistencia de los HAPs en el suelo es debido, entre otras causas, a la baja biodisponibilidad de estos compuestos para la degradación bacteriana, causada por su lenta desorción desde la matriz del suelo y su baja solubilidad en la fase acuosa.

En este trabajo de investigación se ha propuesto la aplicación de tensioactivos no iónicos (Tritón X-100, Brij 30 y Brij 35) en la biorremediación de un suelo contaminado con HAPs, con el fin de aumentar la biodisponibilidad de dichos contaminantes y reducir su fracción resistente a la degradación bacteriana.

Fue necesario el estudio de las características físico-químicas de los tensioactivos ensayados, su adsorción en el suelo, así como sus interacciones con la población bacteriana (autóctona e inoculada) responsable de la degradación de los HAPs, para el establecimiento de las condiciones experimentales óptimas para la biodegradación. La biodisponibilidad de los HAP, puede ser determinada mediante la cinética de desorción con Tenax® de dichos compuestos del suelo. El comportamiento bifásico observado en la desorción de los HAPs desde la matriz del suelo (una primera etapa de desorción rápida, seguida de una segunda etapa de desorción lenta), fue similar al obtenido durante los ensayos de biodegradación. Este comportamiento sugiere que la causa más probable de la baja biodegradación de los compuestos es debida a su lenta desorción y no debida a factores microbiológicos. La degradación parcial de los HAPs más pesados, como benzo(a)pireno, observada en los ensayos de biodegradación, demostró que a pesar de la lenta desorción de estos compuestos, la población bacteriana autóctona fue capaz de biodegradarlos lentamente mediante cometabolismo.

La cinética de desorción de los HAPs en presencia de tensioactivos ocurrió de forma bifásica lo cual también se observó tanto en la desorción con Tenax como en la biodegradación. Los HAPs de menor peso molecular, tales como fluoreno y fenantreno, se desorbieron a la fase acuosa prácticamente en su totalidad en presencia de tensioactivos en concentración muy superior a su CMC. Se observó que la extensión y velocidad a la que se produjo la desorción de los HAPs dependió

en gran medida del tensioactivo presente en la suspensión, de su concentración, así como de su mecanismo de interacción con la matriz del suelo.

Ensayos realizados con sistemas de suelo en suspensión inoculados y en presencia de los tensioactivos Tritón X-100, Brij 30 y Brij 35, en varios rangos de concentración, mostraron que los tensioactivos pueden interactuar con la población microbiana responsable de la degradación de forma diferente, llegando incluso a inhibir la mineralización de los HAPs. En los ensayos realizados, fueron los tensioactivos Tritón X-100 y Brij 35 los que aumentaron considerablemente las tasas máximas de mineralización de los HAPs. Sin embargo, solo la presencia de Brij 35 en el sistema redujo en gran medida la fracción resistente a biodegradación de aquellos HAPs capaces de ser degradados por la población bacteriana inoculada (fenantreno, fluoranteno y pireno). El hecho de que la totalidad de fenantreno y de pireno fueran biodegradados confirmó que efectivamente el paso limitante en la biodegradación de los HAPs es la baja biodisponibilidad de dichos compuestos. La utilización de tensioactivos no tóxicos a concentraciones superiores a su CMC, es una buena alternativa para aumentar el reparto de dichos compuestos en fase acuosa, facilitando así su biodegradación.

El seguimiento de la población bacteriana mediante técnicas de análisis molecular (PCR y DGGE) mostró que la presencia del tensioactivo Brij 35 en el suelo, además de aumentar la biodisponibilidad de los HAPs en la fase acuosa provocaba el crecimiento de la población bacteriana de *Mycobacterium* inoculada.

La principal contribución del trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral es la demostración de que, mediante tensioactivos no tóxicos y biodegradables, es posible movilizar la fracción de HAPs de desorción lenta, haciéndola más biodisponible para las poblaciones degradadoras. Por tanto, la adecuada elección de un tensioactivo, de su concentración, así como de la especie bacteriana capaz de degradar los HAPs presentes en el suelo en presencia de tensioactivos, son sin lugar a dudas, los factores más importantes a tener en cuenta a la hora de aplicar técnicas de biorecuperación en un suelo contaminado por HAPs

**CAPÍTULO I:  
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES  
BIBLIOGRÁFICOS.**

## I.1 INTRODUCCIÓN.

El interés del ciudadano por el medio ambiente ha ido creciendo desde el último cuarto del siglo XX hasta nuestros días, conforme hemos ido tomando conciencia de que los recursos de la biosfera son limitados, y que por tanto es imprescindible su buena gestión para garantizar la supervivencia del hombre en este planeta. Algunas de las posibles soluciones, para gestionar de forma sostenible el medio ambiente, pasan por el desarrollo de nuevas tecnologías. En los últimos años, muchos países europeos, así como del resto del mundo, han coincidido en el hecho de afrontar el serio problema de la degradación de los suelos y de sus aguas subterráneas. El término suelo puede ser definido como la capa superior de la corteza terrestre, situada entre el lecho rocoso y la superficie, compuesta de partículas minerales, materia orgánica, agua, aire y organismos vivos. El suelo constituye la interfase entre la tierra, el aire y el agua, lo que le confiere capacidad de desempeñar tanto funciones naturales como de uso. En el caso de la descontaminación de suelos es habitual el empleo de tecnologías basadas en procesos físico-químicos pero cada vez es más generalizado el empleo de bioprocesos entre los que caben destacar la biorrecuperación, principalmente por su bajo coste.

La situación actual de los suelos es el resultado de más de 150 años de actividad industrial, desarrollada con una concienciación ambiental limitada, y que ha provocado que, por ignorancia o falta de recursos, se hayan vertido grandes cantidades de contaminantes al ambiente. Este deterioro, ha sido la voz de alarma que ha despertado la preocupación de los dirigentes sobre las medidas que hay que plantear para preservar algunos recursos bastante escasos en determinadas ocasiones. Los problemas de contaminación de terrenos y aguas subterráneas a gran escala, son las consecuencias directas del desarrollo de nuestra moderna sociedad industrializada. Desde 1962, los ingenieros, científicos y el público, han venido adquiriendo un mayor conocimiento sobre los efectos, difícilmente detectables, que una exposición prolongada a compuestos tóxicos, presentes en el medio ambiente, tiene sobre todas las formas de vida. Desde comienzos del siglo XX, los ingenieros medioambientales y los científicos han ampliado ininterrumpidamente su campo de actuación, desde la provisión de aguas limpias, fiables y estéticamente agradables destinadas al consumo y el tratamiento de aguas residuales para la protección de la salud humana, hasta la inclusión de mejoras de los medios acuáticos y atmosféricos y, recientemente, de la regeneración de los terrenos y acuíferos contaminados. Desde 1970, en la mayoría de los países industrializados, el tratamiento de emplazamientos contaminados ha venido cobrando cada vez más importancia hasta tal punto, que actualmente la regeneración de terrenos y aguas subterráneas contaminadas se ha convertido en una importante industria en todo el mundo.

## **I.2 CONTAMINACIÓN DE SUELOS POR HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) constituyen un importante grupo de contaminantes que están presentes, de manera muy amplia, en el medio ambiente (67, 73, 110). Dado además el probado carácter nocivo que tienen estos compuestos, se hace cada vez más necesario su estudio, así como el desarrollo de las herramientas adecuadas para su control en el medio ambiente.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son compuestos muy recalcitrantes y se encuentran principalmente en el petróleo y en algunos de sus derivados (18). Son bien conocidos como compuestos cancerígenos tanto para los humanos como para otros organismos vivos, lo cual hace que la biorrecuperación de lugares contaminados con estos hidrocarburos sea de gran interés. Estos compuestos son producidos principalmente por actividades industriales tales como el procesamiento, almacenamiento y combustión del petróleo. 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. De hecho, en la lista confeccionada por la EPA en la que recogen los 129 compuestos orgánicos que deben ser monitorizados en los vertidos industriales y municipales, hay recogidos 16 HAPs, que se intuye son los más peligrosos para la salud. Así, serán estos 16 HAPs y su persistencia en el suelo el objeto de este estudio: acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[ghi]perileno, benzo[a]pireno, criseno, dibenzo[ah]antraceno, indeno[1,2,3-cd]pireno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, naftaleno y pireno.

### **I.2.1 Estructura y propiedades de los HAPs.**

La estructura de los HAPs está basada en dos o más anillos de benceno, dispuestos en diferentes configuraciones, pero siempre con la presencia exclusiva de carbono e hidrógeno. Estos compuestos 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.

La estructura aromática de estos compuestos, así como otras características químicas hacen que los HAPs sean altamente hidrofóbicos, con relativa baja solubilidad en agua y con gran tendencia a adsorberse en la superficie de las partículas orgánicas del suelo (30). Estas características son dos de los factores más importantes en la persistencia de estos compuestos en el suelo, como demuestran los numerosos estudios que relacionan la proporción de biodegradación de los HAPs con su peso molecular (50, 62). 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, carga, polaridad y solubilidad en agua) y las propiedades del terreno (contenido en arcillas y compuestos orgánicos, pH, humedad y temperatura).

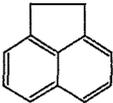
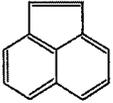
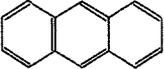
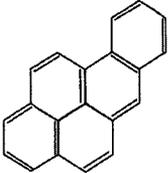
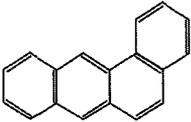
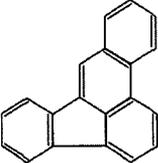
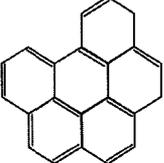
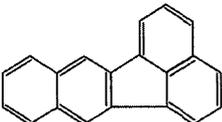
La presencia en el suelo de líquidos en fase no acuosa ("nonaqueous phase liquids" - NAPLs) puede afectar notablemente la degradación de compuestos hidrofóbicos,

## *Introducción*

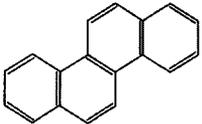
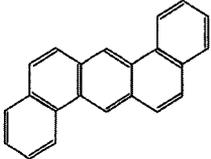
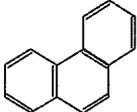
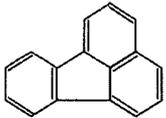
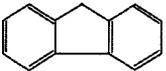
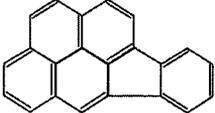
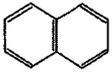
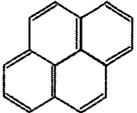
ya que estos se acumulan en dichas fases liberándose muy lentamente. Las mezclas de NAPLs, son liberadas a los suelos de muchas formas, por ejemplo como pérdidas de tanques subterráneos de gasolina, alquitrán presente en los suelos de las instalaciones de gasificación del carbón y bifenilos policlorados (PCBs) liberados como residuos industriales. De esta forma, las NAPLs constituyen una fuente de contaminación a largo plazo, si sus constituyentes pasan por reparto a la fase acuosa.

En la Tabla I.1, se muestra la estructura de los 16 HAPs estudiados, el nombre abreviado que se empleará para cada uno, el peso molecular, así como una relación de materiales donde pueden ser encontrados. A continuación, en la Tabla I.2, se recogen algunas propiedades físicas de los HAPs estudiados en este trabajo.

Tabla I.1 HAPs estudiados y materiales donde es posible encontrarlos.(49)

HAP	Fórmula	PM	Materiales en los que puede estar presente
Acenaffeno (Ace)		154	Asfaltos, humo de tabaco, aguas y lodos.
Acenafileno (Acel)		152	Aguas y derivados del petróleo.
Antraceno (Ant)		178	Combustibles, gases de escape de motores, aire, humo de tabaco, vegetales, lodos, carne ahumada y asada, pescado, aguas y suelo.
Benzo[a]pireno (BaP)		252	Combustibles, gases de escape de motores, aire, humo de tabaco, vegetales, lodos, pescados, aguas y suelos.
Benzo[a]antraceno (BaA)		228	Combustibles, gases de escape de motores, aire, humo de tabaco, vegetales, lodos, carne ahumada y asada, pescado, aguas y suelo.
Benzo[b]fluoranteno (BbF)		252	Combustibles, gases de escape de motores, aire, aguas, suelo, carne ahumada y asada, pescado, humo de tabaco, lodos, vegetales y gases de sistemas de calefacción a base de carbón.
Benzo[ghi]perileno (Bper)		276	Combustibles, gases de escape de motores, aire, aguas, suelo, carne ahumada y asada, pescado, humo de tabaco, vegetales y otros alimentos.
Benzo[k]fluoranteno (BkF)		252	Combustibles, gases de escape de motores, aire, aguas, suelos, carne ahumada y asada, pescado, humo de tabaco, lodos, vegetales y gases de sistemas de calefacción a base de carbón.

**Tabla I.1** (continuación)- HAPs estudiados y materiales donde es posible encontrarlos.

HAP	Fórmula	PM	Materiales en los que puede estar presente
<b>Criseño (Cri)</b>		228	Agua, gases de escape de automóviles, humo de tabaco, alimentos, combustión de carbón y gases procedentes de calefacción a base de aceites.
<b>Dibenzo[ah]antraceno (DbA)</b>		278	Gases de escape de automóviles, aire, agua, suelo, alimentos, humo de tabaco, lodos y vegetales.
<b>Fenantreno (Fen)</b>		178	Combustibles, gases de escape de motores, aire, humo de tabaco, lodos, carne ahumada y asada, pescado, agua y suelos.
<b>Fluoranteno (FluA)</b>		202	Combustibles, gases de escape de motores, aire, humo de tabaco, vegetales, lodos, carne ahumada y asada, agua y suelos.
<b>Fluoreno (Flu)</b>		166	Combustibles, gases de escape de motores, aire, humo de tabaco, vegetales, lodos, carne ahumada y asada, pescado, agua y suelos.
<b>Indeno[1,2,3-cd]pireno (InP)</b>		276	Combustibles, gases de escape de motores, aire, humo de tabaco, vegetales, lodos, carne ahumada y asada, pescado, agua y suelos.
<b>Naftaleno (Naf)</b>		128	Refinados del petróleo, destilados del carbón y alquitrán, agua, aire, alimentos, humo de tabaco y leche materna.
<b>Pireno (Pir)</b>		202	Combustibles, gases de escape de motores, aire, humo de tabaco, vegetales, lodos, carne ahumada y asada, pescado, agua y suelos.

**Tabla 1.2** *Oropiedades físico-químicas de los HAPs.*

	<b>Fórmula</b>	<b>CAS</b>	<b>Pto. fusión (° C)</b>	<b>Pto. ebullición (° C)</b>	<b>Presión de vapor (a 25° C)</b>	<b>Solubilidad en agua (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Solubilidad en disolventes orgánicos</b>
<b>Ace</b>	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	83-32-9	95	279	3 x 10 <sup>-1</sup>	1,93	Soluble en alcohol, metanol, propanol, cloroformo, benceno, tolueno y ácido acético glacial
<b>AceI</b>	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	208-96-8	92 – 93	280	9 x 10 <sup>-1</sup>	3,93	Soluble en alcohol, éter y benceno
<b>Anf</b>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	120-12-7	216,4	342	1 x 10 <sup>-3</sup>	0,076	Soluble en acetona, benceno, tetracloruro de carbono, cloroformo, éter, etanol, metanol y tolueno
<b>BaP</b>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	50-32-8	178,1	496	7.0 x 10 <sup>-7</sup>	2,3 x 10 <sup>-3</sup>	Soluble en benceno, tolueno, xileno y éter. Muy poco soluble en etanol y metanol
<b>BaA</b>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	56-55-3	160,7	400	2.8 x 10 <sup>-5</sup>	0,010	Muy soluble en benceno. Soluble en acetona y dietil éter. Poco soluble en ácido acético glacial y etanol
<b>BbF</b>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	205-99-2	168,3	481	6.7 x 10 <sup>-5</sup>	0,0012	Poco soluble en benceno y acetona
<b>Bper</b>	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	191-24-2	277	550	-	2,6 x 10 <sup>-4</sup> (a 25° C)	Soluble en benceno, diclorometano y acetona
<b>BkF</b>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	207-08-9	215,7	480	5.2 x 10 <sup>-6</sup>	7,6 x 10 <sup>-4</sup> (a 25° C)	Soluble en benceno, ácido acético y etanol
<b>CrI</b>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	218-01-9	253,8	448	5.7 x 10 <sup>-7</sup>	2.8 x 10 <sup>-3</sup>	Soluble en benceno. Poco soluble en acetona, dietil éter, etanol, ácido acético glacial y tolueno

**Tabla I.2** (Continuación)- *Propiedades físico-químicas de los HAPs.*

	<b>Fórmula</b>	<b>CAS</b>	<b>Pto. fusión (° C)</b>	<b>Pto. ebullición (° C)</b>	<b>Presión de vapor (a 25° C)</b>	<b>Solubilidad en agua (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Solubilidad en disolventes orgánicos</b>
<b>DbA</b>	C <sub>24</sub> H <sub>14</sub>	53-70-3	266,6	524	3.7 x 10 <sup>-8</sup>	5 x 10 <sup>-4</sup>	Soluble en acetona, ácido acético, benceno, tolueno y xileno. Poco soluble en etanol
<b>Fen</b>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	85-01-8	100,5	340	2 x 10 <sup>-2</sup>	1,20	Soluble en ácido acético glacial, benceno, tetracloruro de carbono, dietil éter anhidro, etanol, tolueno
<b>Flua</b>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	206-44-0	108,8	375	1.2 x 10 <sup>-3</sup>	0,20 - 0,26	Soluble en etanol, éter, benceno y ácido acético
<b>Flu</b>	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	86-73-7	115 - 116	295	9 x 10 <sup>-2</sup>	1,68 - 1,98	Soluble en ácido acético, acetona, benceno, tetracloruro de carbono, dietil éter, etanol, pirimidina y tolueno
<b>InP</b>	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	193-39-5	163,6	536	1.3 x 10 <sup>-8</sup>	0,062	Soluble en disolventes orgánicos en general
<b>Naf</b>	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	91-20-3	80,2	217	-	-	Soluble en disolventes orgánicos en general
<b>Pir</b>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	129-00-0	150,4	393	6.0 x 10 <sup>-4</sup>	0,077	Soluble en benceno, dietil éter, etanol, éter del petróleo y tolueno

## I.2.2 ORIGEN DE LOS HAPs.

El origen de los hidrocarburos policíclicos aromáticos es muy diverso, aunque básicamente pueden diferenciarse tres fuentes distintas:

- *Origen pirolítico*, procedente de la combustión incompleta de la materia orgánica, reciente o fósil, bien por causas naturales (incendio de bosques, erupciones volcánicas, etc.) o antropogénicas (utilización de combustibles fósiles, incineración de residuos, emisiones de vehículos, procesos industriales de gasificación y licuefacción del carbón, "cracking" del petróleo, etc.).
- *Origen petrogénico*, producido por vertidos accidentales o intencionados de derivados del petróleo, caracterizados por ser mezclas complejas.
- *Origen diagenético* de la materia orgánica sedimentaria, la cual puede sufrir una serie de procesos geoquímicos naturales, como son la descarboxilación, aromatización, etc. Para convertirse en hidrocarburos de origen natural.

Los grandes volúmenes de contaminantes que habitualmente penetran en el terreno lo hacen principalmente desde depósitos de almacenamientos subterráneos, vertederos, y balsas de residuos que sufren pérdidas, siendo por tanto el origen petrogénico el de mayor consideración en la contaminación de los suelos.

Las industrias ubicadas en localidades rurales a menudo se han desecho de las materias residuales "por la puerta de atrás", obteniendo como resultado una contaminación importante del terreno y de las aguas subterráneas. Este es el caso del emplazamiento estudiado en ésta tesis, donde las actividades de conservación de madera, tratada con creosota, destinada a ser utilizada en los railes de RENFE, provocó derrames en el suelo y la consecuente contaminación del terreno.

### I.2.2.1 ¿Qué es la creosota?

Creosota es el nombre usado para describir una variedad de productos, tales como el alquitrán mineral, la creosota de madera, creosota de alquitrán de hulla, alquitrán de hulla, brea de hulla y sus compuestos volátiles. Estos productos son mezclas de muchas sustancias químicas que se originan al quemar madera de haya y otras maderas, carbón, o de la resina del arbusto creosota conocido como chaparral. La creosota de alquitrán de hulla es un líquido viscoso de textura aceitosa, típicamente de color entre ámbar y negro. Este tipo de creosota es el preservativo de madera de más uso en Estados Unidos y lo fue en España hace unos 100 años, pudiendo ser liberada al agua y al suelo como resultado de dicha utilización. La creosota se obtiene fundamentalmente por procesos de destilación entre 200 y 400 °C de alquitranes procedentes de la combustión (900 – 1200 °C) de carbones grasos (hulla). La creosota es una mezcla compleja de más de 200 compuestos de diferentes pesos moleculares y polaridades. Su composición exacta depende de la materia prima de la que se ha obtenido, pero en general, está

## Introducción

compuesta de aproximadamente el 85 % de HAPs, 10 % de compuestos fenólicos y 5 % de compuestos con heterociclos de nitrógeno, azufre y oxígeno en sus moléculas (86). La tabla I.3 muestra la proporción en la que se encuentran los HAPs más abundantes en la creosota.

Los componentes de la creosota que no se disuelven en agua, permanecerán en el mismo lugar en forma de masa similar al alquitrán, pero los que sí se disuelven pueden moverse a través del agua subterránea, pudiendo entrar en contacto con los seres vivos.

**Tabla I.3** Hidrocarburos aromáticos policíclicos más abundantes en la creosota (88).

HAPs	Porcentaje en peso del Total de HAPs
Naftaleno	13
Antraceno	13
2-Metilnaftaleno	13
Fenantreno	13
Bifenilo	8
Fluoreno	8
1-Metilnaftaleno	8
2,3- Dimetilnaftaleno	4
2,6- Dimetilnaftaleno	4
Acenafteno	4
Fluoranteno	4
Criseno	2
Pireno	2
Antraquinona	1
2-Metilantraceno	1
2,3- Benzo(b)fluoreno	1
Benzo(a)pireno	1
<b>Total (%) HAPs en la Creosota</b>	<b>100</b>

### I.2.2.2 Legislación vigente sobre el uso de la creosota.

La Comisión Europea adoptó el pasado 26 de Octubre de 2002 una nueva Directiva prohibiendo las ventas del protector de la madera a base de creosota, después de que un comité científico de la Unión Europea concluyera, en función de los resultados obtenidos en estudios recientes, que la creosota tiene un gran potencial para crear cáncer. Este potencial parece ser mayor de lo que se

pensaba hasta ese momento y excede los límites permitidos por la legislación vigente hasta entonces. La prohibición se hizo efectiva el 30 de Junio de 2003, y también es aplicable a los productos tratados con creosota. A partir de entonces, la creosota todavía se podrá emplear para aplicaciones industriales, como por ejemplo en traviesas de ferrocarril o postes de luz y teléfono, pero con restricciones en su composición, aunque durante los últimos años, parques y jardines urbanos, paseos marítimos, rampas de acceso a algunas playas y otros elementos del mobiliario urbano han reutilizado maderas procedentes de postes eléctricos y traviesas de ferrocarril como elemento funcional o decorativo.

Entre las sustancias presentes en la creosota se encuentra el benzo(a)pireno, utilizado para hacer las mezclas y considerado como uno de los compuestos más cancerígenos. Se considera que por debajo de 50 partes por millón este compuesto no es cancerígeno. Un estudio requerido por la Comisión Europea, fue presentado ante el CSTE (Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment) donde se concluyó que existen evidencias científicas para confirmar la existencia de riesgos de cáncer para los consumidores de creosota con concentraciones de benzo(a)pireno más bajas que las actualmente admitidas por la legislación de la Comisión (La Directiva 94/60/CE incluye modificaciones de la Directiva 76/769/CE relativa a la puesta en el mercado de algunas sustancias y preparaciones peligrosas) y que la valoración de dichos riesgos indicaba la necesidad de tomar medidas. La nueva directiva además de proteger a los consumidores endurecerá significativamente las restricciones en el uso industrial de la madera creosotada con una reducción de 10 veces el contenido en benzo(a)pireno recogido en la actual Directiva. Esta modificación fue recogida en el Boletín Oficial de Estado (BOE) con la publicación de la Directiva 2001/90/CE de 26 de Octubre en su volumen 261, página 38325.

El 31 de Diciembre de 2004 entró en vigor en España una nueva directiva comunitaria que limita el tratamiento de las maderas con resina del arbusto de la creosota, después de comprobar que este material entraña riesgos para la salud humana y un elevado potencial contaminante al mezclarse con otras sustancias químicas. La nueva norma de la UE limita el uso de la creosota en el tratamiento de la madera y la comercialización de madera permeabilizada mediante creosotado. Esta orden prohíbe el uso de maderas tratadas con creosota "en cualquier obra que esté en contacto directo con la población", de manera que el uso de esta madera está prohibido no sólo en los interiores de edificios, sino también en instalaciones de juegos para niños, parques, jardines y otros lugares de ocio al aire libre en los que exista un riesgo de contacto frecuente con la piel. Aunque, paradójicamente, la orden no tiene carácter retroactivo y no afecta a la madera ya tratada con creosota, ni a las obras ejecutadas con anterioridad al 31 de Diciembre de 2003. En cambio, la normativa si permite el uso de la creosota en madera destinada a usos industriales y profesionales (por ejemplo, traviesas de las vías férreas, postes de luz eléctrica, postes de teléfono, diques y vías de navegación), pero solo si contiene benzo(a)pireno y fenoles en concentraciones inferiores a las fijadas en la directiva.

La tendencia actual en España apunta hacia el abandono del creosotado como protector de la madera, tal y como ha venido ocurriendo en otros países. Desde la década de los 70 no se han instalado nuevas plantas en España y desde 1990, esta

sustancia ha ido dejando paso paulatino a otros protectores, de tipo hidrosoluble u orgánico. Actualmente sólo funcionan en España siete plantas de creosotado para el tratamiento de postes, traviesas y estacas.

### **1.2.2.3 Creosota en el suelo de Andújar.**

El emplazamiento estudiado en ésta tesis, se encuentra ubicado al Sur de España, concretamente en Andújar (Jaén). La actividad industrial de la ciudad comenzó en el año 1880, siendo la principal actividad el tratamiento de las maderas destinadas a las vías férreas, actividad que se llevaba a cabo principalmente en la estación que RENFE tenía, y tiene, ubicada en la localidad.

Parte del proceso de preparación de las maderas consistía en su tratamiento con creosota, actividad que se llevó a cabo a lo largo de toda la historia de la estación. El tratamiento consistía básicamente en apilar las maderas en el suelo y verter sobre ellas la creosota, originando la consecuente contaminación del terreno que perdura hasta nuestros días.

La creosota se encontraba almacenada en tanques subterráneos. Es sabido que en el año 1950, se produjo una fuga en uno de estos tanques y aunque tanto éste como el resto de los tanques fueron excavados y rellenados con suelo no contaminado, el emplazamiento presenta aún en la actualidad puntos con un alto nivel de contaminación.

La estación de RENFE de Andújar cesó su actividad ferroviaria en el año 1998 y actualmente se encuentra abandonada.

### **1.2.3 CINÉTICA DE DESORCIÓN DE HAPs.**

El proceso de degradación de los compuestos orgánicos presentes en un suelo normalmente muestra un comportamiento similar al de la desorción, es decir, ocurre con una primera fase de rápida degradación seguida de una segunda etapa de degradación lenta.

El mecanismo que explica este comportamiento sugiere que:

- La fracción de desorción rápida del contaminante es la que se encuentra asociada a la zona externa de los agregados del suelo, en contacto íntimo con la fase acuosa.
- La etapa de desorción lenta está regida por una difusión lenta, debida principalmente a dos factores: difusión a través de microporos y materia orgánica de la matriz del suelo y difusión a través y a lo largo del espacio entre partículas que están recubiertas de materia hidrofóbica.

Muchos autores postulan que la difusión a través de la materia orgánica del suelo actúa como paso limitante de la desorción de los compuestos orgánicos hidrofóbicos (102). El proceso de difusión a través de la materia orgánica puede ser dividido en difusión a lo largo de un dominio amorfo y difusión a través de un

dominio condensado, donde se asume que la difusión es menor. Ambos dominios presentan diferente accesibilidad, debido a que poseen diferentes densidades y rigidez. De acuerdo con Pignatello y Xing (102), la difusión predomina en los suelos y sedimentos que poseen un alto contenido en materia orgánica y presentan poca agregación, mientras que la difusión lenta debida a la difusión a través de los microporos se produce en suelos con características contrarias a las citadas anteriormente. Cornelissen *et al.* (25) comprobaron, si la baja desorción de los compuestos orgánicos hidrofóbicos (HOCs) en sedimentos era dependiente, entre otros factores, de la temperatura y en que medida el proceso de difusión se vería afectado. Los valores obtenidos para la entalpía de activación del proceso de desorción lenta ayudaron a concluir que la difusión a través de la materia orgánica podría explicar la fase de desorción lenta de los contaminantes mejor que la difusión a través de los poros.

La desorción bifásica de los HAP puede verse seriamente afectada por el tiempo de contacto entre el contaminante y la matriz del suelo. En emplazamientos contaminados donde el contaminante permaneció largos períodos de tiempo en contacto con el suelo (meses, años o incluso décadas) se ha observado, que la etapa de desorción lenta del contaminante es muy larga. Esto significa que los contaminantes de muestras envejecidas son mucho menos biodisponibles que contaminantes que están presentes en el suelo desde tiempos más recientes (2, 102).

Numerosos estudios han demostrado la influencia del tiempo de residencia del contaminante en el suelo sobre su desorción, y por tanto sobre su potencial biodisponibilidad. Beurskens *et al.* (10) compararon la desorción de los contaminantes desde la matriz del suelo a un proceso de dilución infinita mediante un sistema de purga con gas. Estudiaron un sedimento contaminado con hexaclorobenceno (HCB), así como dicho sedimento contaminado en el laboratorio artificialmente con el mismo compuesto. Tanto la desorción como la degradación fueron mucho más rápidas para el sedimento contaminado en el laboratorio que en el que presentaba la contaminación natural. En otros estudios, la desorción fue medida por dilución con agua (16, 38, 108).

Otros estudios han comparado el proceso de biodegradación de compuestos orgánicos con la desorción (10, 16, 38, 108, 130). Carmichael *et al.*, estudiaron que las proporciones en las que se producía la desorción de los HAPs añadidos artificialmente a un suelo fueron mucho mayores que la proporción en la que se produjo la biodegradación de estos (16). Sin embargo, para los HAPs presentes en el suelo, la extensión en la que se produjo la desorción fue igual o menor que su biodegradación. Los resultados obtenidos confirmaron la hipótesis de que la fase de desorción lenta es la causante de la limitada biodegradación para compuestos presentes en el suelo durante largos períodos de tiempo. Otros autores, como Rijnaart *et al.* (108), determinaron que la extensión en la que ocurría la biodegradación excedía ligeramente a la extensión en la que se producía la desorción hacia la fase acuosa, cuando ésta no era renovada. Este comportamiento fue explicado en base a que la actividad de los microorganismos podría aumentar el gradiente de concentración entre el sedimento y la fase acuosa y por tanto acelerar así el proceso de desorción del contaminante.

## Introducción

Según Cornelissen *et al.*, (23-25), el proceso de desorción de los contaminantes desde el suelo puede ser descrito siguiendo un modelo bifásico con cinética de primer orden para cada una de dichas fases, según la ecuación:

$$S_t / S_o = F_{ráp} \cdot \exp(-k_{ráp} \cdot t) + F_{len} \cdot \exp(-k_{len} \cdot t) \quad (1)$$

donde  $S_t$  y  $S_o$  son la concentración que queda en el suelo a un tiempo  $t$  (h) y la concentración presente al comienzo del experimento respectivamente.  $F_{ráp}$  y  $F_{len}$  son las fracciones de desorción rápida y lenta. Las constantes de desorción rápida y lenta son designadas como  $k_{ráp}$  y  $k_{len}$  ( $h^{-1}$ ), respectivamente.

La existencia de dos fases en el proceso de desorción, una rápida y otra lenta, podría ser debida a tres fenómenos diferentes: a) presencia de sitios de difícil accesibilidad (resistencia a la transferencia de masas); b) sitios con diferentes mecanismos de adsorción (dos o más tipos de reacciones de adsorción donde alguna de ellas sea limitante); c) sitios con diferente afinidad por el contaminante o bien con distinta proporción de reacción con él (22).

Es razonable pensar que pueda ocurrir una combinación de los tres fenómenos citados anteriormente. Las cinéticas de desorción de HAPs desde una matriz ambiental sólida (suelo, sedimento) pueden ser estudiadas utilizando Tenax. El Tenax es un polímero poroso con alta capacidad de absorción, capaz de absorber los HAPs de la matriz del suelo manteniendo la fase acuosa prácticamente libre de soluto. La extracción con Tenax es usada para determinar las fracciones de desorción rápida y lenta del contaminante, siendo la fracción de desorción rápida, la que predice en qué extensión puede ocurrir la biodegradación. Esto es posible gracias a que el Tenax posee un comportamiento muy similar al de los microorganismos, en el sentido en que ambos aumentan el gradiente de concentración de HAPs en la interfase suelo – agua, permaneciendo en todo momento la fase acuosa libre de contaminante. Es por tanto factible pensar, que una comparación entre la fracción de desorción rápida de los HAPs y la fracción que es realmente biodegradada por los microorganismos permite conocer si la etapa de desorción lenta del contaminante es la causante de su limitada biodegradación. Este estudio podría proporcionar información a cerca de en qué medida es viable la biorremediación de un suelo o sedimento específico conociendo previamente la extensión en la que se produce la desorción de los contaminantes. Para nuestro conocimiento, no existen estudios con HAPs que relacionen la cinética de desorción mediante Tenax con el efecto de los tensioactivos sobre la biodisponibilidad de estos contaminantes para poblaciones microbianas degradadoras.

### 1.2.4 TOXICIDAD DE LOS HAPs. EFECTOS SOBRE LA SALUD HUMANA

La presencia de HAPs en el organismo puede ser peligrosa para la salud bajo determinadas circunstancias. Está demostrado que algunos HAPs como benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, criseno, dibenzo[ah]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno, provocan tumores en animales de laboratorio cuando inhalan este tipo de sustancias con el aire, cuando

ingieren alimentos contaminados con este tipo de compuestos, o cuando entran en contacto con los HAPs durante largos períodos de tiempo. También se han observado efectos dañinos en la piel, en los fluidos corporales y en el sistema inmunitario. Aunque se intuye que estos efectos nocivos son trasladables al hombre, aún no se conoce totalmente en qué grado afectan los HAPs a los humanos, y en cualquier caso, cuáles son los niveles de exposición necesarios para provocar algún tipo de disfunción en el organismo de una persona.

A pesar de que el estudio de este tipo de compuestos y sus efectos sobre la salud humana comienza de manera reciente, sí existen organismos de reconocido prestigio internacional que ya se han pronunciado acerca de la toxicidad de los HAPs. Así, el Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos ha determinado que benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[ah]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno son agentes cancerígenos para los animales. Por su parte, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC) ha dictaminado que benzo[a]antraceno y benzo[a]pireno son compuestos que muy probablemente sean cancerígenos para los humanos, mientras que benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno e indeno[1,2,3-cd]pireno, son compuestos posiblemente cancerígenos y que otros HAPs como antraceno, benzo[ghi]perileno, criseno, fluoranteno, benzo[e]pireno, fluoreno, fenantreno y pireno, no tienen hasta el momento comprobado de manera definitiva su efecto cancerígeno sobre los humanos. Esto puede observarse de manera resumida en la tabla I.4.

En cuanto a los niveles máximos permitidos, aún no existe legislación al respecto ni en la Unión Europea ni en España, si bien pueden tomarse como referencia valores índice que proponen algunos organismos, sobre todo para niveles de exposición en el trabajo, que es donde de manera más frecuente un individuo puede estar expuesto a los HAPs. Un ejemplo de ello sería el hecho de que el Instituto Nacional para la Seguridad y la Salud en el Trabajo (National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH), ha concluido que la exposición a productos del carbón puede aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón o de piel en los trabajadores de este sector. Por ello establece como límite recomendado de exposición para estos trabajadores 0,1 mg de HAPs por metro cúbico de aire inhalado (0,1 mg m<sup>-3</sup>) durante una jornada de trabajo de 10 horas por día ó 40 horas por semana. Por su parte, para los trabajadores del sector del petróleo, el límite se establece en 5 mg m<sup>-3</sup> para una jornada laboral de 8 horas al día.

**Tabla I.4** Índices de carcinogénesis establecidos para cada HAP.

HAP	Humanos	Animales
Acenafteno	-	-
Acenaftileno	-	-
Antraceno	3	I
Benzo[ <i>a</i> ]pireno	2A	S
Benzo[ <i>a</i> ]antraceno	2A	S
Benzo[ <i>b</i> ]fluoranteno	2B	S
Benzo[ <i>ghi</i> ]perileno	3	I
Benzo[ <i>k</i> ]fluoranteno	2B	S
Criseno	3	L
Dibenzo[ <i>ah</i> ]antraceno	2A	S
Fenantreno	3	I
Fluoranteno	3	-
Fluoreno	3	-
Indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pireno	2B	S
Naftaleno	-	-
Pireno	3	I

2A: probablemente cancerígeno; 2B: posiblemente cancerígeno  
 3: no clasificable I: evidencias inadecuadas de carcinogénesis;  
 L: evidencias al límite; S: evidencias suficientes

### I.2.5 LEGISLACIÓN VIGENTE SOBRE SUELOS CONTAMINADOS POR HAPs.

El suelo constituye uno de los medios receptores de la contaminación más sensibles y vulnerables. El problema de la contaminación de los suelos está especialmente agravado debido a la industria, sobre todo la contaminación producida por la industria química y petroquímica. Para intentar remediar ésta situación, grave en países como Estados Unidos, Alemania, Holanda o Bélgica, se empezaron a adoptar medidas a principios de la década de los 80 del siglo XX. Así, en Estados Unidos, se adoptó la normativa CERCLA que dio lugar a la creación del denominado "superfund". Esta legislación implicaba el establecimiento de la responsabilidad objetiva, principio éste que se ha importado a la actual legislación española. Esta responsabilidad era de carácter retroactivo sobre los causantes de estas situaciones, obligándoles a su reparación. Solo cuando se desconocía el origen de los depósitos, intervenía la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA), utilizando recursos provenientes del fondo de subvenciones públicas abonadas por las industrias petroquímicas y químicas (84).

La Agencia Europea de Medio Ambiente (AEMA) estimó en 1999 entre 300.000 y 1.500.000 el número de zonas o áreas contaminadas en Europa occidental. En España, la problemática específica de los suelos contaminados como consecuencia de previas actividades industriales que originaron vertidos, es abordada, por el "Plan Nacional de Residuos Industriales 1989-1993", antecedente del vigente "*Plan Nacional de Recuperación de Suelos Contaminados 1995-2005*". El mencionado Plan pone de relieve la gravedad de la situación existente en materia de contaminación de suelos, detectando 4532 emplazamientos en el país identificados como potencialmente contaminados (de los cuales 618 se encuentran en la Comunidad Autónoma de Andalucía) por razón del tipo, concentración de contaminantes y potencial dispersión de los mismos, el sistema biofísico y antrópico en el que se encuentran y la vulnerabilidad que presentan estos medios.

Con la implantación del Plan, la situación ha sido sustancialmente mejorada por la aprobada Ley de Residuos de 1998. En dicha Ley se considera suelo contaminado, como "*todo aquel cuyas características físicas, químicas o biológicas han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes de carácter peligroso de origen humano, en concentración tal que comporte un riesgo para la salud humana o el medio ambiente, de acuerdo con los criterios y estándares que se determinen por el Gobierno*".

La gestión de los suelos contaminados, según la citada Ley 10/1998, será una competencia compartida entre la Administración del Estado y la Administración de las Comunidades Autónomas, siendo éstas últimas las encargadas de declarar, delimitar y hacer un inventario de los suelos contaminados, elaborar una lista de prioridades de actuación, establecer criterios que permitan definir la periodicidad para la elaboración de los informes de situación del suelo, así como declarar si un suelo ha dejado de estar contaminado tras comprobar que se han realizado las operaciones de limpieza y recuperación de forma adecuada.

Según el informe publicado por la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, en el año 2003, sobre "Contaminación de suelos por compuestos orgánicos", para considerar que un suelo no ha sido contaminado por dichos compuestos se deberán satisfacer todas y cada una de las siguientes consideraciones

a) Las concentraciones de contaminantes existentes en el suelo deben ser inferiores a los niveles genéricos de referencia para la protección de la salud humana y de los ecosistemas, definidos para el uso/usos propuestos, para cada uno de los siguientes contaminantes:

- Compuestos característicos en vertederos urbanos, derivados de petróleo agrupados por fracciones y separados por los compuestos que componen las distintas fracciones, fitosanitarios y otros compuestos seleccionados por sus características toxicológicas y no englobados en los grupos anteriores (tabla I.5).
- Aquellas no incluidas en la clasificación anterior que puedan ser de interés en casos particulares para ese suelo.

## Introducción

b) En los casos en los que no se dispongan de niveles de referencia para estas sustancias, y en tanto se fijen éstos, la concentración no deberá de exceder el valor medio local más de dos veces la desviación estándar.

En los demás casos se considerará al suelo como potencialmente contaminado, teniéndose que realizar una evaluación sobre la gravedad de la contaminación para determinar la necesidad de implantar acciones correctivas.

Recientemente con fecha 18 de Enero de 2005 ha sido publicado en el Boletín Oficial del Estado (BOE núm.15 pag 1833) el Real Decreto (9/2005) por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. Con el presente Real Decreto se da cumplimiento a lo previsto por la Ley de Residuos, habiendo sido consultadas previamente las Comunidades Autónomas. En los anejos de dicho Real Decreto se publica la relación de actividades susceptibles de causar contaminación en el suelo, así como los criterios y estándares que permiten decidir si un suelo está o no contaminado. Además se regulan los llamados niveles genéricos de referencia, parámetros básicos que se utilizarán para la evaluación de la contaminación del suelo por determinadas sustancias. Entre las actividades potencialmente contaminantes contempladas en dicho proyecto de Ley figura la preparación industrial de la madera (CNAE93-Rev1 20.10). La tabla I.6 muestra los niveles establecidos para HAPs.

**Tabla I.5** Niveles genéricos de referencia (NGR) determinados para derivados de petróleo: a) agrupados por fracciones y b) separados por los compuestos que componen las distintas fracciones.(\*). NGR teniendo en cuenta sólo las vías de ingestión y contacto dérmico. Informe final "contaminación de suelos contaminados por compuestos orgánicos". Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía 2003.

a)	Nº de carbonos equivalentes	Uso industrial (mg/kg)	Sin restricción de uso (mg/kg)
Fracciones alifáticas*	> 5-6 y > 6-8	$2.6 \times 10^6$	$3.0 \times 10^5$
	> 8-10, > 10-12 y > 12-16	$4.0 \times 10^4$	$6.0 \times 10^3$
	> 16-35	$7.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$
Fracciones aromáticas*	> 7-8	$7.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$
	> 8-10, > 10-12 y > 12-16	$1.0 \times 10^4$	$2.0 \times 10^3$
	> 16-35	$1.0 \times 10^4$	$2.0 \times 10^3$

b)	Compuesto orgánico	Uso industrial (mg/kg)	Sin restricción de uso (mg/kg)
Alifática EC <sub>5</sub> - EC <sub>8</sub>	n - Hexano	100	80
	Benceno	1.5	0.65
Aromática EC <sub>6</sub> - EC <sub>9</sub>	Etilbenceno	$2.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$
	Tolueno	$6.0 \times 10$	$4.0 \times 10^2$
	Xileno	$1.0 \times 10^3$	$9.0 \times 10^2$
Aromática EC <sub>&gt;9</sub> - EC <sub>16</sub>	Acenafteno	$2.2 \times 10^4$	$2.0 \times 10^3$
	Acenaftileno	$3.8 \times 10^4$	$3.7 \times 10^3$
	Bifenilo	$1.8 \times 10^4$	$1.0 \times 10^3$
	Naftaleno	$5.0 \times 10^1$	$4.0 \times 10^1$
	1,2,5-Trimetilbenceno	$2.0 \times 10^1$	$1.0 \times 10^1$
Aromática EC <sub>16</sub> - EC <sub>35</sub> HAPs	Antraceno	$3.0 \times 10^5$	$2.0 \times 10^4$
	Benzo (a) antraceno	2.9	$3.4 \times 10^{-1}$
	Benzo (a) pireno	$2.9 \times 10^{-1}$	$3.9 \times 10^{-2}$
	Benzo (b) fluoranteno	3.9	0.1
	Benzo (k) fluoranteno	$3.9 \times 10^1$	3.4
	Criseno	$2.9 \times 10^2$	$3.4 \times 10^1$
	Dibenzo (a,h) antraceno	$2.9 \times 10^{-1}$	$3.4 \times 10^{-2}$
	Fluoranteno	$2.0 \times 10^4$	$2.0 \times 10^3$
	Fluoreno	$2.0 \times 10^4$	$3.0 \times 10^3$
	Indeno (1,2,3-c,d) pireno	4.0	$3.4 \times 10^{-1}$
	Pireno	$3.0 \times 10^4$	$2.0 \times 10^3$

## Introducción

**Tabla 1.6** Listado de contaminantes y niveles genéricos de referencia para protección de la salud humana en función del uso del suelo. (-) Compuestos no reflejados en el listado. (\*\*) En aplicación del criterio de reducción. (\*\*\*) En aplicación del criterio de contigüidad

SUSTANCIA	PROTECCIÓN DE LA SALUD HUMANA			
	HAPs	Uso industrial	Uso urbano (mg/kg peso seco)	Otros usos
Naftaleno		10	8	1
Acenaffileno		-	-	-
Acenaffeno		100**	60***	6
Fluoreno		100**	50***	5
Fenantreno		-	-	-
Antraceno		100**	100**	45
Fluoranteno		100**	80***	8
Pireno		100**	60***	6
Benzo(a)antraceno		20***	2***	0.2
Criseno		100**	100**	20
Benzo(b)fluoranteno		20***	2***	0.2
Benzo(k)fluoranteno		100**	20***	2
Benzo(a)pireno		2***	0.2***	0.02
Dibenzo(ah)antraceno		3***	0.3***	0.03
Benzo(ghi)perileno		-	-	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno		30***	3***	0.3

### I.3 BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS.

La recuperación de terrenos o aguas subterráneas mediante procesos biológicos capaces de transformar o fijar contaminantes (**biorrecuperación o biorremediación**) constituye un campo de la ingeniería ambiental que está evolucionando y expandiéndose rápidamente. El empleo de la biorrecuperación en el tratamiento de los residuos peligrosos, supone un concepto relativamente nuevo, aunque se ha convertido en una tendencia de rápido crecimiento dentro de la gestión ambiental, debido entre otras razones a que los tratamientos biológicos son más económicos que los procedimientos químicos o físicos, como por ejemplo, incineración, lavado y ventilación (35).

En los últimos años, los sistemas de tratamientos biológicos han sido empleados en la eliminación de contaminantes en el suelo, agua y atmósfera. El término *biorrecuperación* es empleado para describir gran número de sistemas de ingeniería que utilizan microorganismos para degradar principalmente compuestos químicos orgánicos. Durante los últimos años, la mayor parte de los estudios publicados sobre biorrecuperación, se han referido al tratamiento de terrenos contaminados con compuestos derivados del petróleo, entre los que caben destacar los hidrocarburos aromáticos policíclicos, e incluso se han aplicado técnicas de bioremediación en numerosos emplazamientos contaminados con petróleo y creosota en Europa y Norte de América (11, 34). Este creciente interés por los tratamientos biológicos se debe en parte a que la mayoría de estos compuestos son relativamente fáciles de degradar y al gran número de emplazamientos contaminados con hidrocarburos resultantes de fugas en depósitos de almacenamiento subterráneos, vertederos, balsas de vertidos de residuos que sufren pérdidas, así como derrames fortuitos e intencionados. La degradación de los contaminantes orgánicos por parte de los microorganismos constituye un proceso que se produce en la naturaleza y que se encuentra limitado por restricciones químicas, físicas, medioambientales y del propio suelo. La efectividad de los tratamientos biológicos depende, en gran medida, del tipo de contaminante presente, las propiedades del suelo, la actividad microbiana, y condiciones redox existentes (35).

El objetivo de la biorrecuperación es la biodegradación de los contaminantes por parte de microorganismos, plantas y animales, los cuales mediante su actividad metabólica asimilan o modifican todo tipo de sustancias presentes en el medio ambiente. Normalmente, el término biodegradación suele referirse a compuestos orgánicos, pero también es posible la biodegradación de compuestos inorgánicos. Los procesos biodegradativos más comunes suelen llevarse a cabo en presencia de oxígeno (biodegradación aerobia), aunque algunos microorganismos son capaces también de degradar compuestos en ausencia de éste (biodegradación anaerobia). Cuando el proceso de biodegradación ocurre originando compuestos de naturaleza inorgánica e inoocuos a partir de contaminantes orgánicos (dióxido de carbono o algún otro gas o sustancia inorgánica, agua y material celular para los organismos responsables de la degradación del contaminante) se denomina mineralización.

## Introducción

La biorrecuperación de terrenos contaminados puede llevarse a cabo *in situ*, o bien se puede excavar el terreno y tratarlo a pie de excavación o en instalaciones de tratamiento aparte. Las tres técnicas generales de degradación microbiana aplicadas a suelos y sedimentos contaminados con HAPs son: bioreactores, tratamientos en fase sólida y tratamientos *in situ*, cada una de ellas con características concretas. En el bioreactor, el suelo contaminado se transforma en fango por adición de agua y es tratado bajo condiciones óptimas para que se produzca la biodegradación de forma efectiva (pH, oxígeno, nutrientes, agitación). Los bioreactores pueden ser inoculados con cultivos enriquecidos, aclimatados y específicos para la degradación un determinado tipo de contaminante. Esta técnica es de mayor coste que la remediación en fase sólida sin embargo su tiempo de aplicación es menor.

La biorremediación en fase sólida es definida como el tratamiento de suelos y sedimentos contaminados llevado a cabo en sistemas de contenedores situados en la superficie del suelo en los que se llevan a cabo prácticas convencionales en el tratamiento de suelos, tales como labrado, aireación, regado y fertilización, para aumentar la degradación microbiana del contaminante. Pueden diferenciarse varias estrategias de biorremediación en fase sólida, desde técnicas extensivas como "landfarming" hasta otras más intensivas como celdas o biopilas.

La biorremediación *in situ* puede ser definida como la estimulación de la microflora nativa del suelo para degradar compuestos orgánicos considerados contaminantes a través del manejo pasivo de parámetros medioambientales, sin necesidad de excavar el suelo. El principio de la biorremediación *in situ* es suministrar los reactivos esenciales a la microflora autóctona del suelo para facilitar la biodegradación del contaminante. Los reactivos más importantes son el oxígeno y los nutrientes inorgánicos (principalmente nitrógeno, presente en la solución del suelo). El oxígeno puede ser proporcionado como aire, oxígeno líquido o incluso como peróxido orgánico o inorgánico. El uso de corrientes de oxígeno como aire está favorecido desde el punto de vista económico y técnico. Las principales ventajas de la biorremediación *in situ* son tanto su carácter no invasivo como su bajo coste, aunque también presenta ciertas limitaciones a tener en cuenta a la hora de su aplicación, tales como limitaciones físico - químicas (biodisponibilidad y cinéticas de desorción del contaminante), geológicas (permeabilidad, conductividad hidráulica vertical y horizontal, profundidad del agua), así como el tiempo de aplicación. Además, estos sistemas pueden ser muy heterogéneos y difíciles de monitorizar. Es por ello que el tratamiento completo y su eficacia sean difíciles de verificar.

De acuerdo con lo comentado para la biorremediación *in situ*, la biodegradación de los HAPs puede conseguirse más rápidamente en bioreactores de fangos, seguida de aplicaciones en fase sólida y de estrategias *in situ*. Las características del sitio contaminado y la aplicabilidad de determinados métodos, determinarán la estrategia a seguir en la remediación del lugar, existiendo una relación directa entre la proporción de HAPs degradados, la extensión de dicha degradación y su coste.

### **1.3.1 FACTORES QUE AFECTAN A LA BIORRECUPERACIÓN.**

#### **1.3.1.1 Condiciones medioambientales del suelo.**

Los factores presentes en el entorno bacteriano juegan un papel importante en el proceso de biorrecuperación, ya que son necesarias condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos. Estos son muy sensibles a los cambios de temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, contenido en oxígeno y en humedad que puedan producirse en el suelo (3-5).

Los microorganismos responsables de la biodegradación aerobia de los HAPs, oxidan dichos compuestos, obteniendo así la energía necesaria para su crecimiento. En este proceso de oxidación de los compuestos se originan electrones cuyo aceptor final es, normalmente, el oxígeno. Los productos finales del proceso de biodegradación son principalmente el agua y el monóxido de carbono. La degradación anaerobia de ciertos HAPs (naftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno) también puede llevarse a cabo bajo condiciones reducidas de nitrato y/o sulfato en el entorno, aunque esta degradación es mucho más lenta que la biodegradación aerobia. La baja solubilidad del oxígeno en agua (9 mg/l a 20°C) y un alto contenido en humedad, por ejemplo en los intersticios saturados del suelo, pueden hacer que la disponibilidad de oxígeno en el suelo sea muy baja

El desarrollo óptimo de los microorganismos ocurre dentro de determinados intervalos de temperatura, fuera de los cuales la actividad microbiana se detiene. Las bacterias del suelo actúan habitualmente en el intervalo entre 5 y 40°C, aunque la temperatura óptima dentro de dicho rango depende de cada especie. La temperatura del suelo afecta en gran medida a la actividad microbiana y a las tasas de biodegradación. En el caso concreto de los HAPs, la temperatura óptima para la degradación bacteriana varía desde 20 a 30°C. La mayoría de los microorganismos se desarrollan mejor dentro del rango de pH de 6 a 9, encontrándose las condiciones óptimas de crecimiento entre los valores de pH 7 y 8. Los nutrientes esenciales son aquellos compuestos químicos necesarios para el crecimiento microbiano que no proporcionan energía o carbono a los organismos pero que resultan imprescindibles para su desarrollo. Los nutrientes esenciales en el crecimiento bacteriano son el nitrógeno y el fósforo, cuyas cantidades son normalmente insuficientes en las localizaciones que van a ser sometidas a procesos de biorrecuperación. El elemento esencial para el crecimiento bacteriano en ambientes naturales tales como suelos, sedimentos y aguas es el carbono. Estudios realizados por Atagana et al. (7), han demostrado que la presencia de sustancias contaminantes en el suelo, como puede ser la creosota (>250 mg/kg suelo), pueden provocar que nutrientes que no eran limitantes para el crecimiento bacteriano lleguen a serlo. La presencia de creosota en el suelo puede llegar a crear un desequilibrio en la proporción de nutrientes presentes en dicho suelo y en los que son requeridos en la biodegradación del contaminante. A partir de la cantidad de carbono transformado en biomasa por la bacteria, pueden estimarse las proporciones de nitrógeno y fósforo necesarias en la biodegradación óptima del contaminante. Leys et al. (75), determinó que la proporción C:N 25:1

aumentaba la biodegradación bacteriana de los hidrocarburos en un suelo contaminado con creosota.

La humedad del suelo es un factor de gran influencia para la actividad microbiana. El agua es el mayor componente del protoplasma bacteriano y su suministro es esencial para el crecimiento y mantenimiento de los microorganismos. El agua sirve también como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hacia el interior de las células, así como los productos metabolizados salen al exterior de la célula. El contenido suelo-agua influye en la aireación (transporte de oxígeno), en la solubilidad de los constituyentes del suelo y en el pH. Poca humedad en el suelo, da como resultado la aparición de zonas secas y por lo tanto de poca actividad bacteriana. Sin embargo, la presencia de demasiada humedad puede llegar a inhibir el intercambio de gases, dando como resultado el desarrollo de zonas anaerobias y como consecuencia la eliminación de las bacterias aerobias con el consiguiente aumento de la población anaerobia o anaerobia facultativa.

### **1.3.1.2 Propiedades físico-químicas del contaminante.**

El factor químico más importante en el proceso de biorrecuperación es la estructura molecular del contaminante, ya que ésta afecta a sus propiedades químicas, físicas y a su capacidad para ser degradado. El hecho de que un determinado contaminante sea biodegradado está relacionado con factores tales como la solubilidad, el grado de ramificación, el grado de saturación y la naturaleza y el efecto de los sustituyentes presentes en la molécula.

La solubilidad del contaminante constituye una propiedad fundamental a tener en cuenta a la hora de aplicar técnicas de biorrecuperación a un suelo contaminado, ya que los microorganismos toman los nutrientes en solución acuosa. Una elevada solubilidad se traduce en una gran disponibilidad, en potencia, de un determinado compuesto. En el caso de suelos contaminados con HAPs, es la baja solubilidad en agua de estos compuestos una de las principales limitaciones existentes para la aplicación de técnicas de biorrecuperación (105). Aunque la rotura de los enlaces carbono - carbono saturados no conlleva dificultad, el grado de saturación está relacionado con la volatilidad y la solubilidad del compuesto. Los microorganismos degradan con mayor dificultad los anillos saturados, o los alcanos muy ramificados. La razón de fondo es la especificidad de los microorganismos para sus substratos, una especificidad que está ligada, en gran parte, con la presencia o no de enzimas necesarios para catalizar sólo ciertos tipos de reacciones.

La biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos, en general ocurre de forma secuencial, según va aumentando el número de anillos de la molécula (99). Así, antraceno y fenantreno (3 anillos) son más fáciles de degradar que pireno y criseno (4 anillos). Es muy probable, que la causa de la distinta disponibilidad de estos compuestos sea, además del aumento en la complejidad de la molécula, por el aumento de hidrofobicidad conforme aumenta el número de anillos (98).

### **I.3.1.3 Contenido en arcillas del suelo.**

El alto contenido en arcillas de un suelo puede ser un factor negativo a la hora de aplicar técnicas de biorrecuperación. Los suelos con alto contenido en limo y arcillas suelen ser cohesivos, tener una gran capacidad de retención de agua y una baja permeabilidad. En el caso de suelos contaminados con compuestos hidrofóbicos, el contenido en arcillas puede ser un factor limitante de la biodisponibilidad y por tanto de la biorrecuperación de dicho suelo, ya que estos compuestos suelen estar adsorbidos principalmente a la materia orgánica del suelo, la cual está presente en alto grado en la fracción arcillosa (56, 82, 97)

La influencia de los componentes del suelo en el transporte de bacterias degradadoras es otro factor a tener en cuenta. El estudio del transporte de bacterias degradadoras de HAPs a través de medios porosos saturados fue realizado por Lahlou et al. (71). En dicho estudio, el transporte de bacterias seleccionadas, degradadoras de HAPs, se realizó mediante ensayos con columnas saturadas rellenas de suelo arcilloso, complejos ácidos húmicos-arcillas, arena o montmorillonita observándose que el transporte bacteriano variaba dependiendo del tipo de bacteria y del relleno empleado en la columna. Los resultados indicaron que la presencia de superficies arcillosas podría impedir el transporte microbiano. Este hecho podía ser remediado con la utilización de microorganismos con características concretas, como la presencia de membranas hidrofóbicas en el caso de las bacterias del género *Mycobacterium*, y/o por la adición de tensioactivos. Por tanto, la elección de microorganismos específicos y de tensioactivos no tóxicos parecen ser pasos razonables a seguir en el proceso de biorrecuperación de suelos contaminados por HAPs con altos contenidos en arcilla.

### **I.3.1.4 Población microbiana presente en el suelo. Técnicas de análisis molecular.**

La concentración y composición de la comunidad microbiana presente en el suelo pueden ser determinantes para la aplicación de técnicas de biorrecuperación a un suelo, ya que estos factores pueden influir en la tasa de transformación del contaminante.

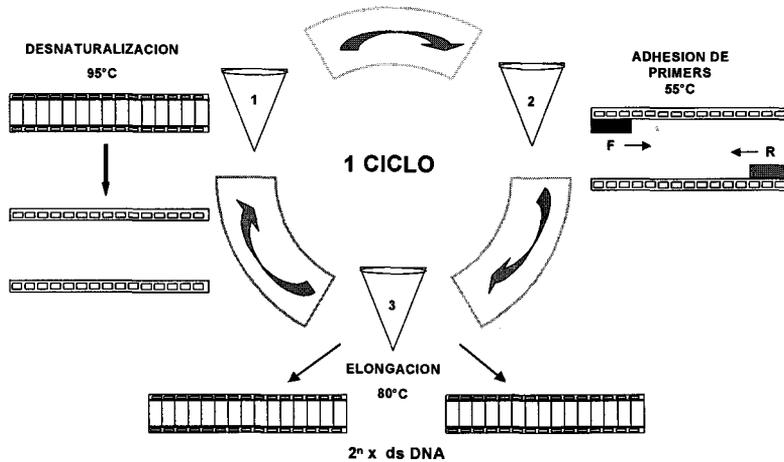
El análisis de las poblaciones microbianas mediante técnicas moleculares, proporciona información sobre qué especies microbianas se encuentran presentes en el suelo, cual o cuales de estos microorganismos son los responsables de la biodegradación del contaminante en un momento determinado del tratamiento al que se esta sometiendo el suelo y en qué concentraciones se encuentran las poblaciones en cuestión. Las técnicas de microbiología tradicional y microscopía convencional resultan insuficientes para este estudio, ya que muchas de las bacterias presentes en muestras naturales, como es el suelo, no pueden ser detectadas debido a que al encontrarse adheridas a las partículas del suelo resultan "invisibles" a estas técnicas. Por esta razón, las técnicas moleculares empleadas para el estudio de las poblaciones microbianas en el desarrollo de esta tesis han sido PCR (Polymerase Chain Reaction) y DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (93).

## Introducción

La técnica de PCR contiene metodologías que revolucionaron los métodos de biología molecular. Aunque ésta técnica se usó originalmente con fines genéticos y clínicos, actualmente también es empleada para la detección de microorganismos en muestras medioambientales. PCR, o reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction), es un procedimiento que sirve para obtener, de forma sencilla y rápida, millones de copias de un fragmento de material genético (DNA o RNA) a través de sucesivas reacciones *in vitro*. Para ello, es necesario conocer las secuencias flanqueantes que sirven para diseñar y sintetizar químicamente unas pequeñas moléculas de DNA de cadena sencilla denominados cebadores desde donde se inician las copias. El proceso de amplificación o copiado se lleva a cabo en un aparato denominado termociclador que permite programar automáticamente ciclos sucesivos de calentamiento y enfriamiento de las muestras que contienen el material genético. En cada uno de estos ciclos se produce una copia de cada molécula de DNA o RNA, gracias a la actuación conjunta de los cebadores, una enzima copiadora termo-resistente denominada polimerasa y una mezcla de distintos reactivos que permiten el trabajo de la enzima copiadora. En cada uno de estos ciclos tienen lugar las siguientes reacciones: desnaturalización y separación de las cadenas de la doble hélice del DNA bacteriano, adhesión de los cebadores a las cadenas individuales y por último, elongación de las cadenas de DNA copiadas (figura I.1).

Al final del proceso, de cada molécula de material genético se generan  $2^n$  copias, donde  $n$  es el número de ciclos que se realizan en el termociclador. De esta forma, a partir de una muestra que contenga una cantidad mínima de material genético, difícil de manejar o detectar, se puede obtener una cantidad mayor de un material idéntico al de partida, permitiendo un análisis más sencillo y sumamente preciso.

Aunque la técnica de PCR es relativamente fácil de realizar con cultivos puros de microorganismos, es mucho más difícil de llevar a cabo con secuencias de DNA extraídas de muestras ambientales tales como fangos, suelos, sedimentos, aguas marinas, aguas subterráneas y alimentos, ya que PCR puede verse afectada por algunas sustancias presentes en este tipo de muestras. La reacción producida durante el proceso de PCR en muestras de suelos puede verse inhibida por factores físicos y/o químicos. La inhibición física puede deberse a la presencia de coloides del suelo asociados al DNA extraído desde la matriz. Los coloides interactúan con los cebadores responsables de la secuenciación del DNA. La inhibición química puede ser provocada por la presencia de sustancias inorgánicas, como por ejemplo, compuestos de hierro o macromoléculas orgánicas y ácidos húmicos así como sus compuestos derivados.



**Figura I.1** Esquema de las reacciones involucradas en PCR.

El alto contenido en arcilla de un suelo, como es el caso del suelo objeto de estudio en esta tesis, puede ser un factor negativo a tener en cuenta en el proceso de extracción del DNA bacteriano desde la matriz del suelo. La población bacteriana puede encontrarse adherida a la fracción arcillosa, siendo necesario en el proceso de extracción del material genético, un cambio de pH, un cambio iónico o el uso de tensioactivos.

La técnica de análisis molecular por DGGE, al igual que en el caso de PCR, fue originalmente desarrollada y usada en investigación médica para detectar puntos de mutación en la secuencia del DNA. En muestras medioambientales, como en el caso de un suelo contaminado, esta técnica permite el análisis de poblaciones microbianas de un género específico. En DGGE, los fragmentos de DNA con la misma longitud pero diferente secuencia de los pares de bases, pueden ser separados dependiendo de sus puntos de fusión. Para prevenir la total fusión de los fragmentos se emplean GC-clamps (fragmentos de 40-50 pares de bases de secuencia GC) adheridos a uno de los cebadores utilizados en la reacción de amplificación del DNA por PCR. El empleo de GC-clamps es esencial para la realización del análisis de comunidades bacterianas específicas por DGGE (53, 54).

Mediante DGGE, la doble hélice de DNA amplificado por PCR, puede ser separada al someterlo a un gradiente lineal y creciente de desnaturalizantes (urea - formamida) a 60°C. La técnica de DGGE utilizada en el estudio de las poblaciones microbianas de los suelos, se denomina en paralelo, ya que el incremento del gradiente de los desnaturalizantes se produce desde la parte superior del gel hacia la inferior. La separación de los diferentes fragmentos está basada en la distinta movilidad electroforética de estos en un gel de poliacrilamida. Se produce la migración de los fragmentos de DNA (cargado negativamente) hacia un electrodo positivo. La variación en las secuencias de los fragmentos puede hacer cambiar la temperatura de fusión y por tanto su migración a través del gel, con lo cual puede

conseguirse la separación de dichos fragmentos. Cuando las moléculas de DNA no son separadas totalmente, su dificultad para moverse a través del gel es mayor y por tanto son retardadas con respecto a aquellas donde la separación se ha producido totalmente o bien no ha ocurrido.

Por tanto, la técnica DGGE es idónea para el análisis de los productos amplificados por PCR ya que cada comunidad bacteriana generará una banda que puede ser considerada como su huella dactilar, permitiendo así diferenciar entre los distintos géneros bacterianos presentes en los suelos (37).

### 1.3.2 BIODISPONIBILIDAD.

En general, el término *biodisponibilidad* incluye a aquellas situaciones en las que compuestos específicos están disponibles para la biota. Este término es empleado en diferentes disciplinas, como ecotoxicología, donde puede llegar a tener diferentes significados, pero para los científicos medioambientales, el término *biodisponibilidad* representa la accesibilidad de un compuesto químico para su asimilación y posible toxicidad (2). Cuando se habla de *biodisponibilidad* haciendo referencia a suelos contaminados, nos referimos a la fracción o concentración de contaminante, o contaminantes, que pueden desorberse desde la matriz del suelo en cierto período de tiempo y que pueden ser degradados por los microorganismos (27).

Muchos de los contaminantes más habituales en suelos poseen una baja solubilidad en agua y son adsorbidos con gran intensidad por las partículas sólidas. Por ejemplo, los hidrocarburos derivados del petróleo son, en general, apolares, especialmente los de peso molecular elevado y tienden a asociarse principalmente a la fase sólida. Esta asociación conduce a que en la fase líquida la concentración de contaminante sea baja (situación de *biodisponibilidad* limitada). Debido a que los microorganismos toman los nutrientes de la fase líquida (112), la tasa de biorrecuperación puede verse limitada por la velocidad con que se produce la desorción del contaminante desde la fase sólida a la fase acuosa.

La aplicación de técnicas de biorrecuperación a menudo origina fracciones resistentes del contaminante a ser biodegradado. En algunos casos, esta concentración residual puede ser causada por una baja *biodisponibilidad* del contaminante que se traduce en una baja tasa de biodegradación del mismo, por condiciones medioambientales desfavorables para los microorganismos responsables de la degradación o por la ausencia en el propio suelo de microorganismos capaces de degradar determinados compuestos. En general, la cantidad de contaminantes que no pueden ser "movilizado" del suelo por biorremediación depende de las características del suelo, las propiedades del contaminante así como del tiempo que éste lleva presente en el suelo. En general, los procesos de tipo *in situ* no incrementan la disponibilidad, debido a que los contaminantes pueden acumularse en intersticios microscópicos demasiado pequeños para que las bacterias los colonicen. Una posible solución a este problema, es el aumento de la *biodisponibilidad* de los contaminantes mediante el uso de tensioactivos sintéticos en los procesos de biorrecuperación de suelos contaminados con compuestos orgánicos hidrofóbicos.

En la última década, se han desarrollado numerosos métodos que permitan obtener una medida de la biodisponibilidad de los compuestos orgánicos hidrofóbicos presentes en suelos y sedimentos, principalmente de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) y que permitan predecir la extensión en la que puede ocurrir el proceso de biodegradación de los contaminantes. Algunos de estos métodos son: extracción en fase sólida (SPE) de los HAPs biodisponibles (23), oxidación con persulfato de la fracción biodisponible de HAPs (26), extracción con solvente (21), con CO<sub>2</sub> supercrítico y más recientemente extracción con ciclodextrinas (107) y con tensioactivos (126).

### I.3.3 OTRAS TÉCNICAS DE RECUPERACIÓN DE SUELOS.

Los suelos y sedimentos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) pueden suponer un riesgo hacia la salud humana, así como para el ecosistema si estos se encuentran en concentración elevada y con capacidad de movilizarse. Por tanto, dos acciones aconsejables para evitar su expansión son reducir su movilidad así como su concentración, lo cual puede ser conseguido mediante técnicas de recuperación *in situ*, o después de excavar el terreno (*ex situ*).

Las técnicas de recuperación *in situ* tratan el suelo en el mismo lugar en el que se encuentra, por adición de diferentes compuestos y agentes o estimulando la degradación del contaminante. Las técnicas *ex situ*, están basadas en el tratamiento del terreno a pie de excavación o en instalaciones adyacentes. Considerando que en el tratamiento *in situ* no son necesarios ni la excavación ni el transporte podemos concluir que este tipo de recuperación resulta menos perturbadora de la estructura del suelo y desde el punto de vista económico de más bajo coste. Ambos tratamientos, *in situ* y *ex situ*, suelen consistir en una combinación de procesos biológicos y físico - químicos (12).

La remediación físico - química está constituida por un elevado número de técnicas fundamentadas en diferentes principios. Para suelos y sedimentos contaminados con HAPs, los procesos básicos son separación física del contaminante y la matriz limpia, oxidación, extracción e inmovilización de los HAPs (26). El objetivo de las técnicas de separación físicas es separar las partículas más contaminadas de las relativamente limpias, produciendo una pequeña fracción de materia altamente contaminada (arcillosa y orgánica) y una gran fracción de materia relativamente limpia (generalmente material arenoso que puede llegar a ser reutilizado). Estas técnicas pueden ser utilizadas solamente después de la excavación o el dragado.

La oxidación de los HAPs puede ser realizada térmica o químicamente. La oxidación térmica puede realizarse en condiciones de sequedad (450 - 650 °C) o bien bajo condiciones de humedad (200 - 300 °C). Normalmente, estos procesos incluyen desorción térmica, combustión/incineración, y pirólisis. La oxidación química suele realizarse mediante la reacción de los HAPs con peróxido o con ozono. Esta oxidación puede realizarse tanto *ex situ* como *in situ* mientras que la oxidación térmica solo puede aplicarse en tratamientos *ex situ*.

## Introducción

Los HAPs pueden ser extraídos de los suelos y sedimentos con solventes orgánicos y con soluciones acuosas de tensioactivos (121). En principio la extracción puede realizarse *in situ* o *ex situ*, sin embargo esta última es más efectiva y fácil de controlar. El proceso *in situ* consiste en un lavado del suelo inyectando agua en el terreno contaminado. El agua moviliza a los contaminantes, siendo posteriormente extraída y depurada. Este método solo es válido para contaminantes solubles en agua, la cual se introduce mediante zanjas y pozos y se recoge con unos drenes (tuberías horizontales) y se extrae de los pozos mediante unas bombas de succión. En ocasiones se utiliza agua con disolventes para facilitar la extracción. También se emplean tensioactivos para extraer contaminantes hidrofóbicos.

El tratamiento *ex situ* consiste en tratar el suelo excavado con una solución acuosa en un tanque. Previamente, el suelo es tamizado para separar las fracciones más gruesas (generalmente, superiores a los 20 mm de diámetro). Los materiales finos se mezclan con un fluido lavador y posteriormente son aclarados. Después se separan las arenas, que tienen una capacidad muy baja para retener contaminantes. Las arcillas y los limos continúan el proceso de depuración y finalmente los materiales que conserven todavía un alto porcentaje de contaminantes son separados para su aislamiento en vertederos controlados. Esta técnica es útil para una amplia gama de compuestos contaminantes como los metales pesados, cianuros metálicos, disolventes nitrogenados, hidrocarburos aromáticos, gasolinas, aceites minerales, PBC (productos organoclorados, como los policlorobifenilos), etc. Los fluidos utilizados son muy diversos dependiendo del tipo de contaminante: disoluciones acuosas, disolventes orgánicos, compuestos quelantes, productos tensioactivos, ácidos y bases.

## I.4 TENSIOACTIVOS

La aplicación de tensioactivos sintéticos en la biorrecuperación de suelos contaminados supone una innovación en el campo de ésta tecnología, ya que pueden aumentar la movilidad de los contaminantes incrementando su biodisponibilidad y aumentando así la desaparición del contaminante del entorno (6, 120, 125).

### I.4.1 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS TENSIOACTIVOS.

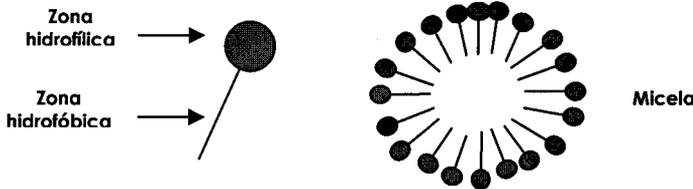
Los tensioactivos son moléculas orgánicas formadas por una parte hidrofóbica y otra hidrofílica (figura I.2). La parte hidrofílica de la molécula tiene afinidad por el agua y por otras sustancias polares mientras que la parte hidrofóbica los hace tener tendencia a concentrarse en las interfases, reduciendo la energía libre del sistema con el cual interaccionan. Como resultado de su naturaleza anfótera, una molécula de tensioactivo puede disolverse en agua como monómero, adsorberse en una interfase o puede incorporarse junto con otras moléculas de tensioactivo como parte de una micela.

Dependiendo de la naturaleza del grupo hidrofílico, podemos distinguir cuatro tipos de tensioactivos: aniónicos, catiónicos, anfóteros y no iónicos. Las partes hidrofóbicas más comunes de los tensioactivos sintéticos son parafinas, olefinas, alquilbencenos, alquilfenoles y alcoholes; los grupos hidrofílicos son normalmente grupos sulfatos, sulfonatos, carboxilatos (en los tensioactivos aniónicos), aminas cuaternarios (en los tensioactivos catiónicos), polioxietilenos o polipeptidos (en los tensioactivos no iónicos) (29). Los tensioactivos pueden ser producidos químicamente (sintéticos) y biológicamente (biosurfactantes).

La presencia de moléculas de tensioactivo en las interfases aire-agua provoca una reducción en la tensión superficial de la solución (disminuyen la atracción de las moléculas de agua entre sí en la superficie) (79) y lleva a la estabilización de las espumas. Algunos tensioactivos pueden reducir la tensión superficial de una solución acuosa desde 72 mN/m, valor del agua destilada, hasta  $30 \pm 5$  mN/m, dependiendo del tipo y concentración del tensioactivo.

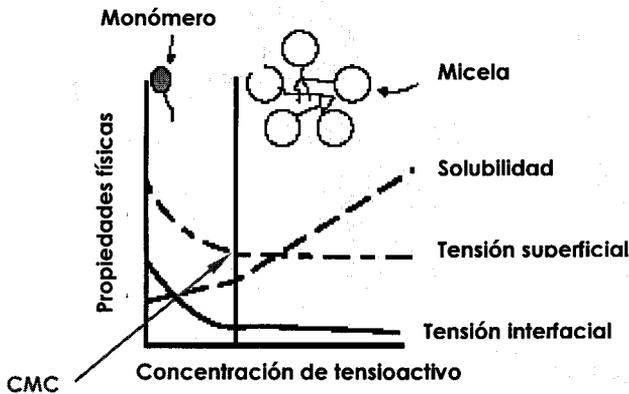
Otra característica de los tensioactivos es la formación de micelas, pequeños agregados de moléculas del tensioactivo. A bajas concentraciones y en solución acuosa, lo que están presente son moléculas individuales del tensioactivo (unidades monoméricas). Por encima de una cierta concentración, llamada concentración crítica micelar ("Critical Micelle Concentration", CMC), las moléculas del tensioactivo se encuentran formando agregados que oscilan entre 20 y 200 moléculas. El número de moléculas de tensioactivo que constituyen una micela se denomina número de agregación. La CMC es dependiente de la temperatura y diferente para cada tensioactivo. En términos simples, las micelas son pequeñas gotas con un núcleo hidrofóbico y una envoltura hidrofílica. La presencia de dichas estructuras micelares permite aumentar la solubilidad aparente de los compuestos orgánicos hidrofóbicos, como por ejemplo los

hidrocarburos aromáticos policíclicos, debido a que éstos pueden ser alojados en el interior del núcleo hidrofóbico de las micelas.



**Figura 1.2** Estructura de los tensioactivos en solución acuosa (83).

Estudios llevados a cabo por Edwards et al. (33), demostraron que, la solubilización de compuestos orgánicos hidrofóbicos en presencia de tensioactivos se iniciaba cuando éste se encontraba en una concentración igual a su CMC y que dicha solubilización era proporcional a la concentración del tensioactivo (figura 1.3). Este comportamiento es interpretado como un fenómeno de pseudo – solubilización, que depende de la estructura del tensioactivo, de su número de agregación, de la geometría de la micela, de la longitud y características químicas de la cadena hidrofóbica del tensioactivo, de la temperatura, así como, de las características químicas y de la solubilidad del contaminante.



**Figura 1.3** Variación de la tensión superficial e interfacial y solubilidad del contaminante con la concentración de tensioactivo (92).

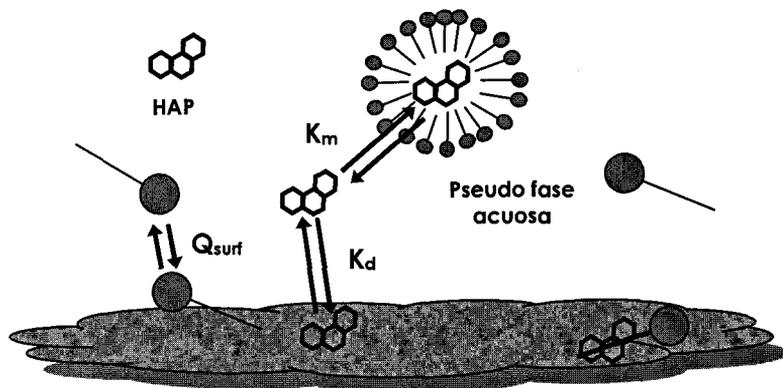
La movilización de los compuestos orgánicos hidrofóbicos desde la matriz del suelo hasta la fase acuosa es atribuida comúnmente al incremento del gradiente de

concentración en la interfase suelo-agua. Este incremento de gradiente es ocasionado principalmente por el mayor reparto de los compuestos orgánicos hidrofóbicos en la pseudo-fase micelar. En los sistemas suelo – agua - tensioactivos podemos encontrar tres tipos de equilibrios (figura 1.4):

1. Coeficiente de distribución de los compuestos orgánicos hidrofóbicos solubilizados entre la fase micelar y la fase acuosa ( $K_m$ ).
2. Coeficiente de distribución de los compuestos orgánicos hidrofóbicos entre la fase acuosa y el suelo ( $K_d$ ).
3. Coeficiente de adsorción de los tensioactivos al suelo ( $Q_{surf}$ ).

Según los resultados obtenidos por Yeom et al. (136) para la solubilización de HAPs presentes en suelos contaminados utilizando tensioactivos, la adición de estos agentes incrementaron el gradiente de concentración de los HAPs en la interfase suelo-agua, así como el coeficiente de transferencia de masas. Este hecho es explicado según dos mecanismos propuestos que podrían ayudar a comprender, aún más, los procesos físico - químicos presentes en el sistema suelo – agua - tensioactivo, además de apoyar aún más la iniciativa de la utilización de tensioactivos sintéticos en la biorremediación de suelos contaminados con HAPs:

- a) El gradiente de concentración en la interfase suelo - agua aumenta principalmente por la pseudo-solubilización que tiene lugar en las micelas.
- b) El coeficiente de transferencia de masas aumenta debido a la adsorción y penetración de moléculas de tensioactivo en el suelo, lo cual incrementa la difusión de los contaminantes a través de la matriz del suelo hacia la fase acuosa.



**Figura 1.4** Esquema de procesos abióticos en sistemas suelo - agua en presencia de tensioactivos no iónicos, compuestos orgánicos hidrofóbicos y materia húmica del suelo (32).

### 1.4.2 TENSIOACTIVOS NO IÓNICOS.

Los tensioactivos pueden ser clasificados como catiónicos, aniónicos, anfotéricos y no iónicos dependiendo de la presencia o no de carga sus moléculas. Los tensioactivos catiónicos e inónicos se caracterizan por la presencia de una carga eléctrica neta en la molécula, lo cual les proporciona el grado de solubilidad. Esta presencia de carga no es un requisito indispensable para que exista actividad superficial en el agua. De hecho, los tensioactivos no iónicos presentan ciertas ventajas respecto a los iónicos, como por ejemplo una mayor sensibilidad a los cambios en la CMC debido principalmente a la presencia de sales en el medio, menor efecto del pH de la solución y mayor flexibilidad en su proceso de sintetización, ya que el grado de solubilidad de la molécula puede ser controlado según el tamaño del grupo hidrofílico.

Los tensioactivos no-iónicos son, generalmente, los más empleados en técnicas de biorremediación, debido a que la ausencia de carga en sus moléculas minimiza las interacciones entre las moléculas del tensioactivo y los enzimas localizados en las membranas bacterianas necesarios para la degradación del contaminante (125). Además presentan valores de CMC menores que el resto de los tensioactivos.

Entre los tensioactivos no iónicos, los conocidos como polioxietilenos (POE) son los más abundantes y técnicamente los más importantes. Estos tensioactivos presentan una fórmula general del tipo:



donde R es un poliéter y X es oxígeno o nitrógeno u otro grupo funcional capaz de dotar a la cadena de hidrofobicidad. En muchos casos, n, es el número de unidades de oxietilenos presentes y debe ser mayor de 5 ó 6 para que el tensioactivo no iónico sea soluble en agua. En el desarrollo de esta tesis los tensioactivos no iónicos empleados han sido: alquiletoxilatos (Brij 35 y Brij 30) y alquilfenol etoxilato (Tritón X-100). Esta selección se realizó tras una investigación bibliográfica sobre el efecto de los tensioactivos en la desorción y biodegradación de compuestos orgánicos hidrofóbicos (41, 65, 78-80, 136).

### 1.4.3 ADSORCIÓN DE LOS TENSIOACTIVOS AL SUELO.

La proporción en la que puede darse la adsorción de un agente tensioactivo al suelo está controlada por tres factores principales: (i) la naturaleza química de las especies que están siendo adsorbidas, en concreto de la naturaleza hidrofóbica e hidrofílica de los grupos químicos que constituyen la molécula de tensioactivo; (ii) la naturaleza de la superficie sólida a la que se está adsorbiendo el tensioactivo; y (iii) la naturaleza de la fase líquida presente en el sistema suelo-tensioactivo. Un ligero cambio en alguno de estos factores puede provocar grandes cambios en las características de adsorción del sistema.

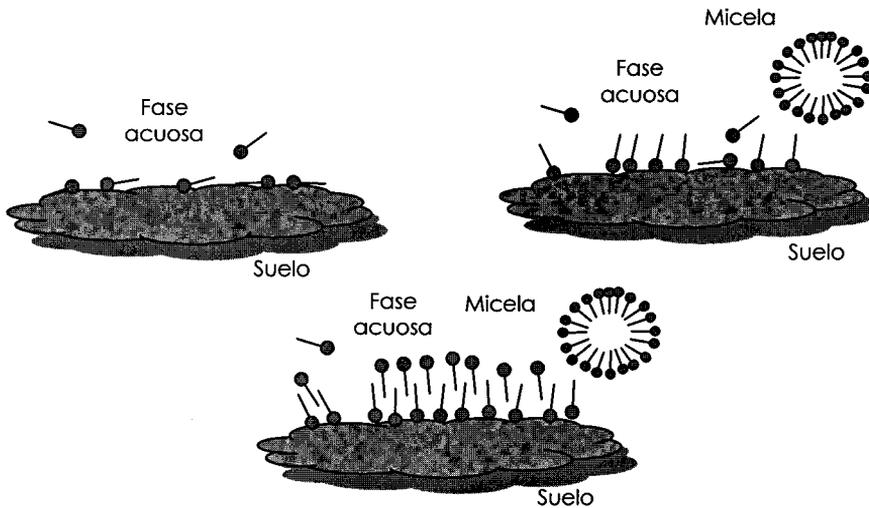
Cuando un tensioactivo es adsorbido en un suelo también deben considerarse ciertos aspectos cualitativos y cuantitativos que pueden verse alterados en el sistema en el que se encuentra presente. Entre ellos se incluyen:

- La cantidad de tensioactivo adsorbido, por unidad de masa o área, al sólido.
- La concentración de tensioactivo en solución necesaria para producir el recubrimiento de la fase sólida y provocar un determinado grado de adsorción.
- La concentración de tensioactivo a la cual se produce la saturación del sólido.
- La orientación de las moléculas de tensioactivo tanto de las que se encuentran en solución como de las adsorbidas a la superficie sólida.
- El efecto que produce la adsorción del tensioactivo al sólido en el resto de las propiedades del sistema.

En todos los casos citados, se asume que otros factores como son la temperatura y la presión permanecen constantes. El hecho de que un agente tensioactivo sea adsorbido o no a la superficie del suelo, es un factor muy importante, ya que, la menor o mayor efectividad de su aplicación en biorremediación, dependerá de ello. La efectividad de un tensioactivo se define como la concentración de tensioactivo en la fase acuosa necesaria para producir un nivel dado de desorción de los contaminantes bajo determinadas condiciones. La pérdida de efectividad, debida a adsorción, se refiere a la concentración de tensioactivo que se encuentra adsorbida a la superficie saturada del sólido. Por tanto, la pérdida de efectividad de un tensioactivo por adsorción, y la concentración que ha sido adsorbida en la fase sólida pueden ser determinadas directamente mediante la isoterma de adsorción en el primer caso y por diferencia en las medidas de tensión superficial de una solución de tensioactivo puro y un sistema de suelo - tensioactivo, en el segundo caso (94).

Como se ha comentado anteriormente, la adsorción de moléculas de tensioactivo al suelo depende tanto de las propiedades del tensioactivo como de las del propio suelo. Estudios llevados a cabo por Edwards et al; (32, 33) demuestran que el comportamiento de los tensioactivos no iónicos, tales como Tritón X-100, adsorbidos a superficies hidrofóbicas, como la sílice, puede describirse según un modelo teórico basado en la adsorción de tensioactivos no iónicos, tanto para concentraciones menores a la CMC como para concentraciones superiores a dicha concentración.

Se postula que las moléculas de tensioactivo que se encuentran en el seno de la disolución acuosa, en una concentración menor o igual a la CMC, pueden encontrarse adsorbidas muy próximas a la superficie del sólido de forma plana, debido a interacciones producidas entre la parte hidrofóbica e hidrofílica de las moléculas de tensioactivo con dicha superficie (figura 1.5).



**Figura 1.5** Configuración de los tres estados del tensioactivo en el proceso de adsorción al suelo.

Cuando en solución la concentración de tensioactivo se encuentra por encima de su CMC, las moléculas empiezan a reorientarse de forma que su parte hidrofóbica queda orientada hacia la pseudo-fase acuosa. Este comportamiento es atribuido a la fuerte atracción existente entre las partes hidrofóbicas de moléculas de tensioactivo adyacentes. Este proceso de orientación continúa conforme aumenta la concentración de tensioactivo, hasta que las moléculas reorientadas perpendicularmente forman monocapas denominadas hemimicelas. A concentraciones de tensioactivo aún mayores, se producen interacciones entre las partes hidrofóbicas del tensioactivo ya adsorbido (hemimicela) y el que se encuentra en solución, formándose una doble capa denominada admicelas.

Aunque la adsorción del tensioactivo es un proceso desfavorable para la solubilización micelar, puede jugar un papel importante en el transporte facilitado del sustrato adsorbido (129). Generalmente, el tensioactivo adsorbido aumenta la capacidad de adsorción del suelo, mientras que el tensioactivo presente en solución incrementa la solubilidad de los compuestos orgánicos hidrofóbicos. El efecto neto de ambos mecanismos es dependiente de la concentración de tensioactivo presente.

En un estudio realizado por Yeom et al. (136), sobre el efecto de los tensioactivos no iónicos, sobre la proporción de HAPs disueltos en un suelo contaminado con alquitrán, se proponen dos mecanismos que explicarían el aumento de la solubilidad de los contaminantes. Los mecanismos están basados principalmente en un incremento del gradiente de concentración entre el suelo y la interfase acuosa y en un aumento de la difusión de los HAPs a través de la matriz orgánica del suelo debido a la adsorción y penetración de moléculas del tensioactivo que provocarían un aumento de volumen en dicha matriz. Este segundo mecanismo depende directamente de la estructura del tensioactivo y de su densidad de

adsorción al suelo. Series homólogas de tensioactivos con grupos etoxilatos (serie a la que pertenecen Brij 30 y Brij 35), presentan densidades de adsorción que están inversamente relacionadas con el número de grupos etoxilatos presentes en la molécula de tensioactivo. La adsorción y penetración del tensioactivo en el suelo está favorecida por pequeñas interacciones producidas entre las cabezas hidrofílicas de los tensioactivos y los grupos hidrofóbicos del contaminante. Es más, los tensioactivos con cadenas sin ramificar causaron mayores incrementos en la proporción de disolución de los HAPs que aquellos que presentaban ramificaciones en sus moléculas. El aumento observado en la difusión siguió la misma relación.

Estos resultados experimentales llevaron a la conclusión de que el aumento en la difusión de los contaminantes era debido a la penetración de las moléculas de tensioactivo en la matriz del suelo, seguida de un aumento en el volumen de la matriz orgánica del suelo. Aparentemente, la densidad de la adsorción del tensioactivo, depende por tanto, del tamaño de la molécula y de su carácter hidrofílico.

Teniendo en cuenta la información aportada por la bibliografía citada, en el desarrollo de este trabajo de investigación se utilizaron tres tensioactivos no iónicos, Tritón X-100, Brij 30 y Brij 35. Sus relativos bajos valores de CMC, en comparación con los tensioactivos aniónicos y catiónicos, además de sus elevadas capacidades de adsorción al suelo, pueden ser propiedades favorables e incluso determinantes en el aumento de la biodisponibilidad de los HAPs inicialmente adsorbidos al suelo.

#### 1.4.4 MODELO DE DESORCIÓN MICELAR.

Con el fin de explicar los diferentes mecanismos implicados en la desorción de los HAPs de un suelo en presencia de agentes tensioactivos, muchos investigadores han estudiado el reparto de solutos entre las diferentes fases del sistema suelo-tensioactivo (20, 32, 80), así como las interacciones que puedan darse entre suelo, tensioactivo y contaminante (27, 136). Los mecanismos que explican el aumento de la disponibilidad de los compuestos orgánicos hidrofóbicos por la presencia de tensioactivos han sido revisados por Volkering et al. (126). Los procesos implicados pueden ser clasificados en tres categorías: (i) aumento de la solubilidad aparente, (ii) transporte facilitado y (iii) emulsificación de NAPLs.

De manera general, la distribución de los compuestos orgánicos hidrofóbicos entre el suelo y la fase acuosa puede ser descrita mediante un coeficiente de distribución global,  $K_d$ :

$$K_d = \frac{[P]_{\text{suelo}}}{[P]_{\text{agua}} + [P]_{\text{mic}}} \quad (1)$$

donde  $[P]_{\text{suelo}}$  es la concentración del contaminante (mol/l) en el suelo,  $[P]_{\text{agua}}$  es la concentración del contaminante (mol/l) en la fase acuosa y  $[P]_{\text{mic}}$  es la concentración de dicho contaminante (mol/l) disuelto en las micelas del tensioactivo. La ecuación (1) puede expresarse en su forma inversa como

$$\frac{1}{K_d} = \frac{[P]_{agua}}{[P]_{suelo}} + \frac{[P]_{mic}}{[P]_{suelo}} \quad (2)$$

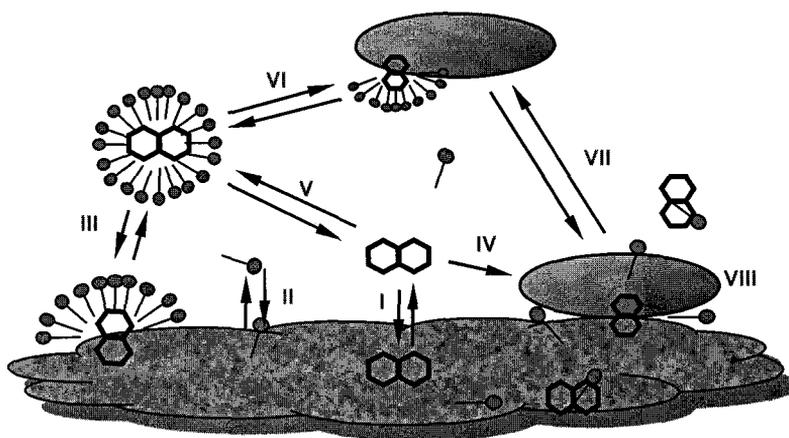
donde  $1/K_d$  representa el proceso de lavado del suelo, en términos de la fracción de contaminante que está siendo solubilizado en la fase acuosa frente a la concentración que permanece en el suelo. Para los compuestos orgánicos hidrofóbicos, el primer término a la derecha de la ecuación (2) en la práctica es obviado, ya que  $[P]_{agua}$  está limitada por la solubilidad del contaminante, y normalmente es mucho menor que  $[P]_{mic}$ . Sin embargo, en el suelo podemos encontrar líquidos en fase no acuosa (NAPLs), no asociados químicamente con él pero que pueden entrar en contacto con los contaminantes siendo una tercera fase en la que puede estar el contaminante. Por tanto, podemos reescribir la ecuación anterior incluyendo todas las posibles localizaciones de contaminante. Teniendo en cuenta que en el laboratorio es posible cuantificar de una sola vez  $[P]_{liq}$  la ecuación (2) quedaría de la siguiente forma:

$$\frac{1}{K_d} = \frac{[P]_{liq}}{[P]_{suelo}} \quad (3)$$

donde  $[P]_{liq}$  es la concentración total del contaminante en la fase líquida suma de  $[P]_{agua}$ ,  $[P]_{mic}$  y  $[P]_{NAPLs}$ . Por tanto, este modelo permite calcular que fracción del contaminante está siendo solubilizado en la fase acuosa por la presencia del tensioactivo.

### I.4.5 INTERACCIONES TENSOACTIVO – MICROORGANISMO.

El uso de tensioactivos en la biorremediación de suelos contaminados conlleva una serie de interacciones, bastante complejas, entre el/los tensioactivo/s presentes en el sistema, el suelo, el/los contaminante/s y los microorganismos presentes en el suelo y responsables de la biodegradación. En la figura I.6 se muestra un esquema simplificado de estas interacciones pero en la realidad pueden ser aún más complejas debido a la heterogeneidad de los suelos.



**Figura I.6** Esquema de las interacciones entre microorganismos, suelo, contaminante y tensioactivos. (I) Adsorción del contaminante al suelo, (II) Adsorción de las moléculas de tensioactivo al suelo, (III) Solubilización del contaminante, (IV) Toma del contaminante presente en la fase acuosa por los microorganismos, (V) Partición del contaminante entre la fase acuosa y las micelas, (VI) Adsorción de las micelas a los microorganismos, (VII) Toma directa del contaminante presente en la fase sólida por los microorganismos, (VIII) Adhesión de los microorganismos al suelo (126).

#### I.4.5.1 Toxicidad

A pesar de que los agentes tensioactivos no iónicos aumentan la movilización de los contaminantes desde la matriz del suelo hasta la fase acuosa, se ha demostrado que algunos de ellos pueden resultar tóxicos para los microorganismos responsables de la degradación del contaminante, sobre todo cuando estos se encuentran presentes en concentraciones superiores a sus CMC (69).

El efecto tóxico de los tensioactivos sobre las bacterias puede ser debido a varias causas (133, 134):

- Alteración del funcionamiento de las membranas celulares por interacción con los componentes lipídicos, causando su permeabilización.

- Toxicidad debida al aumento de la concentración del contaminante en la fase acuosa.
- Reacciones de las moléculas de tensioactivo con proteínas esenciales para el funcionamiento de la célula.

A pesar de que el uso de biosurfactantes es más aceptado desde el punto de vista social, al esperarse que sean menos tóxicos que los sintéticos, en determinadas situaciones unos pueden ser tan tóxicos como los otros. Los tensioactivos no iónicos, en general, resultan menos tóxicos para las bacterias que los tensioactivos iónicos.

#### **1.4.5.2 Biodegradabilidad.**

La biodegradabilidad del tensioactivo es un factor que puede tener efectos positivos o negativos en el uso de estos compuestos en la biorremediación de suelos.

Los efectos negativos pueden ser causados por agotamiento de los minerales o el oxígeno, por toxicidad de los productos inmediatos de degradación del tensioactivo (pudiendo ser incluso más tóxicos que el compuesto inicial), o bien por una mayor preferencia del microorganismo a utilizar el tensioactivo como fuente de carbono disminuyendo la degradación del contaminante. Estudios realizados por Laha et al. (69), demostraron que algunos tensioactivos podían resultar tóxicos para las bacterias cuando estos se encontraban en una concentración superior a su valor de CMC, ya que estas podían utilizarlo como fuente de carbono alternativa al contaminante presente en el suelo.

El efecto positivo más obvio de la biodegradabilidad de un tensioactivo en la biorrecuperación de un suelo contaminado, es que a medio plazo desaparecerá del lugar al que se aplicó. En el desarrollo de esta tesis se ensayarán tres tensioactivos no iónicos y biodegradables (65).

#### **1.4.5.3 Influencia en la movilidad bacteriana.**

La movilidad de las bacterias en el suelo es muy baja, llegando a penetrar en él solamente unos pocos centímetros cuando son aplicadas en su superficie (31, 81). Existen evidencias que demuestran que el transporte bacteriano a través del suelo puede estar condicionado por factores físicos, químicos, como el aumento del pH (111), la presencia de tensioactivos (57) y contenido en materia orgánica (58), y microbiológicos como un reducido tamaño celular (39), forma esférica (127), así como una superficie celular hidrofílica (115).

Los biosurfactantes juegan un papel importante en la interacción de las bacterias con las interfases, por ello, en la adición de tensioactivos a suelos cabe esperar que esas interacciones afecten a la movilidad bacteriana en el suelo.

Estos efectos pueden ser debidos a diferentes causas:

- El tensioactivo puede causar una disminución de la adsorción reversible de la bacteria debido a un cambio en su superficie de la membrana celular.
- El tensioactivo puede aumentar la floculación y con ello incrementar el transporte de la bacteria.
- El tensioactivo puede provocar la disolución de los polímeros extracelulares responsables de la adsorción irreversible de la bacteria.

Lahlou et al. (71) estudió el efecto de tensioactivo Tritón X-100 en el transporte bacteriano a través del suelo. Dicho tensioactivo facilitó considerablemente el transporte de bacterias del género *Mycobacterium* a través de columnas de suelo. Esta influencia fue debida fundamentalmente a dos factores. Por una lado, a la adsorción del tensioactivo a las superficies hidrofílicas del suelo, incrementando así las zonas hidrofóbicas ya que las moléculas de tensioactivo orientarían sus zonas hidrofóbicas hacia la fase acuosa (32). Este incremento de la superficie hidrofóbica podría introducir nuevas interacciones hidrofóbicas (las cuales no se dan en ausencia de tensioactivo) que podrían afectar al transporte bacteriano a través del suelo. Por otra parte, la adsorción de moléculas de tensioactivo a la membrana bacteriana puede ocurrir entre sus respectivas partes hidrofóbicas o hidrofílicas transformando la superficie celular en una zona hidrofílica o viceversa (95). De acuerdo con este mecanismo, en el caso de bacterias hidrofóbicas, el resultado final es la repulsión entre la bacteria y la superficie del suelo con el consiguiente incremento en el transporte. Este efecto de los tensioactivos puede ser importante en el campo de la biorrecuperación de suelos *in situ* donde el transporte de bacterias puede ser un proceso esencial para la degradación de los contaminantes (41).

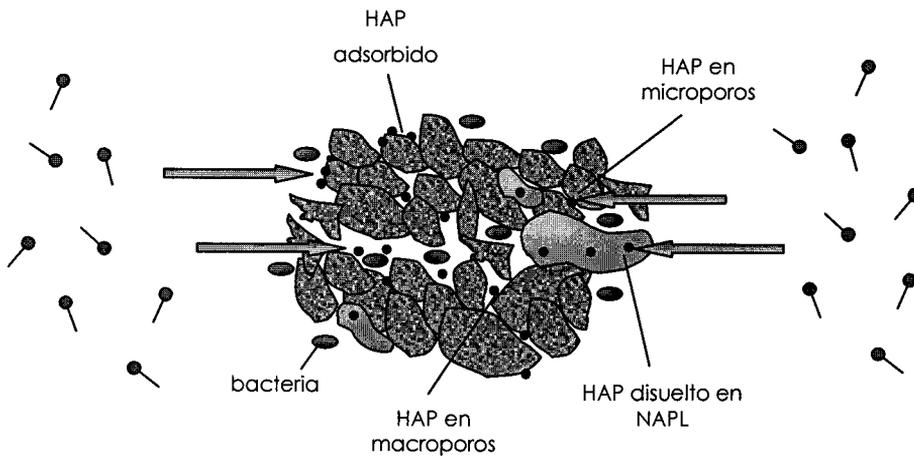
#### **1.4.5.4 Tensioactivos y biodisponibilidad del contaminante.**

La biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos hidrofóbicos puede ser aumentada por la presencia del tensioactivo a través de los siguientes mecanismos (134):

- Emulsificación de los contaminantes en fase líquida no acuosa. Los tensioactivos pueden disminuir la tensión superficial entre una fase acuosa y otra fase no acuosa. Esto puede incrementar la formación de micro-emulsiones, lo cual resulta en un aumento del área de contacto, permitiendo aumentar el transporte del contaminante hacia la fase acuosa.
- Aumento de la solubilidad aparente del contaminante. Este efecto es también denominado pseudo-solubilización y es causado por la presencia de micelas. Los compuestos orgánicos hidrofóbicos, podrían disolverse significativamente en el núcleo de las micelas.
- El transporte de los hidrocarburos desde la micela hacia la fase acuosa puede ser rápido, debido al pequeño tamaño de éstas,

pero no está demasiado claro que los hidrocarburos pseudo-solubilizados estén disponibles directamente a los microorganismos. No obstante, este hecho puede provocar que las micelas estén disminuyendo la biodisponibilidad del contaminante y por tanto su biodegradación.

- Transporte del contaminante facilitado por la disminución de la tensión superficial que provoca el tensioactivo en el agua contenida en los poros del suelo.



**Figura 1.7** Influencia de los agentes tensioactivos en el aumento de la biodisponibilidad de contaminantes orgánicos hidrofóbicos en suelos.

La presencia de micelas en la fase acuosa, en cuyo núcleo hidrofóbico se encuentran pseudo-solubilizados los contaminantes, puede suponer un inconveniente a la hora de aplicar técnicas de biorrecuperación ya que los compuestos orgánicos hidrofóbicos en esta situación no se encuentran disponibles para ser biodegradados. No obstante, estudios recientes han demostrado que la fracción de contaminante solubilizado en la fase micelar de algunos tensioactivos no iónicos, se encuentra disponible para la biodegradación. Esto es posible, debido a que el contaminante puede transferirse directamente desde el núcleo de la micela hasta la bacterias sin pasar previamente por la fase acuosa (48).

**CAPÍTULO II:**  
**MATERIALES Y METODOLOGÍA**

## II.1 REACTIVOS

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos utilizados en este estudio han sido los siguientes: fluoreno ( 98% ), antraceno ( 99% ), fenantreno ( >96%, HPLC), fluoranteno (99%, HPLC) y pireno ( 98% ), todos ellos de pureza analítica y obtenidos de la casa comercial Sigma Chemical Co.

Los compuestos marcados con  $^{14}\text{C}$  empleados en los ensayos de mineralización fueron los siguientes: [ $9\text{-}^{14}\text{C}$ ] fluoreno (actividad específica 14.6 mCi/mmol), [ $9\text{-}^{14}\text{C}$ ] fenantreno (actividad específica, 13.1 mCi/mmol), [ $1,2,3,4,4a,9a\text{-}^{14}\text{C}$ ] antraceno (actividad específica, 20.6 mCi/mmol), [ $3\text{-}^{14}\text{C}$ ] fluoranteno (actividad específica, 45 mCi/mmol) y [ $4,5,9,10\text{-}^{14}\text{C}$ ] pireno (actividad específica, 58.7 mCi/mmol) todos ellos con una pureza radioquímica mayor del 98%. Fueron suministrados por Sigma Chemical Co (St Louis, MO).

Se utilizaron tres tensioactivos no-iónicos del tipo polioxietilenos (POE): Brij 30 ( $\text{C}_{12}\text{E}_4$ ), Brij 35 ( $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ ) y Tritón X-100 ( $\text{C}_8\text{PE}_{9,5}$ ) todos ellos suministrados por Sigma -Aldrich.

Para el estudio de las cinéticas de desorción de los HAPs se utilizó Tenax TA ® (60 – 80 de malla, 177-250  $\mu\text{m}$ ), un polímero absorbente suministrado por Teknokroma.

Para la puesta a punto de las condiciones cromatográficas óptimas del análisis de los HAPs en muestras de suelo, se utilizó un patrón que contenía 16 HAPs (8270 Calibration Mix #5, 2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cada HAP, en diclorometano, RESTEK Corporation).

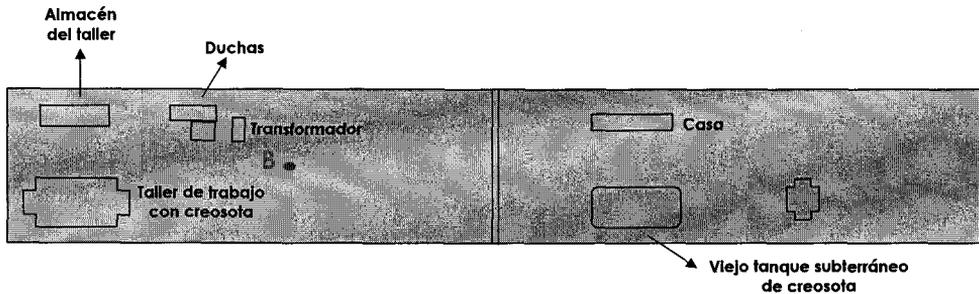
Los disolventes empleados en todos los análisis llevados a cabo en esta tesis, acetona, hexano, diclorometano, metanol y acetonitrilo, fueron de calidad HPLC, suministrados por la casa comercial Merck.

## II.2 SUELOS

Se utilizó un suelo contaminado con creosota procedente de una antigua estación de RENFE, Andújar (Jaén). La creosota había sido empleada en el proceso de conservación de la madera utilizada en la construcción de las vías del tren. La toma de muestras fue realizada en colaboración con EMGRISA (Empresa para la Gestión de Residuos Industriales, Sociedad Estatal, Madrid), empresa responsable de los trabajos de recuperación del emplazamiento.

El desarrollo de esta tesis se ha llevado a cabo con la muestra tomada en el punto B por ser éste el que presentaba mayor contenido en HAPs de los estudiados inicialmente por EMGRISA (figura II.1y II.2). La muestra fue tomada del horizonte superficial del suelo, con ayuda de una pala excavadora, a una profundidad de un metro, lugar hasta donde la creosota había penetrado. Las muestras se recogieron en botes de vidrio para evitar la adsorción de los hidrocarburos a las paredes del envase. El suelo húmedo se homogeneizó, se secó al aire, se pasó por un molino de tambor rotatorio y cilindros de acero y posteriormente se tamizó (2 mm de luz de

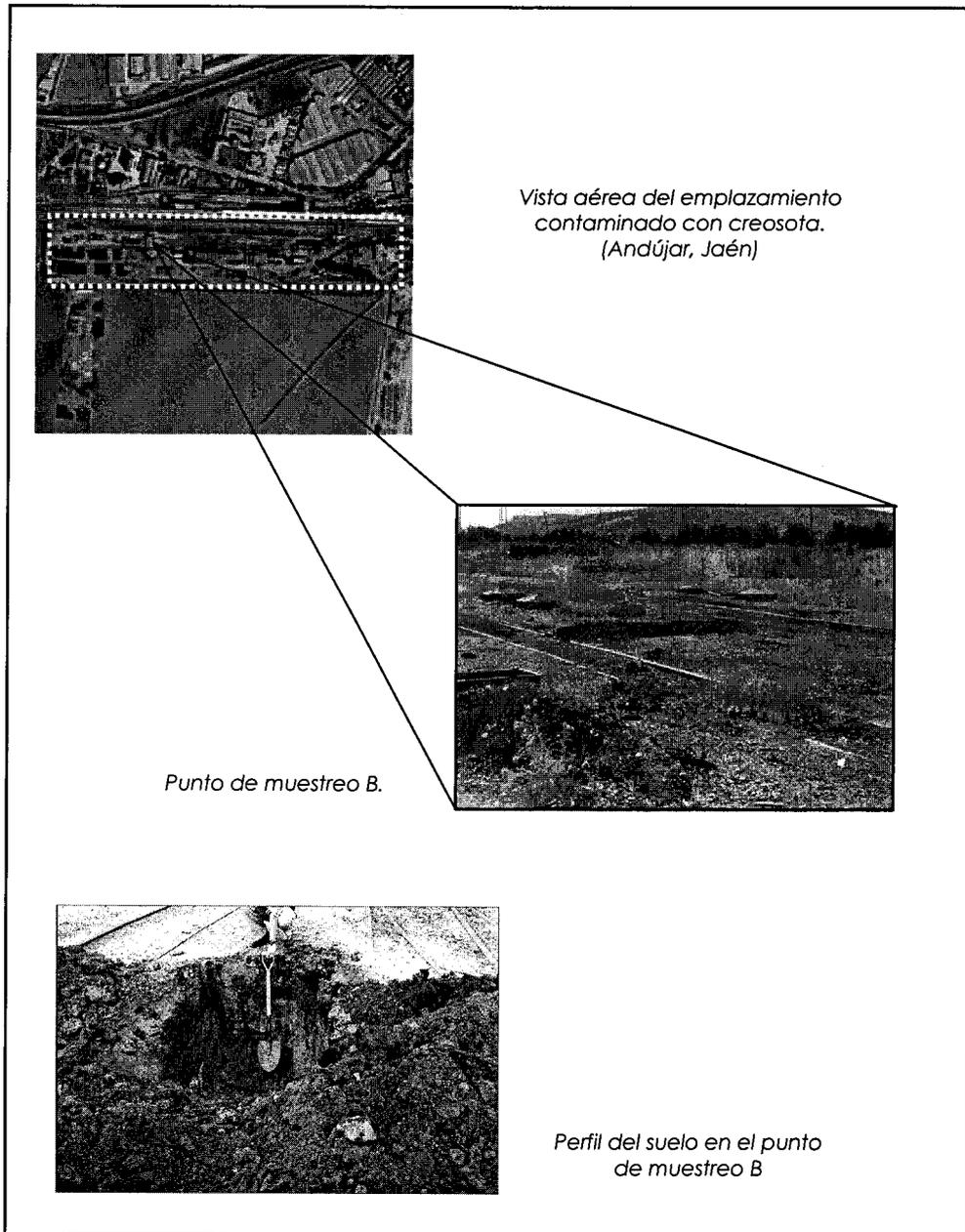
malla). Tras este tratamiento, el suelo se conservó para minimizar la actividad bacteriana a 4° C y en oscuridad en botes de vidrio.



**Figura II.1** Plano indicativo de la localización del punto de muestreo B contaminado con creosota (Estación de RENFE, Andújar, Jaén) .Escala N/S.

Para el estudio de la influencia de los tensioactivos en la fracción resistente de HAPs a biodegradación, se utilizaron dos suelos diferentes. El primero de ellos, denominado suelo B1, se obtuvo mediante un proceso de biodegradación. Para conseguir este suelo B1, se sometió el suelo original B estéril a un proceso de biodegradación durante 14 días, inoculándolo con la estirpe *Sphingomonas* LH 128 degradadora de fenantreno. Una vez alcanzado el porcentaje de mineralización máxima, se paró la actividad bacteriana congelando el suelo a - 80 °C. Tras descongelar y dejar decantar las partículas sólidas de suelo, se retiró la fase acuosa con pipeta estéril. Posteriormente el suelo se sometió a un proceso de lavado con agua milli-Q también estéril, mediante agitación durante 3 horas, con el fin de retirar las sales presentes en el medio de cultivo utilizado y que hubieran podido quedar en el suelo. Estas sales, tras el secado, podrían interferir (al afectar a la agregación del suelo) en la desorción de los HAPs aún presentes como fracción resistente a la biodegradación. Tras retirar de nuevo la fase acuosa el suelo B1, se secó en estufa a 40° C y se conservó en botes de vidrio a 4° C y en oscuridad hasta su utilización.

El segundo de los suelos, denominado E6068, fue proporcionado por la empresa SOILREM (Dinamarca), dedicada a la biorremediación de suelos contaminados. Este suelo había sido sometido por dicha empresa a un proceso de biorremediación en biopilas. Como paso previo a su utilización, el suelo se secó en estufa a 40° C, se pasó por mortero y se tamizó (2 mm de luz de malla). A continuación se conservó en bote de vidrio a 4° C, para minimizar la actividad bacteriana, y en oscuridad.



**Figura II.2** Vistas a diferentes escalas del punto de muestreo B en el emplazamiento contaminado con creosota (Andújar, Jaén).

### II.3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL SUELO.

Los parámetros físico - químicos: pH, carbonatos, nitrógeno, fósforo y potasio disponibles, así como el análisis granulométrico, del suelo contaminado original y del suelo B1, se realizaron en el servicio de análisis del IRNAS mediante métodos oficiales (36, 87).

El análisis mineralógico del suelo B, fue realizado por la Doctora Magdalena Grifoll perteneciente a la Universidad de Barcelona. Se realizaron pruebas de agregados orientados (orientado normal, con atmósfera de etilen glicol durante 24 horas y orientado a 550° C durante 2 horas) para confirmar la presencia de las arcillas determinadas en el suelo B mediante difracción de rayos x.

El contenido en carbono orgánico de los suelos B, B1 y E6068 se determinó mediante el método de Walkley Black, basado en la oxidación del carbono orgánico con una cantidad conocida de oxidante (87) . El procedimiento seguido fue el siguiente: se pesaron aproximadamente 0,6 g de suelo seco y se llevó a un matraz Erlenmeyer de 100 ml de capacidad. Se añadieron 10 ml de dicromato potásico ( $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{K}_2$ ) al 8 % y 15 ml de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado dejándolo reposar durante 30 minutos. Una vez que el Erlenmeyer estuvo frío, se puso su contenido a un matraz aforado de 100 ml, filtrando previamente a través de lana de vidrio y arrastrando con agua destilada todo el contenido. A continuación, se dejó enfriar de nuevo y se enrasó añadiendo agua destilada. Para su valoración con sal de Mohr 0,2 N [Fe(II)Amonio Sulfato 6-hidrato], se tomaron 20 ml del contenido del matraz aforado y se llevaron a un matraz Erlenmeyer de 250 ml. Se añadieron 200 ml de agua destilada, 2-3 gotas de difenilamina como indicador (0,5 g de difenilamina en 100 ml de ácido sulfúrico concentrado y vertida sobre 20 ml de agua destilada) y media cucharada de fluoruro sódico como catalizador de la reacción. El contenido del matraz adquirió un color pardo oscuro. La sal de Mohr (20 ml de ácido sulfúrico concentrado en 500 ml de agua destilada, llevada a ebullición y una vez enfriada la mezcla se disolvieron 78,5 g de sal de Mohr y se completó el volumen hasta 1 litro en matraz aforado) fue añadida poco a poco desde una bureta mientras se agitaba el contenido del matraz, hasta que el color viró a morado y posteriormente a verde claro. En este punto se dió por concluida la valoración. Por diferencia entre el volumen inicial ( $V_i$ ) y final ( $V_f$ ) de la sal de Mohr, se calculó la cantidad de dicha sal gastada por la muestra.

Para la correcta valoración de la muestra, fue necesario realizar un ensayo en blanco, en el cuál se repitió todo el proceso explicado anteriormente pero sin añadir muestra de suelo en el Erlenmeyer. El volumen de sal de Mohr gastado por el blanco será  $V_b$ . Además, fue necesario factorar la sal de Mohr. Este proceso consiste, básicamente, en establecer qué diferencia hay entre la concentración teórica del reactivo (en este caso 0,2 N) y la concentración real. La factoración se realizó de la siguiente forma: se pesaron entre 0,05 y 0,1 g de dicromato potásico y se colocaron en un vaso de precipitado. Se añadieron 20 ml de agua destilada, 5 ml de ácido sulfúrico, 3-4 gotas de difenilamina y media cucharada de fluoruro sódico. Se valoró con sal de Mohr anotando el volumen gastado hasta el cambio de color.

El factor fue calculado como:

$$f = \frac{\textit{gramos de dicromato} * 1000}{\textit{ml de sal gastados} * \textit{normalidad de la sal} * \textit{PM dicromato} / 6}$$

Tanto el cálculo de la factoración como las determinaciones de la materia orgánica de las muestras se realizaron por triplicado. El cálculo de la cantidad de carbono orgánico (C.O.) de la muestra se hizo considerando que 1 ml de sal de Mohr 0,2 N equivale a 0,615 mg de carbono orgánico.

1 ml de sal de Mohr → 0,615 mg de C.O.

Vb - Vm → X mg de C.O.

Como las valoraciones se realizaron con 20 ml tomados del matraz de 100 ml, los mg de C.O. se calcularon como 5X para conocer la cantidad total que correspondía a los 100 ml de dicromato. El contenido de C.O. por cada 100 g de suelo se calculó como:

5X mg de C.O. → en los g de suelo pesados

Y mg de C.O. → en 100 g de suelo

Finalmente se hizo la corrección correspondiente al factor de la sal de Mohr. Para ello se multiplicaron los Y mg de C.O. por el factor *f*. El contenido en C.O. de los suelos estudiados se expresó en tantos por ciento.

La materia orgánica (M.O.) de los suelos se determinó de forma indirecta a partir de su contenido en carbono orgánico. Teniendo en cuenta que aproximadamente el 60% de la materia orgánica total es carbono, puede calcularse dicho contenido multiplicando el porcentaje de carbono orgánico por 1,724.

$$\text{M.O. (\%)} = \text{C.O. (\%)} \times 1,724$$

## II.4 EXTRACCIÓN DE LOS HAPs DEL SUELO Y PURIFICACIÓN DE LA MUESTRA.

Tanto para el análisis del contenido en HAPs de los suelos a tiempo inicial en los ensayos de biodegradación, como para las muestras a tiempos intermedios y a tiempo final en dichos ensayos, el procedimiento de extracción de HAPs y limpieza de la muestra que se siguió es el que a continuación se detalla.

Para la extracción de los HAPs del suelo se utilizó un extractor Soxhlet de 250 ml de capacidad. El extractante utilizado fue diclorometano (100 ml). La muestra de suelo seco (1 g aproximadamente) se introdujo en un cartucho de celulosa (19 x 90 mm) y se sometió a extracción continua durante 8 horas (59). El extracto se llevó al rotavapor hasta reducir el volumen a unas gotas, tras lo cual se resuspendió en 5 ml de diclorometano. La limpieza del extracto se realizó mediante una extracción en fase sólida (clean-up) haciendo pasar dicho extracto a través de un cartucho de florisil (Sep-Pak cartridges, WATERS) el cual retiene los compuestos más polares y permite el paso de los apolares, como es el caso de los HAPs. El cartucho se acondicionó previamente con 9.6 ml de diclorometano con ayuda de una jeringa Hamilton. Tras pasar el extracto a través del cartucho se pasaron 2 ml más de diclorometano para arrastrar los posibles HAPs que hubieran podido quedar retenidos (1, 42, 74). El extracto limpio se llevó a una corriente de nitrógeno hasta sequedad. Posteriormente se resuspendió en un volumen conocido de acetonitrilo y se sonicó durante 15 minutos. La muestra se filtró a través de filtros de nylon (0.45  $\mu\text{m}$  y 13 mm de diámetro) antes de llevar una alícuota de 1 ml a un vial para su análisis por cromatografía líquida.

En el caso de las muestras de suelo que habían estado en contacto con las soluciones concentradas de tensioactivos, fue necesaria la puesta a punto de un procedimiento diferente de extracción de la muestra, ya que la presencia del tensioactivo modificó las propiedades superficiales del suelo haciendo que la extracción con diclorometano fuera ineficaz.

Para la puesta a punto de dicho método se prepararon suspensiones en las mismas condiciones que las utilizadas en los ensayos de biodegradación (1 gramo de suelo seco y 70 ml de fase acuosa). Se ensayó el método de extracción de los HAPs añadiendo a la suspensión una solución acuosa (en medio de mineralización, MM) de los tensioactivos Tritón X-100 y Brij 35. La concentración ensayada, para cada uno de ellos fue la más alta utilizada en los ensayos de biodegradación y desorción (40 mg/ml). Tras equilibrar el sistema mediante agitación durante 72 horas, se decantó el suelo. La fase se filtró a través de filtros de celulosa y se analizó por HPLC mediante inyección directa. El residuo sólido se secó a 40° C y se trituroó en mortero de ágata mezclado con sulfato sódico anhidro (99,0 %, Panreac), en una cantidad igual en peso a la de la muestra de suelo, con el fin de eliminar la humedad presente en la muestra (118). Posteriormente, la muestra se sometió a una extracción Soxhlet con 100 ml de acetona durante 8 horas (27). El resto del procedimiento de purificación y preparación de la muestra para su análisis por cromatografía líquida se realizó de forma similar a la expuesta anteriormente para el resto de las muestras.

## II.5 ANÁLISIS DE HAPs POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Los análisis del contenido en HAPs de los suelos B original, B1 y E6068, así como para las muestras a tiempos intermedios y tiempo final de los ensayos de biodegradación se realizaron bajo las mismas condiciones cromatográficas. Estas condiciones se aplicaron también a los análisis de muestras procedentes de los ensayos de desorción con Tenax y con tensioactivos.

Los análisis se llevaron a cabo con un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) (Waters 2690 Separations Module) equipado con detector UV-VIS (Waters 996 Photodiode Array Detector) La columna empleada en el análisis de HAPs era específica para este tipo de compuestos (Waters HAP Columns, C18, 5 $\mu$ m, 4.6 x 250 mm). Como fases móviles se utilizaron acetonitrilo de calidad HPLC (Merck) y agua milli-Q. Ambas fases se filtraron previamente a su uso, utilizando para ello filtros de nylon de 45 micras de poro. Las condiciones cromatográficas utilizadas en los análisis fueron las siguientes: 1 ml/min de flujo de fase móvil, 30° C de temperatura en el horno, 20  $\mu$ l de volumen de muestra y 50 minutos de tiempo de análisis. Se utilizó gradiente de fase móvil (122) (tabla II.1). Estas condiciones permitieron la adecuada separación de los picos correspondientes a los 16 HAPs analizados, como aparece en la figura II.3.

La recta de calibrado empleada en el análisis de las muestras fue del orden de  $\mu$ g/ml, siendo éste el rango de concentraciones de las muestras analizadas. El límite de detección (LD) para cada uno de los 16 HAPs analizados se calculó como tres veces la desviación estándar relativa de la ordenada en el origen de la recta de calibrado. De la misma forma, el límite de cuantificación (LC) se calculó como diez veces la desviación estándar relativa de la ordenada en el origen de dicha recta. Estos valores se recogen en la tabla II.2.

**Tabla II.1:** Gradiente utilizado en el análisis por cromatografía de muestras de suelo.

GRADIENTE DE LA FASE MOVIL		
TIEMPO (min)	% ACETONITRILO	% AGUA
0	45	55
5	45	55
25	95	5
31	100	0
38	100	0
43	45	55

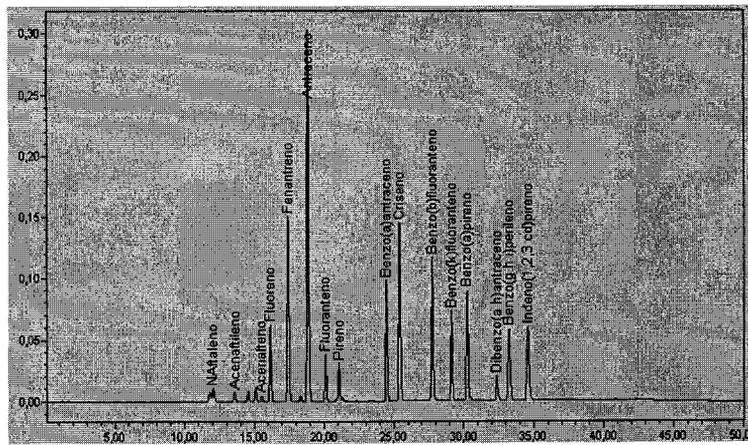


Figura II.3 Cromatograma obtenido para el patrón con los 16 HAPs.

Tabla II.2 Límites de detección y de cuantificación de los 16 HAPs analizados por HPLC.

HAPs	Límite detección ( $\mu\text{g/ml}$ )	Límite de cuantificación ( $\mu\text{g/ml}$ )
Naftaleno	0,66	2,20
Acenafileno	0,54	1,81
Acenafeno	0,22	0,75
Fluoreno	0,61	2,05
Fenantreno	0,58	1,94
Antraceno	0,34	1,12
Fluoranteno	0,62	2,07
Pireno	0,12	0,40
Benzo(a)antraceno	0,66	2,19
Criseno	0,55	1,84
Benzo(b)fluoranteno	0,67	2,23
Benzo(k)fluoranteno	0,60	1,99
Benzo(a)pireno	0,58	1,95
Dibenzo(ah)antraceno	0,59	1,97
Benzo(ghi)perileno	0,72	2,41
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,70	2,35

## II.6 BACTERIAS, MEDIOS, CONDICIONES DE CULTIVO Y PREPARACIÓN DE INÓCULOS.

Las bacterias utilizadas en este estudio tienen como origen un suelo contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y son capaces de crecer con dichos compuestos individuales como única fuente de carbono y de energía: *Mycobacterium sp.* VM 552 capaz de degradar fenantreno, fluoranteno y pireno (124, 132) y *Sphingomonas sp.* LH 128, degradadora de fenantreno (8, 9). La estirpe *Mycobacterium sp.* VM 552 se aisló de un suelo contaminado, mediante un método de aislamiento en el que se usó una membrana de Teflón donde previamente se habían adsorbido los HAPs (9). La estirpe *Sphingomonas sp.* LH 128 se aisló mediante el método de enriquecimiento en medio acuoso. Ambas bacterias fueron cedidas por el Dr. Dirk Springael (Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek, VITO, Mol, Bélgica). Las bacterias se mantuvieron en el medio de sales minerales apropiado para el crecimiento de cada una de ellas, en agitación continua a 30° C y con 0.2 % del HAP respectivo como única fuente de carbono.

Se utilizaron dos medios líquidos diferentes para cultivar las estirpes: un medio mínimo Tris, al que se llamó medio Bélgica (MB) y un medio fosfato tamponado, al que se denominó medio Suiza (SW). El primero de los medios se utilizó con la estirpe LH 128 y el segundo con la estirpe VM 552. La composición del medio MB en 1 litro de agua destilada, era: 6 g de Tris, 4,67 g de NaCl, 1,5 g de KCl, 0,42 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,20 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,022 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0,080 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0,0048 g de Fe(III)NH<sub>4</sub> citrato, y para aportar los nutrientes en concentraciones traza, se añadió 1 ml de una solución compuesta por 100 ml de agua destilada y 14,4 mg de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 9,8 mg de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 6,18 mg de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 19 mg de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1,7 mg de Cl<sub>2</sub>Cu·2H<sub>2</sub>O, 2,37 mg de NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 3,6 mg de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. Después de ajustar el pH a 7 con HCl 2N, el medio se esterilizó en autoclave.

El medio SW tenía la siguiente composición, por litro de agua destilada: una solución A compuesta por 1,75 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O y 0,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, y otra solución B de 0,5 g de (HN<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O y 0,05 g de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O. Ambas soluciones se autoclavaron por separado. Como elementos traza se añadieron, a través de filtro Millipore de diámetro de poro 0.2 μm, 2,5 ml de una solución C compuesta, por cada litro de agua destilada, por 800 mg de Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mg de FeCl<sub>2</sub>, 10 mg de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 4mg de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1 mg de Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 mg de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2 mg de ZnCl<sub>2</sub>, 0,5 mg de LiCl, 0,5 mg de SnCl<sub>2</sub>, 1mg de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2 mg de KBr, 2 mg de KI y 0,5 mg de BaCl<sub>2</sub>.

En los ensayos de mineralización y de biodegradación realizados, así como en el estudio de la cinética de desorción de los HAPs en presencia de tensioactivos, se utilizó un medio de cultivo al que hemos llamado medio de mineralización (MM), el cual se preparó de la siguiente forma: una solución A compuesta 900 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 100 mg de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, una solución B de 100 mg de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 100 mg de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 80 mg de CaCl<sub>2</sub>. Ambas soluciones se autoclavaron por separado y una vez enfriadas se mezclaron. A la mezcla se le añadieron, a través de filtro estéril Millipore (0,2 μm), 10 mg de FeCl<sub>3</sub>·6 H<sub>2</sub>O, y 1 ml de una solución C que contenía por litro de agua destilada los siguientes elementos traza: 1,4 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2 mg

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 2 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 2 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . El pH final de este medio fue de 5,70 (96), (109).

Para la preparación de los inóculos de ambas bacterias se siguió el mismo procedimiento. Los cultivos se filtraron a través de una placa porosa de 40  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para eliminar los cristales del HAP presentes en el cultivo como fuente de carbono. El cultivo filtrado se lavó tres veces con medio de mineralización estéril, centrifugando durante 10 minutos a 8000 rpm. Tras el lavado, el pellet obtenido se resuspendió en un volumen conocido de medio de cultivo. Las células viables se cuantificaron 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 10 vis, Spectronic Unicam). La estirpe de *Sphingomonas* forma en medio TSA colonias pequeñas amarillas mientras que las colonias de *Mycobacterium* son de mayor tamaño, color anaranjado y de aspecto opaco y mucoso.

En los ensayos realizados para el estudio de la afinidad de *Mycobacterium sp.* VM 552 por fenantreno, la preparación del inóculo utilizado se realizó de forma diferente a la explicada anteriormente. En este caso el inóculo se preparó a partir de medio sólido en placas de Petri. Estas placas se prepararon con medio SW, idóneo para el crecimiento de dicha bacteria, al que se añadió agar (16 g por litro). Tras esterilizar en autoclave se añadió fenantreno disuelto en acetona (0,1 g en 3 ml de acetona siendo la concentración final de 0,1g de fenantreno por litro de medio), agitando en caliente para homogeneizar y para evaporar toda la acetona añadida. Posteriormente, el medio se vió en placas y se dejó enfriar hasta su solidificación. Las placas se sembraron con *Mycobacterium sp.* VM 552 procedente de cultivos líquidos utilizando 0,1 ml de cultivo en la siembra de cada placa y manteniéndose éstas en estufa a 30° C durante aproximadamente una semana hasta la aparición de colonias. A continuación, la biomasa presente en la placa se arrastró con un volumen de 2 a 3 ml de medio de mineralización estéril y con ayuda de un asa de platino hasta un tubo de centrifuga de vidrio también estéril. Para la obtención de pellet, se centrifugó durante 10 minutos a 7000 rpm. Tras retirar la fase acuosa, el pellet se resuspendió en 5 ml de medio de mineralización fresco. El conteo de viables se realizó por medida de la densidad óptica a 600 nm del pellet resuspendido.

## II.7 CINÉTICA DE DESORCIÓN DE HAPs CON TENAX.

La cinética de desorción de los HAPs se determinó por duplicado a temperatura del laboratorio ( $23 \pm 2$  °C) mediante un proceso de extracción en fase sólida con un polímero poroso denominado Tenax. Este polímero está constituido por el óxido de 2,4-difenil-p-fenileno. Como paso previo a su uso el polímero se acondicionó mediante sucesivos lavados con agua destilada, acetona y hexano (3 lavados de 10 ml por cada gramo de Tenax) y se secó en estufa a 80° C durante una noche.

Las experiencias se realizaron en tubos de centrifuga de acero inoxidable de 50 ml de capacidad (Sorvall) con tapón también de acero. Los tapones se recubrieron con papel de aluminio para evitar la adsorción de los HAPs a la goma de ajuste del cierre. En ellos se introdujo una mezcla de Tenax (0,7 g), suelo (0,5 g peso seco), agua milli-Q (35 ml) y formaldehído al 40 % (0,5 ml por cada 100 ml de fase acuosa) como biocida. La actividad biocida del formaldehído se comprobó en ensayos de mineralización con <sup>14</sup>C-fenantreno en suspensiones iguales a las empleadas en los ensayos de desorción (1 g de suelo seco y 70 ml de fase acuosa) e incubadas con agitación orbital en matraces biométricos (apartado II.12). Tras 40 días de ensayo no se observó mineralización significativa.

Los tubos se sometieron a agitación constante en agitador de volteo. A intervalos de tiempo determinados, el Tenax se renovó por Tenax nuevo. Para ello, los tubos se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos. La separación del Tenax y de la suspensión de suelo fue fácil y rápida ya que el Tenax permanece flotando sobre la fase acuosa y adherido a las paredes del tubo libre de líquido. A continuación se transfirió el tenax con ayuda de una espátula a un matraz Erlenmeyer de 250 ml con tapón de rosca, que contenía 50 ml de acetona. La espátula se lavó con agua destilada después de cada transferencia de Tenax para evitar que la espátula mojada en acetona modificara el reparto de solutos en la fase acuosa del tubo. Tras recoger completamente el tenax, se añadieron a la suspensión de tenax en acetona otros 50 ml de hexano. Posteriormente, se agitó (150 rpm) durante 5 horas para extraer completamente los HAPs desorbidos del tenax. (23-25).

El Tenax fue separado de la mezcla acetona - hexano mediante decantación. A continuación, se llevó la mezcla a un matraz corazón y se redujo el volumen en el rotavapor hasta aproximadamente unos 2 ml, cambiando la fase a acetonitrilo en el mismo rotavapor, por ser este solvente la fase móvil utilizada en el análisis de los HAPs por HPLC. El extracto se llevó a un volumen conocido de acetonitrilo y por último, como paso previo a su análisis, el extracto se filtró a través de un filtro de nylon (0,45 µm y 13 mm de diámetro) para evitar la entrada de partículas de suelo y/o Tenax en la columna del cromatógrafo. Para realizar un balance de masas al final de la cinética de desorción y determinar la fracción residual de HAPs resistentes a la desorción con Tenax el suelo se sometió a una extracción Soxhlet con diclorometano siguiendo el protocolo expuesto en el apartado II.4 de este capítulo de materiales y metodología.

La cinética de desorción de los HAPs en el suelo E6068 se realizó de forma diferente a la del suelo B ya que mediante centrifugación no se produjo la separación

correcta de la suspensión de suelo y el Tenax. Por ello, las experiencias para el suelo E6068 se realizaron en embudos de decantación de 250 ml de capacidad y tapón de vidrio. En ellos se introdujo una mezcla de 2 g de suelo seco, 140 ml de agua milli-Q, 1,5 g de Tenax y 0,7 ml de formaldehído al 40 % como biocida, condiciones estas similares a las empleadas anteriormente. Los embudos se sometieron a agitación continua en agitador orbital. A determinados tiempos, el Tenax se renovó por Tenax nuevo. La separación de la suspensión y el Tenax se llevó a cabo por decantación, al quedar este adherido a las paredes del embudo. La suspensión se pasó a otro embudo de decantación para continuar la extracción y el Tenax se llevó a un matraz Erlenmeyer de 250 ml con tapón de rosca, arrastrándolo de las paredes del embudo con 50 ml de acetona. A continuación se añadieron al matraz 50 ml de hexano y se sometió a agitación durante 5 h para la extracción de los HAPs desorbidos del Tenax. La preparación de la muestra para su análisis por HPLC se realizó de forma similar a la descrita anteriormente para el suelo B.

Los resultados experimentales se ajustaron matemáticamente a un modelo de desorción bifásico mediante la ecuación (1). Las fracciones de desorción rápida y lenta ( $F_{ráp}$  y  $F_{len}$ ), así como las constantes de desorción rápida y lenta ( $K_{ráp}$  y  $K_{len}$ ) fueron determinadas por mínimos cuadrados (Excel solver) de las fracciones residuales acumulativas entre los valores experimentales y los calculados de  $\ln(S_t/S_0)$  de la siguiente ecuación:

$$S_t / S_0 = F_{ráp} \cdot \exp(-K_{ráp} \cdot t) + F_{len} \cdot \exp(-K_{len} \cdot t) \quad (1)$$

donde  $S_t$  y  $S_0$  son las concentraciones de cada HAP en el suelo a tiempo  $t$  e inicial respectivamente.

## II.8 CÁLCULO DE LA CMC DE LOS TENSOACTIVOS.

El valor de la concentración crítica micelar (CMC) de cada uno de los tensioactivos empleados se determinó a través de medidas de la tensión superficial de sus soluciones acuosas utilizando un tensiómetro de anillo de platino (TD1 Lauda, Hucoa-Erlöss) (70). Las soluciones de tensioactivo se prepararon en agua destilada y en MM por ser éste el medio de cultivo que posteriormente se emplearía en los ensayos de mineralización, biodegradación y desorción.

Las medidas de tensión superficial se realizaron por duplicado en cubetas de vidrio de 20 ml, en un rango de concentraciones que abarcó desde 0 mg/ml (medida del agua destilada y del MM) hasta 0,5 mg/ml del tensioactivo. Las medidas se realizaron a la temperatura del laboratorio ( $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ). Tras cada medida de tensión superficial, el anillo de platino se limpió llevándolo a la llama hasta ponerlo al rojo, eliminándose así los posibles restos de tensioactivo que pudieran interferir en las siguientes medidas. El valor de CMC se calculó como el punto de inflexión de la curva obtenida al representar la tensión superficial (dyn/cm) de las soluciones acuosas de cada una de las concentraciones ensayadas frente al el logaritmo de la concentración de tensioactivo ( $\mu\text{g/ml}$ ) (33).

## II.9 CINÉTICA DE DESORCIÓN DE HAPs CON TENSOACTIVOS.

La proporción y extensión de la desorción de los HAPs del suelo B con tensioactivos se midió utilizando concentraciones de dichos agentes superiores a sus valores de CMC en varios ordenes de magnitud (0,5, 10, 20 y 40 mg/ml tanto para Brij 35 como para Tritón X-100) (20, 29). Para ello, se preparó una solución stock de 140 mg/ml de cada uno de los tensioactivos en fase acuosa, concretamente en MM.

Los ensayos se realizaron en tubos de centrifuga de acero inoxidable de 50 ml de capacidad (Sorvall). En ellos se introdujeron 0,5 g de suelo seco, 35 ml de fase acuosa (MM y solución de tensioactivo) y 0,40 ml de formaldehído al 40 % como biocida (0,5 ml por cada 100 ml de fase acuosa presente) (136). Estas condiciones guardaban la misma proporción de suelo – fase acuosa que las utilizadas en los ensayos de desorción con Tenax. A intervalos de tiempo iguales a los seleccionados en los ensayos de desorción, las suspensiones de suelo se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos. Se tomó una alícuota del sobrenadante para el análisis por HPLC de los HAPs presentes en la fase acuosa. El resto de fase acuosa se retiró cuidadosamente evitando retirar parte del pellet. El suelo se "lavó" repetidamente para determinar la cantidad total de HAPs desorbidos por la presencia del tensioactivo. En cada uno de esos lavados, se añadieron 35 ml de solución de tensioactivo nueva. Al final del ensayo, el suelo se secó a  $40^\circ \text{C}$  en estufa y se sometió a una extracción Soxhlet con acetona, previo tratamiento de la muestra con sulfato sódico anhidro (apartado II.4) para la determinación de la fracción resistente de estos contaminantes a la desorción con tensioactivos (27).

## II.10 ABSORCIÓN DE LOS TENSIOSACTIVOS AL SUELO.

Para la determinación de la concentración de tensioactivo absorbida al suelo contaminado, se utilizaron medidas de tensión superficial de la fase acuosa de suspensiones de suelo en presencia de distintas concentraciones de tensioactivo. Para ello se prepararon suspensiones en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 1 g de suelo seco y 70 ml de fase acuosa (MM). Se añadieron 0,35 ml de formaldehído al 40 % como biocida (0,5 ml por cada 100 ml de fase acuosa). Estas condiciones eran similares a las empleadas en los ensayos de desorción de HAPs del suelo contaminado tanto con tenax como con tensioactivos, así como en los experimentos de mineralización y biodegradación realizados.

Se prepararon soluciones stock de Brij 35 y Tritón X-100 en MM de 1 y 140 mg/ml para cada uno de ellos de tal forma que la concentración final de tensioactivo en los 70 ml de fase acuosa variaba desde 0 a 40 mg/ml. Las suspensiones de suelo con tensioactivo se equilibraron en un agitador orbital durante 24 horas (tiempo en el que se observó la mayor tasa de mineralización de los HAPs). Tras este tiempo, una muestra de 10 ml de suspensión se llevó a un tubo de centrifuga de vidrio (pyrex, 15 ml) y se centrifugó a 7000 rpm durante una hora. Una alícuota de 1 ml del sobrenadante se analizó por HPLC mediante inyección directa para la medida de la desorción micelar de los HAPs por efecto de los tensioactivos. El resto del sobrenadante se utilizó para la medida de la tensión superficial. Estas medidas se realizaron por duplicado para cada una de las concentraciones de Brij 35 y Tritón X-100 ensayadas.

El valor de CMC de la suspensión ( $CMC_{\text{suelo}}$ ) se calculó de igual forma que para el caso de las soluciones acuosas de tensioactivo, es decir, se tomó como valor de CMC el punto de inflexión de la curva obtenida al representar la tensión superficial medida en la fase acuosa tras equilibrar el sistema frente el logaritmo de la concentración de tensioactivo en la suspensión. La concentración de tensioactivo absorbido al suelo se determinó por diferencia entre el valor de  $CMC_{\text{suelo}}$  obtenido para la suspensión de suelo y el valor de CMC de la solución acuosa en MM del tensioactivo puro (20, 43).

## II.11 ENSAYOS DE AFINIDAD

Los ensayos de afinidad de la bacteria *Mycobacterium sp. VM 552* por fenantreno disuelto en presencia de tensioactivos a diferentes concentraciones (tanto por encima como por debajo de la  $CMC_{\text{MM}}$  de cada uno de los tensioactivos), se realizaron mediante ensayos de mineralización con  $^{14}\text{C}$  - fenantreno. Los ensayos se realizaron en tubos de vidrio estériles de 15 ml de capacidad, a los cuales se acopló en el tapón una pequeña trampa de sosa para la medida del  $^{14}\text{CO}_2$  producido.

Las concentraciones de fenantreno ensayadas fueron 0,157 y 1,357  $\mu\text{g/ml}$ , (por debajo y por encima, respectivamente de la solubilidad del fenantreno). Estas concentraciones se consiguieron con fenantreno marcado en el caso de la concentración más diluida y complementando con fenantreno para la

concentración más alta ensayada. Tanto el sustrato marcado como el no marcado se añadieron a cada tubo disuelto en medio acuoso (MM). Se añadieron a cada tubo 2 ml del sustrato marcado, volumen que equivalía a 80000 dpm.

Las concentraciones de tensioactivo ensayadas, fueron de 0,05 y 10 mg /ml en el caso de Tritón X-100 y de 0,05 y 20 mg /ml, para Brij 35, encontrándose éstas por debajo y por encima respectivamente de la  $CMC_{MM}$  de cada uno de los tensioactivos. Estas concentraciones se prepararon a partir de dos soluciones stock de 0,2 y 100 mg/ml para cada uno de los tensioactivos. Se añadieron 1,25 ml y 0,5 ml respectivamente de dichas soluciones para alcanzar las concentraciones de 0,05 y 10 mg/ml en un volumen total de 5 ml de fase acuosa por tubo en el caso de Tritón X-100, y 1,25 y 1 ml de dichas soluciones para alcanzar las concentraciones de 0,05 y 20 mg/ml en un volumen total de 5 ml de fase acuosa por tubo en el caso del ensayo con Brij 35.

El resto del volumen, hasta completar los 5 ml de fase acuosa por tubo, se añadió como medio de mineralización estéril (2 ml) e inóculo (50  $\mu$ l preparado a partir de placas, apartado II.6).

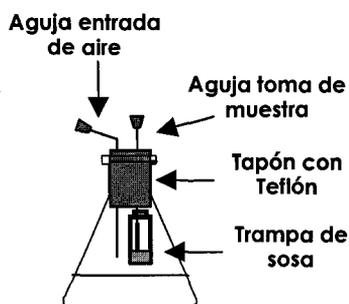
## II.12 ENSAYOS DE MINERALIZACIÓN Y BIODEGRADACIÓN.

### II.12.1 MINERALIZACIÓN Y BIODEGRADACIÓN DE FENANTRENO EN SISTEMAS ACUOSOS EN PRESENCIA DE TENSIOSACTIVOS.

Para medir la mineralización de fenantreno en sistemas acuosos se prepararon ensayos por duplicados en matraces Erlenmeyer de 250 ml. Se añadieron entre 80000 y 100000 dpm de [9-<sup>14</sup>C] - fenantreno y suficiente compuesto no marcado en un volumen final de 70 ml de MM por matraz. La cantidad total de fenantreno en cada uno de los matraces fue de 1,4 – 1,5 mg, siendo esta similar a la que contiene un gramo de suelo contaminado B, siendo por tanto comparables los resultados a los ensayos de biodegradación en suspensión. El sustrato se añadió en una solución de diclorometano, que se dejó evaporar. Se prepararon dos series de matraces diferentes, los cuales fueron inoculados con 10<sup>7</sup> CFU/ml de las estirpes *Mycobacterium* y *Sphingomonas*, respectivamente.

El tensioactivo Tritón X-100 se añadió en forma de solución acuosa (preparada en medio de mineralización) a partir de una solución concentrada de 70 mg/ml. La concentración final del tensioactivo en cada matraz fue de 10 mg/ml. Los matraces se cerraron con un tapón envuelto en cinta de teflón para impedir la absorción de los HAPs a la goma y evitar además que las muestras se secan durante el ensayo. Se mantuvieron a temperatura del laboratorio (23 ± 2° C) y en agitación continua (100 rpm) durante todo el tiempo del ensayo.

Se midió la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> mediante medidas de la radioactividad presente en una trampa de sosa (figura II.4). Esta trampa estaba formada por un vial de 5 ml suspendido del tapón con 1 ml de NaOH 0,5 M.



**Figura II.4** Matraz biométrico para ensayos de mineralización

Periódicamente, la solución alcalina se retiró de la trampa y se reemplazó por sosa nueva. La solución de NaOH se mezcló con 5 ml de líquido de centelleo y la mezcla se mantuvo en oscuridad durante al menos 8 h para la disipación de la quimioluminiscencia. La radioactividad se midió mediante contador de centelleo líquido modelo Beckman LS6500.

Los resultados se dieron como medias de las medidas de los tratamientos por duplicado. Se utilizó el test t de student para analizar estadísticamente las diferencias entre las medias a  $p = 0,05$ .

Para el estudio de la biodegradación de los HAPs en sistemas acuosos, se prepararon matraces en las mismas condiciones que para el estudio de mineralización con la única diferencia de que no se añadió sustrato marcado ni se colocaron trampas de sosa en los matraces. A determinados tiempos, se tomó una alícuota de 2 ml, y se centrifugó a 7000 rpm durante 6 minutos para el análisis de la concentración de fenantreno residual mediante inyección directa en el HPLC.

### **II.12.2 MINERALIZACIÓN Y BIODEGRADACIÓN DE HAPs EN SUSPENSIONES DE SUELO POR POBLACIONES MICROBIANAS AUTÓCTONAS.**

Para medir la mineralización de HAPs en suspensiones de los suelos B y E6068 se realizaron ensayos por duplicado en matraces Erlenmeyer de 250-ml para cada uno de los sustratos seleccionados. Se añadieron entre 80000 y 100000 dpm de [9-<sup>14</sup>C] - fluoreno, [9-<sup>14</sup>C] - fenantreno, [1, 2, 3, 4, 4a, 9a-<sup>14</sup>C] antraceno, [3-<sup>14</sup>C] fluoranteno y [4, 5, 9, 10-<sup>14</sup>C] pireno. Los sustratos marcados se añadieron en solución acuosa (MM) para facilitar su homogeneización en el suelo. Se añadieron, a cada matraz, 1 gramo de suelo seco y 70 ml de medio de cultivo (MM), con el fin de mantener las mismas condiciones en las que se determinó la cinética de desorción de los HAPs del suelo. Los matraces biométricos empleados se cerraron de igual forma que los citados en el apartado II.12.1. Se mantuvieron a temperatura del laboratorio (23 ± 2° C) y en agitación continua durante todo el tiempo que duró el ensayo. Se midió la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> como se ha descrito anteriormente en el apartado II.12.1.

Para el estudio de la biodegradación de los HAPs nativos, se prepararon paralelamente matraces en las mismas condiciones que para el estudio de mineralización con la única diferencia de que no se añadió sustrato marcado ni se colocaron trampas de sosa en los matraces. Al final del experimento, se congelaron los matraces por duplicado de cada tratamiento a - 80° C para detener la actividad microbiana. Posteriormente, se analizaron las cantidades residuales de los HAPs mediante HPLC previa extracción Soxhlet, siguiendo el protocolo descrito en el apartado II.4.

### **II.12.3 MINERALIZACIÓN Y BIODEGRADACIÓN DE HAPs EN SUSPENSIONES DE SUELO INOCULADAS.**

Para medir la mineralización de HAPs en suspensiones de suelo inoculadas se prepararon ensayos por duplicados en matraces Erlenmeyer de 250-ml para cada uno de los sustratos seleccionados. Se añadieron entre 80000 y 100000 dpm de [9-<sup>14</sup>C] - fenantreno, [3-<sup>14</sup>C] fluoranteno y [4, 5, 9, 10-<sup>14</sup>C] pireno en matraces diferentes. Los sustratos marcados, elegidos por ser estos los que la bacteria *Mycobacterium sp.* VM 552 es capaz de mineralizar, se añadieron en solución acuosa (MM) para facilitar su absorción en el suelo. Se añadieron, a cada matraz, 1 gramo de suelo seco y estéril (autoclavado 3 veces) y 70 ml de MM, para mantener las mismas condiciones que en los ensayos anteriores, así como en los ensayos de desorción. La esterilidad de los suelos se confirmó mediante el seguimiento de la mineralización de suspensiones de suelo estériles. Tras 47 días de ensayo, la extensión máxima de mineralización alcanzada en estos sistemas fue del 0 %.

Los matraces fueron inoculados con 1 ml de una suspensión de *Mycobacterium sp.* VM 552 con 10<sup>6</sup> - 10<sup>7</sup> CFU / ml. El número de células en el inóculo era suficiente para causar el comienzo inmediato de la degradación sin fase de aclimatación previa (77). El inóculo se preparó siguiendo el protocolo expuesto en el apartado II.6.

Los matraces se cerraron, al igual que en el caso citado en el apartado II.12.1, con trampas de sosa, excepto los destinados al estudio de la biodegradación de los

HAPs nativos. El ensayo se realizó a temperatura del laboratorio ( $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ) manteniéndose los matraces en agitación continua durante todo el tiempo que duró el ensayo. La producción de  $^{14}\text{CO}_2$  se midió como se ha descrito anteriormente en el apartado II.12.1. La fracción resistente a biodegradación a tiempo final del ensayo, se determinó siguiendo los mismos pasos que en el apartado anterior II.12.3.

#### **II.12.4 MINERALIZACIÓN Y BIODEGRADACIÓN DE HAPs EN SUSPENSIONES DE SUELO INOCULADAS EN PRESENCIA DE TENSIOSACTIVOS.**

El estudio de la mineralización de los diferentes HAPs en suelos en suspensión se realizó mediante ensayos por duplicado, para los diferentes tratamientos, en matraces Erlenmeyer de 250 ml. Cada matraz se marcó con aproximadamente 90000 dpm del sustrato, el cual fue preparado y añadido al suelo en solución acuosa (MM). Las suspensiones se prepararon con 1 g de suelo seco y estéril (autoclavado 3 veces) en 70 ml de fase acuosa (MM).

Los tensioactivos se añadieron a partir de una solución más concentrada. Se preparó, para cada uno de los tensioactivos, una solución concentrada de 140 mg/ml en el mismo medio en el que se habían preparado las suspensiones (MM). Se añadieron 0,25, 2,5, 5, 10 ó 20 ml de dicha solución a cada matraz para conseguir la concentración final de 0,5, 5, 10, 20 ó 40 mg/ml respectivamente por matraz. La suspensión se mantuvo en agitación durante 72 horas para equilibrar el suelo con el tensioactivo y homogeneizar el sustrato marcado. Tras este tiempo, las suspensiones se inocularon con 1 ml de suspensión con  $10^7$  CFU/ml de *Mycobacterium sp.* VM 552. El inóculo se preparó siguiendo el protocolo expuesto en el apartado II.6. Los matraces, al igual que en los ensayos citados en los apartados anteriores, fueron provistos de trampas de sosa estériles. El ensayo se realizó a la temperatura del laboratorio ( $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ) manteniendo los matraces en agitación continua durante todo el ensayo. Se midió la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  como se ha descrito anteriormente en el apartado II.12.1.

El estudio de la biodegradación de los HAPs nativos a lo largo del ensayo, así como la determinación de la fracción resistente a la biodegradación a tiempo final, se realizó de igual forma que en el apartado II.12.1, con la excepción de que la extracción de los HAPs se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado II.4 para muestras de suelo en contacto con tensioactivos.

El estudio de la/las poblaciones microbianas presentes en el suelo se realizó mediante técnicas de análisis molecular (apartado II.13). Para la preservación del ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano, las muestras seleccionadas a tiempos intermedios de los diferentes tratamientos, así como a tiempo final de los ensayos de biodegradación, se trataron con glicerol. Para ello, y tras eliminar la fase acuosa de la suspensión, se añadió al suelo húmedo 5 ml de una solución estéril de glicerol - cloruro sódico. Esta solución estaba compuesta por 0,85 g de cloruro sódico y 15 g de glicerol (15%) por cada 100 ml de agua. A continuación, las muestras se congelaron a  $-80^\circ \text{C}$  hasta el momento de su análisis.

## II.13 TÉCNICAS DE ANÁLISIS MOLECULAR.

### II.13.1 EXTRACCIÓN DEL DNA:

La cantidad de DNA necesaria para realizar PCR es del orden de 1  $\mu\text{g}$ , lo cual equivale aproximadamente a  $1.1 \times 10^8$  bacterias. En los suelos, población microbiana presente es del orden de  $10^8 - 10^9$  bacterias por gramo de suelo, por tanto, 1g de suelo será la cantidad necesaria para obtener 1  $\mu\text{g}$  de DNA bacteriano (55). Debido al alto contenido en arcillas del suelo estudiado, se necesitó el desarrollo de un nuevo método de extracción del DNA bacteriano para este tipo de suelos, con el fin de disminuir la fuerte adhesión de las bacterias al suelo y favorecer la extracción del DNA.

Para ello, la muestra de suelo, tras ser descongelada, se centrifugó durante 20 minutos a 12000 rpm para eliminar el glicerol en el que se había conservado. A continuación se introdujo 1 g de suelo junto a 1,5 g de bolas de vidrio (0,1mm de diámetro, Gasperten) y 2 ml de tampón fosfato estéril ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0,1M, pH 8) en un tubo de 10 ml también estéril. Se centrifugó en centrífuga Bead Beating (Ribolyser) durante 45 segundos a velocidad 6,0 para provocar la lisis mecánica de las bacterias. A continuación, se añadieron 80  $\mu\text{l}$  de lisozima (50 mg lisozima / ml Tris-HCl (hidroximetil amino metano,  $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$  10 mM), pH 9) y se agitó durante 30 minutos para asegurar la lisis enzimática de las células. Posteriormente, se añadieron 150  $\mu\text{l}$  de SDS (sodium dodecyl sulfate) al 20 % y 0,5 ml de acetato amónico estéril (8 M) para la lisis química. Tras agitar durante 10 minutos se centrifugó a 7000 rpm durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante en otro tubo de 10 ml también estéril.

Seguidamente, se añadieron 2 ml de cloroformo – Isoaminoalcohol (24:1) y se agitó durante una hora para extraer el DNA y eliminar los restos de bacterias (proteínas, enzimas, etc.) que hayan podido ser extraídas junto al DNA bacteriano. De nuevo, se centrifugó a 7000 rpm durante 15 minutos tras lo cual se recuperó la fase acuosa llevandola a otro tubo de 10 ml estéril. Se añadieron 0,8 volúmenes de isopropanol (100%) por cada volumen de fase acuosa existente, se agitó con vórtex y se dejó precipitar el DNA a  $-20^\circ\text{C}$  durante toda una noche. Transcurrido este tiempo, se centrifugó 25 minutos a 12000 rpm obteniéndose un pellet blanquecino donde se encuentra el DNA. Tras eliminar el sobrenadante cuidadosamente, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos y se resuspendió con 250 – 500  $\mu\text{l}$  de agua milli-Q estéril, dependiendo del tamaño del pellet.

El siguiente paso, previo a la utilización del DNA extraído en PCR, es su limpieza y purificación (proceso de *Clean-up*).

### II.13.2 PURIFICACIÓN DEL DNA EXTRAÍDO.

El proceso de limpieza del DNA extraído del suelo se realizó con un Kit comercial (Wizard DNA Clean-up System, PROMEGA). Este Kit consta de una resina y de minicolumnas (cuya composición no es especificada por la casa comercial), jeringas y un sistema de vacío. El procedimiento seguido constaba de los siguientes pasos:

*Carga del DNA:* En un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml se añadió 1 ml del producto comercial "Wizard clean-up resin" y la muestra de DNA a limpiar. Ambos se mezclaron por inversión. Seguidamente, con una pipeta se introdujo esta mezcla en una jeringa conectada a una minicolumna y ésta a su vez a un sistema de vacío.

*Lavado del DNA:* Tras hacer vacío en el sistema, se añadieron 2 ml de isopropanol al 80 % y se volvió a aplicar vacío. Cuando la solución había pasado a través de la minicolumna, se aplicó de nuevo vacío durante 30 segundos para el secado de ésta. A continuación se traspasó la minicolumna a un tubo de microcentrifuga nuevo y se centrifugó a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar el isopropanol residual procedente del proceso de extracción del DNA.

*Elución del DNA:* Se traspasó de nuevo la minicolumna a otro tubo de microcentrifuga. Se añadieron 50 µl de agua milli-Q estéril y precalentada a 65-70° C y se dejó reposar 1 minuto. Se volvió a centrifugar a máxima velocidad durante 20 segundos para eluir de la minicolumna el DNA limpio. El DNA purificado se conservó a -20° C.

### II.13.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Una vez que el DNA extraído ha sido purificado, éste puede ser utilizado para ser amplificado mediante una reacción enzimática en cadena (PCR, polymerase chain reaction). Se analizó, concretamente, la amplificación de los fragmentos 16S rDNA utilizando cebadores universales para el análisis de la población microbiana en general y cebadores específicos para el estudio de las poblaciones de *Mycobacterium* y *Sphingomonas* presentes en el suelo estudiado (tabla II.3).

La mezcla utilizada para la reacción fue de 50 µl y estaba constituida por 39,05 µl de agua milli-Q estéril, 0,2 µl de Taq polimerasa (Taq DNA Polymerase in Storage Buffer B, 500 u, 5u/µl; Promega), 4 µl de dNTP (10 mM; Promega), 5 µl de buffer (10x, 15mM en MgCl<sub>2</sub>; Promega), 0,5 µl de cebador F-GC y 0,25 µl de cebador R ambos suministrados por QIAGEN OPERON (55). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (ependorff) provisto de la programación mostrada en la tabla II.4.

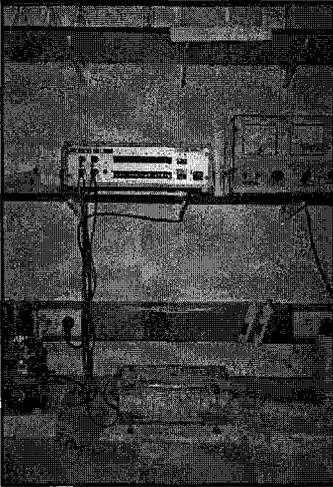
**Tabla II.3** Tipos de cebadores utilizados en la PCR.

TIPO DE CEBADORES	NOMBRE DE LA SECUENCIA	SECUENCIA 5' A 3'
UNIVERSAL	GC-63F	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGC ACGGGGGGCAGGCCTAACACATGCAAGTC
	518R	ATTACCGCGGCTGCTGG
MYCO	Myc0-65F	CATGCAAGTCGAACGGAAA
	Myc0-GC-603R	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGC ACGGGGGGTGTGAGTTTCACGAACA
SPHINGO	Sphingo-108F	CGGTAACGCGTGGAATCTG
	GC-Sphingo-429R	CGCGGGCGGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGG CGCGGGGGGTACAACCCTAAGGCCTTC

**Tabla II.4** Programación del termociclador para un total de 50 ciclos

PROGRAMA PCR (por ciclo)	CEBADOR UNIVERSAL		CEBADOR MYCO		CEBADOR SPHINGO	
	Temperatura (° C)	Tiempo (min)	Temperatura (° C)	Tiempo (sg)	Temperatura (° C)	Tiempo (sg)
Paso 1	95	5	94	15	94	15
Paso 2	95	1	94	3	94	3
Paso 3	55	1	50	10	62	10
Paso 4	65	1	74	30	74	30
Paso 5	65	5	74	120	74	120
Paso 6	4	∞	4	∞	4	∞

#### II.13.4 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.



Los productos obtenidos por PCR, teñidos con LB Agarosa (Loading Buffer; 20% Ficoll; Calbiochem, 0,05% Bromofenol blue; Sigma y 1% de Buffer) junto a una cantidad de Ladder (Ready-Load, 100 bp; Invitrogen) se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (Agarose Ultra Pure, electrophoresis grade; Gibco BRL) en cubeta horizontal durante dos horas (figura II.5), y posteriormente se visualizaron mediante tinción del gel con etilenbromida.

El proceso de electroforesis se realizó en un baño de metacrilato (Hybaid electro-4) que contenía una solución de buffer-etilenbromida (figura II.5). Se mantuvo la intensidad de corriente a 0,9 mA con una fuente para electroforesis (PS 3003; Gibco BRL) durante 1 hora y 45 minutos. Los fragmentos de DNA se observaron mediante transiluminación del gel con luz ultravioleta.

Figura II.5 Fuente y baño usados en electroforesis.

#### II.13.5 LIMITE DE DETECCIÓN PARA PCR EN MUESTRAS DE SUELO.

Para el estudio de la sensibilidad de la técnica de análisis molecular por PCR en muestras de suelo, cantidades conocidas de *Mycobacterium* sp. VM 552 se añadieron al suelo en diferentes concentraciones, como paso previo a la extracción, purificación, PCR y electroforesis en gel de agarosa del DNA, siguiendo los pasos explicados en los apartados anteriores (76, 77).

El inóculo utilizado procedía de un cultivo líquido de *Mycobacterium*, crecido en fenantreno al 0,2 % como única fuente de carbono y densidad óptica a 600 nm de 0,8, lo cuál correspondía aproximadamente a una población de  $8 \times 10^8$  bacterias/ml. Un volumen de 5 ml de este cultivo se filtró a través de una pipeta Pasteur estéril rellena de lana de vidrio para eliminar los cristales de fenantreno disueltos. Esta alícuota se centrifugó a 7000 rpm y 15° C durante 10 minutos. El pellet obtenido se lavó con tapón fosfato una vez y a continuación se resuspendió en 1 ml del mismo.

Muestras de 0,25 g de suelo se inocularon con 100  $\mu$ l de las diferentes diluciones preparadas del inóculo (desde  $10^8$  hasta  $10^2$  CFU/ml). Las diluciones se sembraron en placas de TSA para recuento de viables.

### II.13.6 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).



Para el estudio de las poblaciones bacterianas específicas, el DNA extraído y purificado del suelo se sometió a una electroforesis en gel de agarosa con gradiente de desnaturizante (DGGE). Para ello se utilizó un sistema de electroforesis INGENYphorU que consistía principalmente en una fuente de corriente, un compartimento de metacrilato, que incluía separadores, peines, placas de vidrio, un cátodo de grafito y un ánodo de platino, un baño termostático, una bomba peristáltica y un mezclador de gradiente con agitación (figura II.6).

**Figura II.6** Sistema de electroforesis empleado en DGGE.

Las muestras de DNA empleadas en DGGE fueron aquellas que habían sido anteriormente amplificadas por PCR y que tenían un tamaño de aproximadamente 500 pares de bases (bp). Estas muestras se tiñeron con LOADING BUFFER DGGE (0,25 ml de Bromofenol blue 2 %; Sigma, 0,25 ml de Xileno Cianol 2 %; Merck, 7 ml Glicerol 100 % y 2,5 ml de agua destilada) para la posterior visualización bajo luz ultravioleta de las bandas obtenidas.

Se utilizó una matriz de poliacrilamida al 6 % que permitió la separación de fragmentos de entre 300 y 1000 pares de bases. La formación del gel se realizó mediante una reacción de polimerización entre un iniciador (TEMED, NNNN-Tetrametiletilendiamina) y un propagador (APS, Persulfato de amonio). El gradiente se formó, mediante agitación con muesca magnética en uno de los tubos del mezclador de gradiente, permitiendo la comunicación, tipo vasos comunicantes, entre los dos compartimentos de la cubeta generadora de gradiente, y además, la bomba peristáltica transportaba el contenido final hacia los soportes verticales de cristal para formar el gel desnaturizante. Se dejó polimerizar el gel durante 2 horas en posición vertical, estático a temperatura de laboratorio (25 °C). Se realizó DGGE en paralelo con un incremento lineal del gradiente de los desnaturizantes (Urea-Formamida) en dirección "top-bottom" del 35 al 65 %. Durante la duración del proceso, 16 horas, la temperatura del baño (60° C) y la intensidad de la corriente (120 V) permanecieron constantes. Para la tinción del gel de poliacrilamida de DGGE se utilizó SYBR-GOLD (producto comercial para la tinción de ácidos nucleicos) y se incubó durante 45 minutos a temperatura de laboratorio y en oscuridad. Posteriormente se lavó el gel, para lo cual se sumergió en una solución tamponada de TRIS - ácido acético - ácido etilen diamino tetracético (AEDT). El gel se visualizó por transiluminación en UV (94).

## **CAPÍTULO III:**

### **OBJETIVOS**

### III.1- OBJETIVOS

La biorrecuperación es una de las principales vías de detoxificación de espacios contaminados por hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs), y conlleva las ventajas de bajo coste y relativamente corto período de ejecución. Sin embargo, tiene también fuertes limitaciones. Una de las más importantes es la baja disponibilidad de estos contaminantes para las poblaciones microbianas degradadoras.

Los contaminantes orgánicos presentes en suelos pueden estar secuestrados de la acción microbiana debido a su fuerte adsorción a los coloides del suelo o a su presencia en fases no acuosas. Estas circunstancias, entre otros factores, pueden hacer, que se dificulte la completa biorrecuperación de suelos contaminados con HAPs. De hecho, la biodegradación en estos suelos (que normalmente contienen concentraciones de 1000 – 2000 mg/Kg totales de HAPs) a menudo ocurre con una fase inicial y rápida, después de la cual la biodegradación puede parar u ocurrir muy lentamente, alcanzándose niveles de alrededor de 50 – 100 mg/Kg de HAPs totales. Estas concentraciones pueden no ser satisfactorias para los organismos reguladores medioambientales al encontrarse por encima de los niveles máximos permitidos.

Con el fin de solucionar esta situación, se han desarrollado numerosas técnicas de bioremediación que traten de reducir la persistencia de los contaminantes en el suelo. La aplicación de agentes tensioactivos, normalmente no iónicos, al proceso de biorecuperación es una de las técnicas más atractivas desarrolladas en los últimos años. Numerosos estudios han confirmado que los tensioactivos aumentan la concentración de los HAPs en la fase acuosa por solubilización, y por tanto su biodisponibilidad frente a la degradación bacteriana. Además, la aplicación de tensioactivos biodegradables como herramienta complementaria a los procesos de biodegradación hace a esta técnica particularmente atractiva desde el punto de vista medioambiental debido principalmente a la baja toxicidad y biodegradabilidad de los tensioactivos empleados.

El trabajo desarrollado en esta tesis ha consistido en el uso de inóculos específicos de microorganismos del género *Mycobacterium* y *Sphingomonas*, bacterias del suelo especializadas en biodegradación de HAPs, y tensioactivos sintéticos no iónicos en concentraciones superiores a sus CMC para incrementar la acción descontaminadora en suelos originales con un alto contenido en arcillas y en suelos que presentan una fracción de HAPs resistentes a la biodegradación como consecuencia de tratamientos previos de biorrecuperación "clásica". También se realizó el seguimiento de éstas poblaciones bacterianas mediante técnicas muy específicas de identificación de DNA, para evaluar el impacto de la adición de tensioactivos sobre dichas poblaciones.

Los objetivos principales planteados en esta tesis han sido:

1. Determinación del contenido en HAPs de los suelos, así como de sus características físico-químicas más relevantes. Puesta a punto de un método de extracción de los HAPs de la matriz del suelo así como de su análisis por HPLC.
2. Caracterización de los tensioactivos no iónicos propuestos para su utilización en bioremediación. Determinación de la concentración crítica micelar de cada uno de los tensioactivos ensayados.
3. Estudio del efecto de los tensioactivos sobre la población microbiana, tanto en sistemas acuosos como en suspensiones de suelo en presencia de concentraciones de tensioactivos superiores a sus valores de CMC.
4. Investigar el efecto de los tensioactivos sobre la afinidad de los microorganismos hacia determinados HAPs así como sobre la velocidad de biodegradación de dichos compuestos tanto de sistemas acuosos como en suspensiones de los suelos contaminados.
5. Estudiar la cinética de desorción de los HAPs mediante la utilización de Tenax y tensioactivos. Comprobar si la baja desorción de los HAPs desde la matriz del suelo es la causa principal de su limitada biodegradación. Comparación entre la fracción de HAPs resistente a desorción y la fracción resistente a biodegradación.
6. Determinación de la fracción de HAPs potencialmente biodegradable a partir de las cinéticas de desorción con Tenax. Comparación entre la fracción de HAPs resistente a desorción y la fracción resistente a biodegradación.
7. Estudiar la influencia de los diferentes tensioactivos en la fase de biodegradación lenta así como en la velocidad de degradación de los HAPs de dicha fracción. Influencia de los tensioactivos en la reducción de la fracción de HAPs resistentes a la biodegradación. Elección del tensioactivo más favorable para su empleo en la biorremediación de los suelos estudiados.

## Objetivos

8. Seguimiento de las poblaciones microbianas de los géneros *Mycobacterium* y *Sphingomonas* mediante técnicas de análisis molecular durante el tratamiento con tensioactivos de los suelos sometidas a biorecuperación
9. Estudio de la capacidad degradadora de HAPs de la población autóctona de los suelos en ausencia y en presencia de tensioactivos.
10. Aplicación del tensioactivo seleccionado a la bioremediación de un suelo con fracción de HAPs resistente a biodegradación clásica.

## **CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

#### IV.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS TENSIOSACTIVOS ENSAYADOS: CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN CRÍTICA MICELAR (CMC).

Uno de los parámetros más importantes en la caracterización de un agente tensioactivo es el valor de su concentración crítica micelar (CMC). Esta concentración se define como aquella a partir de la cual el valor de la tensión superficial de la solución acuosa en la que se encuentra el tensioactivo permanece constante. En solución acuosa, la presencia del tensioactivo en una concentración superior a su CMC, asegura la presencia de fases micelares que incrementan la pseudo-solubilización de compuestos orgánicos apolares, tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos. La CMC de cada uno de los tensioactivos no iónicos empleados en este estudio se determinó según se describe en el capítulo de materiales y metodología, obteniéndose los resultados que aparecen en la figura IV.1. Los valores para la CMC así obtenidos, tanto en agua destilada como en el medio de cultivo MM utilizado en los ensayos de biodegradación, están recogidos en la tabla IV.1. La tabla también incluye otros parámetros relevantes, tomados de la literatura (41, 70).

**Tabla IV.1** Propiedades de los tensioactivos utilizados. \*Balance hidrofílico-hidrofóbico.

Tensioactivo	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	HLB*	Número de agregación	Densidad de sorción (mg/g)	CMC en agua (µg/ml)	CMC en MM (µg/ml)
Tritón X-100	$C_{18}H_{37}O_8$ ( $OC_2H_4$ ) <sub>9.5</sub> OH	625	13,5	140	4,9	161,7	60,6
Brij 30	$C_{12}H_{25}$ ( $OC_2H_4$ ) <sub>4</sub> OH	363	9,7	–	18,7	44,05	97,46
Brij 35	$C_{12}H_{25}$ ( $OC_2H_4$ ) <sub>23</sub> OH	1200	16,9	53	3,5	89,3	77,7

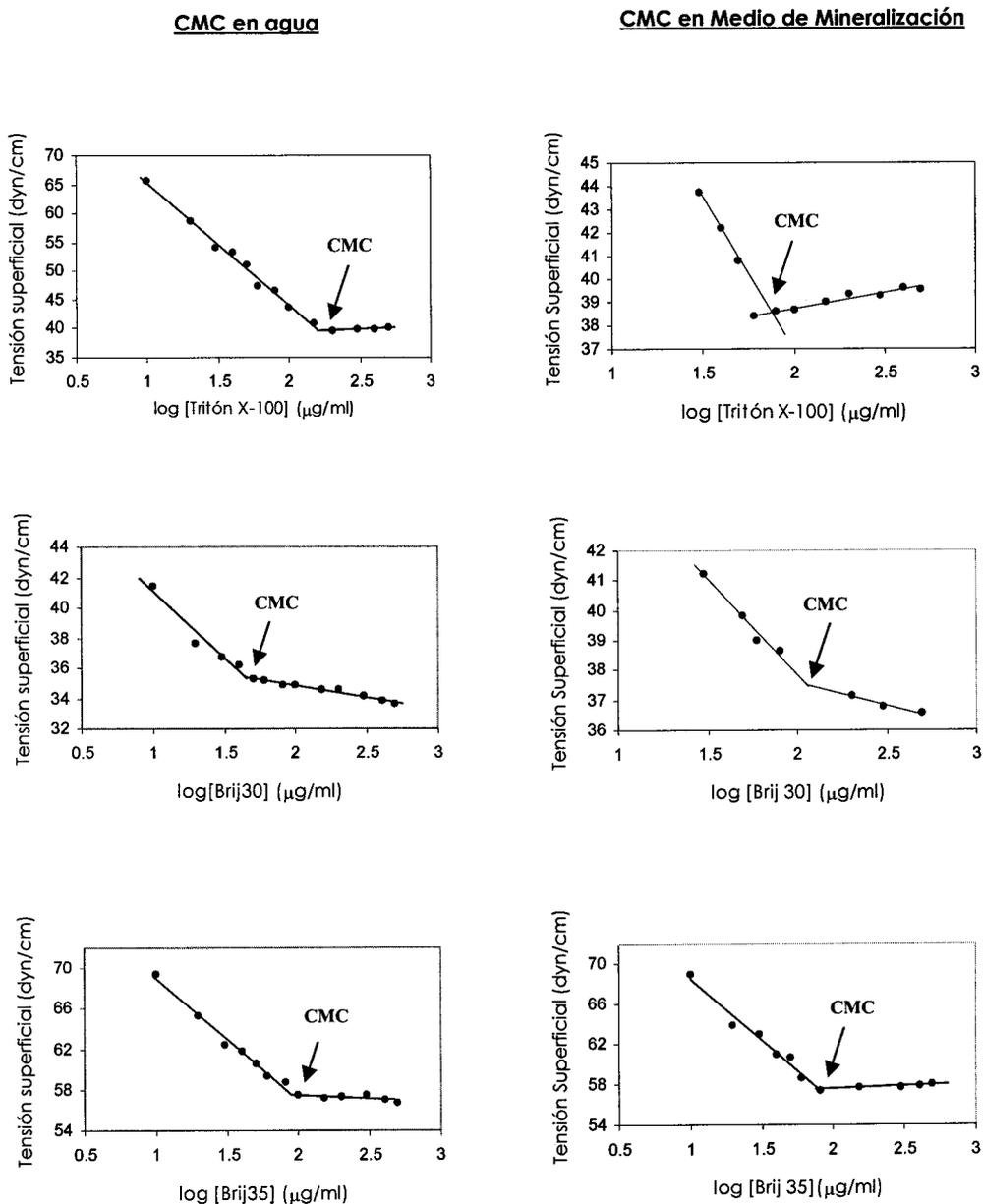
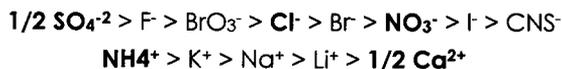


Figura IV.1 Cálculo de la CMC de cada uno de los tensioactivos empleados tanto en fase acuosa como en medio de mineralización (MM).

Se observa en la tabla IV.1 que el valor de la CMC, determinado experimentalmente, es distinto en agua destilada y en MM para los tres tensioactivos. En soluciones acuosas, la presencia de electrolitos causa una disminución en la CMC de muchos tensioactivos. En el caso de los tensioactivos iónicos, esta disminución es debida principalmente a la reducción de repulsión electrostática entre los grupos principales de las moléculas de tensioactivo al interaccionar con los iones presentes. Existe por tanto una menor contribución de estos grupos a la reducción de la energía libre del sistema. Los cambios observados en la CMC de los tensioactivos no iónicos y en los anfóteros, debido a la adición de electrolitos, no pueden ser atribuidos a las mismas causas, debido a la falta de carga electrostática en sus moléculas. La explicación más aceptada ha sido el cambio en las propiedades como solvente de la solución acuosa por la presencia de grupos hidrofóbicos en las moléculas del tensioactivo. Dependiendo de la naturaleza del electrolito presente, la solubilidad del tensioactivo puede aumentar o disminuir. Mukerjee and Ray (91, 106) han sugerido que los cambios producidos en la CMC de los tensioactivos no iónicos, por adición de electrolitos, están relacionados con la fuerza requerida para romper la estructura del solvente acuoso por inserción de moléculas del tensioactivo.

En el caso de los tensioactivos no iónicos basados en éteres etoxilatos (POE) existe un fenómeno adicional que puede ayudar a explicar el efecto de ciertos cationes en sus propiedades. Es sabido, que los éteres corona pueden formar complejos con iones de tamaño apropiado que puedan alojarse en la cavidad de la molécula. Es razonable esperar que los tensioactivos tipo POE de cadena lineal y longitud intermedia puedan adoptar configuraciones en solución de "pseudo-corona" y por tanto puedan formar complejos con los iones presentes en solución. Este fenómeno podría esperarse que ocurriera tanto con las unidades monoméricas como con las micelas, afectando a las propiedades termodinámicas del sistema, incluida la CMC.

La alteración del proceso de formación de micelas, y por tanto del valor de la CMC, podría estar relacionado con los radios de hidratación de los iones presentes. En general, cuanto menor es el radio de hidratación del ión, mayor es su efecto en la CMC. El orden de menor efectividad en disminuir la CMC dado por Ray y Nemethy (106) es el siguiente:



Los iones señalados son los que se encuentran presentes como sales en el medio de mineralización utilizado como fase acuosa en los ensayos para la determinación de la CMC de los tensioactivos Tritón X-100, Brij 30 y Brij 35. La presencia de estos iones y su influencia en las propiedades termodinámicas del proceso de formación de micelas, podría justificar el hecho de que los valores obtenidos experimentalmente para la CMC de un mismo tensioactivo en agua y en MM difieran ligeramente.

## IV.2 ESTIMACIÓN DE LA VELOCIDAD DE DEGRADACIÓN DE FENANTRENO EN CULTIVOS LÍQUIDOS EN PRESENCIA DE TENSIOSACTIVOS.

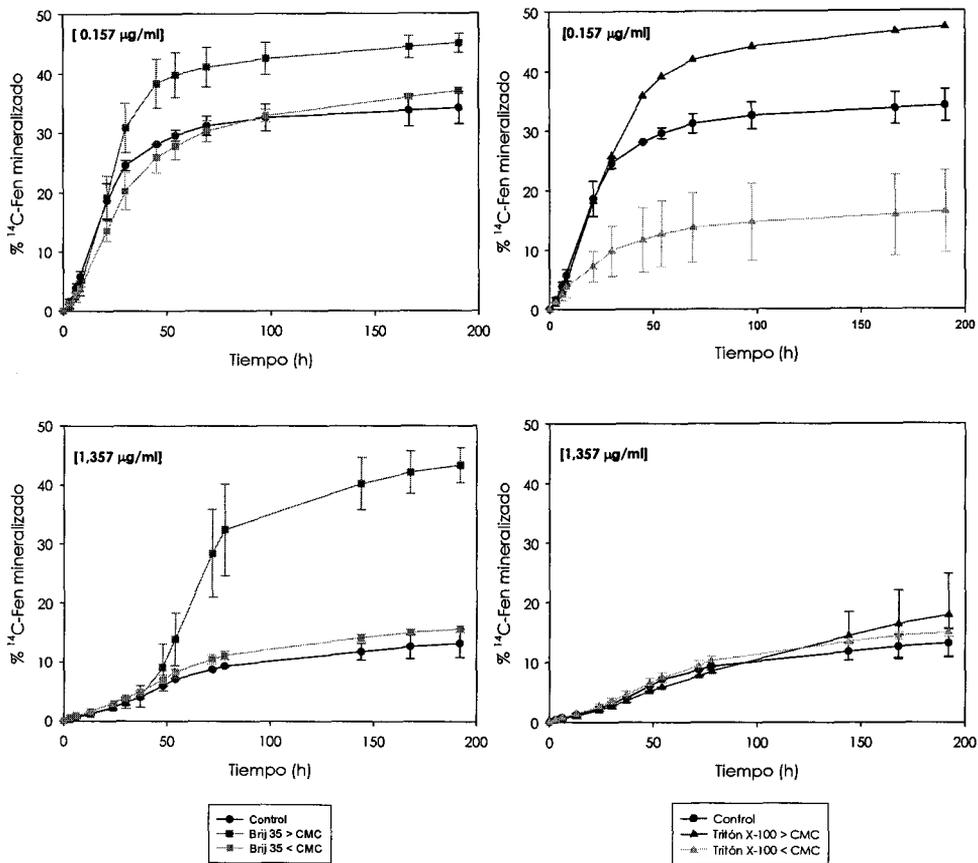
Como paso previo al estudio de la influencia de los tensioactivos en la biodegradación de HAPs se determinó la posible biodegradabilidad de éstos por las bacterias utilizadas en este estudio. Para ello, se cultivaron dichas estirpes con Tritón X-100 y Brij 35, de forma separada, como únicas fuentes de carbono (0,5 mg/ml). Tras 23 días de incubación a 30 °C y en agitación (100 rpm), las medidas de densidad óptica y de tensión superficial mostraron que no se había producido crecimiento bacteriano ni degradación significativa del tensioactivo en los sistemas en los que éste se encontraba presente (tabla IV.2). El crecimiento sí fue observado en aquellos cultivos donde fenantreno era el único sustrato. No obstante, cabe destacar que en otros estudios estos dos tensioactivos se han considerado como biodegradables (65).

**Tabla IV.2** Medidas de densidad óptica ( $D.O_{600nm}$ ) y de tensión superficial (TS, dyn/cm) en cultivos de *Mycobacterium* sp. VM 552 y *Sphingomonas* sp. LH 128 con Tritón X-100, Brij 35 y fenantreno como fuentes de carbono. TS inicial: SW+Tritón X-100 = 42,8; SW+Brij 35 = 58,7; MB+Tritón X-100 = 42,6; MB+Brij 35 = 58,1 dyn/cm.

Cultivos	2 días		14 días		23 días	
	$D.O_{600nm}$	TS	$D.O_{600nm}$	TS	$D.O_{600nm}$	TS
VM 552+SW+Tritón X-100	-0,003	41,7	-0,018	40,4	-0,014	40,5
VM 552+SW+Brij 35	0,006	58,3	-0,003	56,4	-0,012	57,1
VM 552+SW+Fen	<b>0,035</b>	--	<b>0,825</b>	--	<b>1,694</b>	--
LH 128+MB+Tritón X-100	0,000	41,7	-0,012	40,5	-0,008	40,6
LH 128+MB+Brij 35	0,004	57,6	0,002	56,3	-0,001	57,3
LH 128+MB+Fen	<b>0,006</b>	--	<b>0,015</b>	--	<b>0,048</b>	--
VM 552+SW+Tritón X-100 +Brij 35	0,003	--	--	--	-0,013	--

Se realizaron ensayos, en ausencia de suelo, con el fin de estimar si la afinidad bacteriana por el sustrato podría estar influenciada por la presencia de tensioactivos. Para ello se siguió la mineralización de  $^{14}C$ -fenantreno por *Mycobacterium* sp. VM 552 en presencia de Tritón X-100 y Brij 35. Se ensayaron dos concentraciones diferentes de fenantreno: 0,157, y 1,357  $\mu g/ml$ , esta última por encima del valor de solubilidad del compuesto en agua. Las concentraciones de tensioactivo ensayadas fueron de 0,05 y 10 mg/ml para Tritón X-100 y de 0,05 y 20 mg/ml para Brij 35, encontrándose dichas concentraciones por encima y por debajo del valor de CMC de cada uno de ellos.

## Resultados y discusión



**Figura IV.2** Mineralización de diferentes concentraciones de fenantreno en fase acuosa por *Mycobacterium* sp. VM522 ( $DO_{600nm} = 0,011$ ) en presencia de los tensioactivos Tritón X-100 y Brij 35 en concentraciones superiores e inferiores a sus respectivas CMC.

**Tabla IV.3** Tasas máximas de mineralización ( $\times 10^3 \mu\text{g ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) para fenantreno en fase acuosa por *Mycobacterium* sp. VM 552 en presencia de difentes concentraciones de Tritón X-100 y Brij 35.

[Fen] ( $\mu\text{g/ml}$ )	Control	Tritón X-100		Brij 35	
		< CMC	> CMC	< CMC	> CMC
0,157	$30,5 \pm 0,7$	$12,4 \pm 5,3$	$32,3 \pm 0,0$	$25,4 \pm 4,0$	$38,5 \pm 4,9$
1,357	$50,5 \pm 7,1$	$48,2 \pm 5,4$	$39,8 \pm 0,2$	$56,4 \pm 12,0$	$241,1 \pm 23,7$

La mineralización de fenantreno mostró un comportamiento diferente, dependiendo del tensioactivo y de la concentración de sustrato. En los tratamientos donde la concentración de fenantreno se encontraba por debajo de su solubilidad en fase acuosa (0,157  $\mu\text{g/ml}$ ) y las concentraciones de ambos tensioactivos eran superiores a sus CMC, las tasas máximas de mineralización del compuesto, no fueron superiores a la del control pero si a la de los tratamientos en los que la concentración del tensioactivo era inferior a su CMC. En cambio, los tratamientos con Brij 35 en concentración superior a su CMC y con una concentración de sustrato superior a su solubilidad (1,357  $\mu\text{g/ml}$ ) mostraron una tasa máxima de mineralización muy superior a la del resto de tratamientos (control y Brij 35 en concentración menor a su CMC). Por el contrario, la presencia de Tritón X-100 y de fenantreno, en concentración superior a su solubilidad, no afectó significativamente a la mineralización del compuesto por *Mycobacterium*. Se concluye, por tanto, que Brij 35 estimuló la biodegradación de fenantreno mediante el aumento de la solubilidad aparente del compuesto.

Aunque la presencia de micelas en el sistema podría reducir la biodisponibilidad de fenantreno, los resultados obtenidos con Brij 35 muestran que en nuestro caso, la biodisponibilidad se vió claramente aumentada. La reducción en la biodisponibilidad de HAPs ha sido sugerida anteriormente por otros autores (46, 125, 137). Guha and Jaffé (45), estudiaron que la proporción de fenantreno disponible en las micelas puede variar dependiendo del tensioactivo empleado. Además estudiaron que el aumento en la biodisponibilidad de fenantreno en el interior de la micela era función de la concentración de tensioactivo, así como del número de grupos polioxietilenos presentes en la molécula. El hecho de que Brij 35 posea mayor número de grupos polioxietilenos en su molécula que Tritón X-100, podría explicar el hecho de que fenantreno no fuera mineralizado de igual forma en presencia de dichos tensioactivos. Sin embargo, no parece que sea éste el único efecto implicado en la reducida mineralización de fenantreno en presencia de Tritón X-100, ya que a menores concentraciones de fenantreno en el sistema, la mineralización ocurrió a pesar de la presencia de micelas. Los posibles efectos tóxicos de Tritón X-100 sobre la mineralización de fenantreno por *Mycobacterium*, podrían estar causados por interacciones entre los monómeros de tensioactivos (presentes en concentraciones inferiores a la CMC), o sus micelas y la membrana bacteriana. Los tensioactivos no iónicos, con grupos fenólicos en sus moléculas, como es el caso de Tritón X-100, pueden solubilizar la bicapa lipídica de la membrana bacteriana e incluso integrarse en ella (51). Sin embargo, esta interacción no parece ser la única causante del efecto tóxico de Tritón X-100 sobre *Mycobacterium* ya que a bajas concentraciones de fenantreno, no se redujo la mineralización del sustrato. La mineralización fue reducida en presencia de Tritón X-100 cuando el fenantreno se encontraba en concentración superior a su solubilidad. Autores como Willumsen et al. (134), obtuvieron con este tensioactivo resultados similares, postulando que la inhibición en la mineralización de fenantreno por *Mycobacterium* podría deberse a una elevada concentración de sustrato pseudo-solubilizado en el medio o a la presencia de altas concentraciones de metabolitos resultantes de su degradación que podrían resultar tóxicos para la bacteria. Van der Werf et al. (128), propusieron que el efecto tóxico observado en la población bacteriana en presencia de Tritón X-100 depende en buena parte de la relación entre la concentración de tensioactivo y la densidad de bacterias

## *Resultados y discusión*

presentes en el sistema. La reducción de dicho efecto podría ser debida a (i) un efecto de la biomasa así como de los metabolitos (a mayor número de bacteria, mayor concentración de metabolitos) o (ii) a una dilución del efecto tóxico causado tanto por el tensioactivo (menos tensioactivo por bacteria) y por el sustrato y/o sus metabolitos (menos sustrato por bacteria). Una ligera reducción en la concentración de fenantreno debida a una lenta mineralización del sustrato podría ser la causa por la cual tras casi 200 horas de ensayo, la mineralización en los tratamientos con Tritón X-100 por encima de su CMC y mayor concentración de fenantreno aumentó ligeramente.

### **IV.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS SUELOS ESTUDIADOS.**

#### **IV.3.1 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS SUELOS.**

El suelo contaminado con creosota fue clasificado como un fluvisol calcárico por el grupo de evaluación de suelos dirigido por el Doctor Diego de la Rosa, perteneciente al Departamento de Sostenibilidad del sistema suelo-planta-atmósfera del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS, CSIC). Según el informe de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía (Enero de 1999) sobre " Los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado en Andalucía y la metodología y técnicas de toma de muestra y análisis para su investigación", uno de los tipos principales de suelos en la provincia de Jaén son los fluvisoles. Los fluvisoles calcáricos de esta zona se caracterizan por tener un horizonte tipo A-C, teniendo el horizonte A una buena actividad biológica y un horizonte C que suele ser limoso y masivo, de donde procede la muestra de suelo estudiada.

Geológicamente, el emplazamiento contaminado consistía en una superficie granular de un metro de espesor, un horizonte de limos y arcillas (2-3 m) y un horizonte soporte de agua formado por grava arenosa y masilla compacta. El agua subterránea fue localizada aproximadamente a 4 metros de profundidad y procedía del río Guadalquivir. Estos datos sobre el estudio geológico del suelo fueron proporcionados por la empresa de gestión de residuos industriales EMGRISA.

Los parámetros físico-químicos son mostrados en la tabla IV.4. El contenido en materia orgánica y carbono orgánico de los suelos estudiados fue determinado siguiendo el protocolo expuesto en el apartado II.3 del capítulo de materiales y metodología. Es de destacar el alto contenido en arcillas del suelo estudiado, 60 %.

El análisis de la fracción no arcillosa reveló que estaba constituida, en orden de abundancia, por calcita, cuarzo y dolomita. La fracción arcillosa estaba formada por arcillas tipo illita, esmectita (montmorillonita) y caolinita. La presencia de estas tres arcillas en el suelo B fue confirmada mediante pruebas de agregados orientados.

Los resultados obtenidos en el análisis de los suelos (tabla IV.4) confirman que el tratamiento al que había sido sometido el suelo original B para la obtención del suelo B1 con fracción resistente a biodegradación no modificó significativamente las principales propiedades físico-químicas del suelo.

**Tabla IV.4** Propiedades de los suelos B y B1.

Propiedad	Resultado	
	Suelo B	Suelo B1
<b>Distribución tamaño de partícula (%)</b>		
Arena grano grueso	1,1	3
Arena grano fino	2,4	1,8
Limo	37	37,3
Arcilla	59,5	58,0
Humedad (%)	4,9	4,3
pH	7,92	-
Materia orgánica (%)	3,32	2,66
Carbono orgánico(%)	1,93	1,54
Carbonato cálcico(%)	25,4	-
Nitrógeno orgánico (Kjeldhal) (%)	0,15	0,13
Fósforo disponible (mg/kg)	0,9	-
Potasio disponible (mg/kg)	2,9	-

El suelo E6068 de origen danés había sido previamente tratado por biorremediación por la empresa danesa SOILREM compañía dedicada a la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. El análisis de los parámetros físico-químicos correspondientes a este suelo fue cedido por la misma empresa. La composición granulométrica de dicho suelo reveló que se trataba de un suelo arcillo-arenoso (tabla IV.5).

**Tabla IV.5** Propiedades del suelo E6068.

Propiedad	Resultado
<b>Distribución tamaño de partícula (%)</b>	<b>Suelo E6068</b>
Arena grano grueso	13,40
Arena grano fino	30,43
Limo	20,58
Arcilla	28,81
Humedad (%)	1,85
pH	7,96
Materia orgánica (%)	3,64
Carbono orgánico(%)	2,11
Contenido Orgánico Total (COT) (%)	9,64
Nitrógeno total (mg/kg)	1450

### IV.3.2 ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN HAPs EN LOS SUELOS ESTUDIADOS.

Tras la extracción de los HAPs siguiendo el protocolo explicado en el apartado III del capítulo de materiales y metodología, se procedió al análisis de los hidrocarburos presentes en el suelo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, High Performance Liquid Chromatography). El análisis se realizó bajo las condiciones cromatográficas expuestas en el apartado IV del mismo capítulo citado anteriormente. Las concentraciones de los 16 HAPs obtenidas para el suelo B se muestran en la tabla IV.6.

Según los criterios para la consideración de un suelo contaminado, expuestos en el anejo III del proyecto de Real Decreto por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados con fecha de 1 de Marzo de 2004, se considerará un suelo como contaminado cuando, por razones de protección de la salud humana se verifique, al menos, entre otras condiciones, que la concentración en el suelo de alguna de las sustancias recogidas en el anejo V excede 100 o más veces los niveles genéricos de referencia establecidos en el mismo para la protección de la salud humana, de acuerdo con su uso. De acuerdo con los niveles genéricos de referencia expuestos por dicho proyecto de Real Decreto, el suelo objeto de estudio podría ser considerado como un suelo contaminado solamente en el caso de que su uso fuera diferente a un uso industrial o urbano, ya que solo en dicho caso, la concentración de algunos de los HAPs del suelo (benzo(a)pireno, fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, dibenzo(a, h)antraceno e indeno (1, 2, 3-cd)pireno) excede en 100 o más veces los niveles genéricos de referencia establecidos por dicho proyecto para la protección de la salud humana.

Debido a que los ensayos de mineralización y biodegradación llevados a cabo se realizaron con muestras estériles (suelo autoclavado 3 veces), se analizó también el contenido en hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de suelo autoclavadas. El resultado del análisis se muestra en la tabla III.4, así como el porcentaje de pérdidas producidas por dicho tratamiento. Las concentraciones obtenidas para cada uno de los 16 HAPs presentes en el suelo contaminado, después de ser autoclavado tres veces fueron utilizadas como valores iniciales para los experimentos de mineralización y biodegradación llevados a cabo en el desarrollo de esta tesis. De los 16 HAPs presentes en el suelo, el fenantreno es el que se encuentra en mayor concentración. Este hecho será una de las razones por las que la concentración de este compuesto será utilizada como valor de referencia para comprobar en que extensión ha ocurrido la biodegradación de los HAPs presentes en el suelo en los diferentes ensayos realizados. Las pérdidas observadas para algunos de los HAPs (naftaleno, acenafeno y acenafileno) tras el autoclavado del suelo podrían ser debidas principalmente a procesos de volatilización, ya que estos compuestos poseen valores de presión de vapor elevados. Debido a las condiciones alcanzadas en el interior del autoclave (121 °C y 1 atmosfera de presión) es probable que el proceso de volatilización de dichos HAPs se produzca en mayor proporción y que por tanto, la concentración en la que queden presentes en el suelo se encuentre fuera del límite de detección del HPLC (apartado II.5).

**Tabla IV.6** Contenido en HAPs (mg/kg peso seco) de los suelos B original y tras tratamiento en autoclave y del B1. <sup>a</sup>Desviación estándar de muestras por duplicado. <sup>b</sup>Desviación estándar de muestras por cuadruplicado. <sup>c</sup>No detectados. LD (mg/kg suelo seco): Naf: 5,95; Ace: 5,98; Acei: 1,98; Dba: 5,32; Bper: 6,49 y InP: 6,31.

HAPs	Suelo B sin autoclavar		Suelo B autoclavado			Suelo B1	
	[HAPs]	DE <sup>a</sup>	[HAPs]	DE <sup>a</sup>	Diferencia (%)	[HAPs]	DE <sup>b</sup>
Naftaleno	57,02	12,69	n.d. <sup>c</sup>	-	-	n.d. <sup>c</sup>	-
Acenaffileno	21,00	0,00	n.d. <sup>c</sup>	-	-	n.d. <sup>c</sup>	-
Acenaffeno	793,34	8,78	n.d. <sup>c</sup>	-	-	n.d. <sup>c</sup>	-
Fluoreno	306,33	5,65	219,77	7,64	- 28,25	36,34	1,23
Fenantreno	1329,49	52,72	1230,67	13,69	- 7,43	165,35	14,22
Antraceno	286,31	9,10	223,13	4,49	- 22,07	191,57	8,55
Fluoranteno	881,50	3,42	866,57	30,00	- 1,69	800,05	42,28
Pireno	395,22	15,03	391,63	35,49	- 0,90	367,11	13,24
Benzo(a)antraceno	127,49	3,66	136,01	3,76	+ 6,68	126,69	5,08
Criseno	143,14	3,70	102,45	3,57	- 28,4	120,80	18,99
Benzo(b)fluoranteno	76,07	3,12	55,58	1,47	- 26,93	59,50	3,65
Benzo(k)fluoranteno	30,52	2,20	31,05	1,43	+ 1,77	32,37	0,90
Benzo(a)pireno	30,71	4,40	21,99	1,31	- 28,39	27,74	1,35
Dibenzo(ah)antraceno	21,33	1,73	n.d. <sup>c</sup>	-	-	n.d. <sup>c</sup>	-
Benzo(ghi)perileno	33,57	4,80	n.d. <sup>c</sup>	-	-	n.d. <sup>c</sup>	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno	11,12	0,66	13,40	1,18	+ 16,12	n.d. <sup>c</sup>	-
<b>TOTAL</b>	<b>4540,80</b>	-	<b>3292,25</b>	-	<b>- 27,03</b>	<b>1927,52</b>	-

En el caso del dibenzo(ah)antraceno y del benzo(ghi)perileno, a pesar de poseer muy baja presión de vapor, la pérdida por volatilización pudo darse por las condiciones extremas presentes en el interior del autoclave. Además, la baja concentración en la que se encuentran estos HAPs en el suelo original, pudo ser otra de las causas por las que no se detectaron en los análisis por HPLC cuando el suelo se sometió a esterilización en autoclave. Es posible que el autoclavado afecte a otros componentes de la materia orgánica del suelo, que podrían haber enmascarado a estos HAPs en el análisis por cromatografía a estos bajos niveles.

Los suelos pretratados B1 y E6068, al igual que las muestras de suelo originales, fueron sometidas a extracción Soxhlet, purificación y análisis por HPLC para determinar su contenido total en HAPs (en el caso de estos dos suelos, fracción resistente a biodegradación). Los resultados obtenidos fueron los que se muestran en las tablas IV.4 y IV.5. El efecto del autoclavado no se estudió en estas muestras porque los ensayos realizados con ellas no se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad. Comparando los resultados obtenidos para la muestra de suelo B1 con los obtenidos en el análisis del suelo original B autoclavado (tabla IV.6), cabe destacar la clara reducción en las concentraciones de fluoreno, fenantreno y antraceno. Como se explicó en el apartado II del capítulo de materiales y metodología, el suelo B1 se obtuvo a partir de la muestra de suelo original B tras ser éste inoculado con la estirpe LH 128 WT. Esta bacteria, aislada de un suelo contaminado con gasoil, es capaz de crecer en fenantreno (utilizándolo como fuente de carbono) y además, es capaz de cometabolizar antraceno, diobenzotiofeno y fluoreno (86, 88), siendo ésta la razón por la cual las concentraciones de estos tres HAPs se vieron reducidas.

**Tabla IV.7** Contenido en HAPs (mg/kg peso seco) del suelo E6068. <sup>a</sup> Desviación estándar de muestras por cuatriplicado. <sup>b</sup> No detectados. LD (mg/kg peso seco): Naf: 3,12; Acei: 2,55 y Ace: 1,04.

HAPs	[HAPs]	DE <sup>a</sup>
Naftaleno	n.d. <sup>b</sup>	-
Acenafileno	n.d. <sup>b</sup>	-
Acenafeno	n.d. <sup>b</sup>	-
Fluoreno	4,53	0,68
Fenantreno	42,29	5,58
Antraceno	15,39	1,53
Fluoranteno	54,80	4,32
Pireno	48,29	6,55
Benzo(a)antraceno	21,04	0,59
Criseño	14,54	1,07
Benzo(b)fluoranteno	23,19	1,85
Benzo(k)fluoranteno	8,24	0,43
Benzo(a)pireno	22,43	0,13
Dibenzo(ah)antraceno	n.d. <sup>b</sup>	-
Benzo(ghi)perileno	10,05	0,45
Indeno(1,2,3-cd)pireno	10,15	0,98
<b>TOTAL</b>	<b>274,94</b>	-

### **IV.3.3 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE HAPs DE SUELOS EN PRESENCIA DE TENSOACTIVOS.**

Como ya se comentó en el capítulo de materiales y metodología, en el apartado III.4 dedicado a la extracción de los HAPs presentes en el suelo, aquellas muestras que habían estado en contacto con altas concentraciones de los tensioactivos Tritón X-100 y Brij 35, serían sometida a un proceso de extracción diferente. La puesta a punto de dicho método de extracción presentó las recuperaciones que se muestran en la tabla III.6 para cada uno de los HAPs analizados.

Como puede observarse en dicha tabla, algunos de los HAPs presentes en el suelo no fueron detectados en las muestras que habían estado en contacto con el tensioactivo. La razón fué el solapamiento de sus picos cromatográficos con el frente generado en el cromatograma debido a la presencia del tensioactivo. En el caso del tensioactivo Brij 35 este solapamiento fue menos pronunciado.

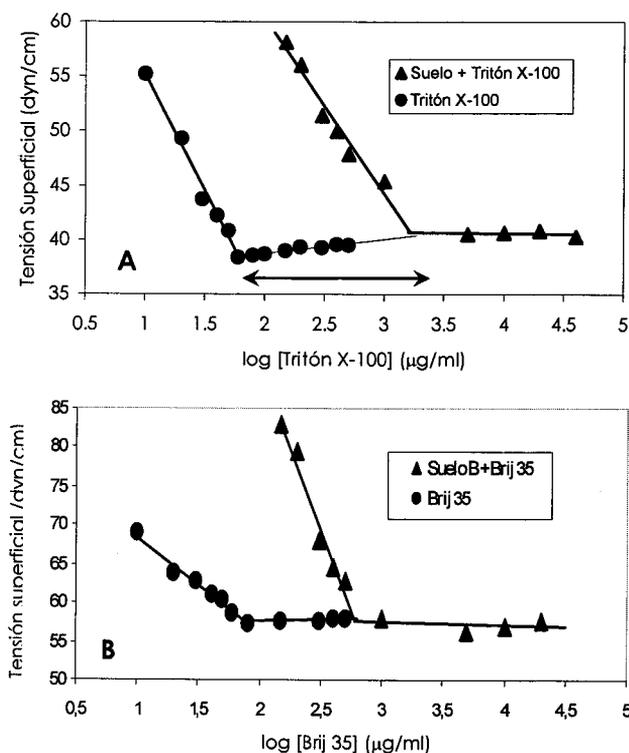
A pesar de observarse una ligera tendencia a la sobresaturación de la concentración original de los HAPs en el suelo, en todos los casos se observaron recuperaciones superiores al 85%, tanto en el caso del tensioactivo Tritón X-100 como del Brij 35. Esto demuestra que el método de extracción llevado a cabo con las muestras de suelo en presencia de altas concentraciones de dichos tensioactivos resultó efectivo.

**Tabla IV.8** Recuperación de HAPs extraídos (mg/kg peso seco) de suspensiones con gran concentración de tensioactivo. <sup>a</sup> Balance de masas resultante de la suma de la concentración de HAPs analizados en la fase acuosa más la concentración de HAPs presentes en el suelo. Concentración de tensioactivo ensayada (40 mg/ml). Desviaciones obtenidas del análisis por HPLC de muestras por duplicado. <sup>b</sup> no detectados. LD (mg/kg peso seco): Naf: 3,05; Acei: 2,5; Ace: 1,02; Flu: 2,82; BbF: 3,10; BkF: 2,78; DbA: 2,73; Bper: 3,33; InP: 3,24.

HAPs	SIN t ensioactivo	TRITON X_100		BRIJ 35	
		[HAPs] <sup>a</sup>	% HAPs recuperados	[HAPs] <sup>a</sup>	% HAPs Recuperados
Naftaleno	57,02 ± 12,69	n.d. <sup>b</sup>	-	n.d. <sup>b</sup>	
Acenaftileno	21,00 ± 0,00	n.d. <sup>b</sup>	-	n.d. <sup>b</sup>	
Acenafteno	793,34 ± 8,78	n.d. <sup>b</sup>	-	n.d. <sup>b</sup>	
Fluoreno	306,33 ± 15,65	n.d. <sup>b</sup>	-	304,65 ± 9,05	99,45
Fenantreno	1315,84 ± 98,38	1643,08 ± 65,05	124,87	1630,79 ± 22,18	123,94
Antraceno	286,31 ± 9,10	269,12 ± 7,41	94,00	281,69 ± 9,18	98,38
Fluoranteno	881,50 ± 3,42	977,15 ± 51,44	110,85	1145,68 ± 290,65	129,97
Pireno	395,22 ± 15,03	470,70 ± 5,14	119,10	580,84 ± 145,24	120,98
Benzo(a)antraceno	127,49 ± 3,66	173,53 ± 0,92	136,11	175,12 ± 4,82	137,36
Criseno	143,14 ± 3,70	131,78 ± 1,33	92,07	129,62 ± 1,29	90,56
Benzo(b)fluoranteno	76,07 ± 3,12	n.d. <sup>b</sup>	-	67,51 ± 0,47	88,74
Benzo(k)fluoranteno	30,52 ± 2,20	n.d. <sup>b</sup>	-	46,67 ± 1,31	152,90
Benzo(a)pireno	27,68 ± 2,80	34,20 ± 1,74	123,54	31,39 ± 1,02	113,42
Dibenzo(ah)antraceno	22,55 ± 0,00	n.d. <sup>b</sup>	-	n.d. <sup>b</sup>	-
Benzo(ghi)perileno	4,87 ± 0,00	n.d. <sup>b</sup>	-	n.d. <sup>b</sup>	-
Indeno(1,2,3-cd)pireno	11,54 ± 0,00	n.d. <sup>b</sup>	-	n.d. <sup>b</sup>	-

### IV.3.4 CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE TENSOACTIVOS POR EL SUELO.

La adsorción de tensioactivos al suelo puede provocar una disminución en la concentración de micelas presentes en la fase acuosa. Este hecho puede repercutir en una menor solubilidad aparente y una menor desorción desde la matriz del suelo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (24, 126). El efecto de la adsorción del tensioactivo al suelo fue cuantificado gráficamente mediante curvas que representan la tensión superficial de soluciones acuosas de tensioactivo puro y de sistemas de suelo-tensioactivo frente al logaritmo de las concentraciones de tensioactivo empleadas (figura IV.3).



**Figura IV.3** Efecto de la adsorción de los tensioactivos Tritón X-100 (A) y Brij 35 (B) al suelo B.

Los puntos de inflexión de las curvas representan las concentraciones críticas micelares (CMC) en cada sistema, en el cual la fase acuosa está saturada de unidades monoméricas del tensioactivo. La CMC teórica de Tritón X-100 en medio de mineralización (CMC<sub>tens</sub>) obtenida en este ensayo fue de 60.6 µg/ml, y para el sistema suelo-tensioactivo, la CMC<sub>suelo</sub> (concentración crítica micelar del tensioactivo en la suspensión de suelo), aumentó hasta 1122.3 µg/ml. Según Chu and Chan (19); asumiendo que ambos sistemas tienen la misma cantidad de

monómeros de tensioactivo, una vez que se ha alcanzado la CMC, la diferencia entre  $CMC_{tens}$  y  $CMC_{suelo}$  indica que el 94.06 % (1055.7  $\mu\text{g/ml}$  por balance de masas) del tensioactivo añadido se ha adsorbido al suelo. Según los resultados obtenidos en este ensayo se asume que solamente estará la forma micelar presente en el sistema suelo-tensioactivo cuando la concentración del tensioactivo Tritón X-100 añadido al sistema sea superior a 1122.3  $\mu\text{g/ml}$ , y que 1055.7  $\mu\text{g/ml}$  será la concentración de tensioactivo Tritón X-100 a partir de la cual el suelo se encontrará saturado (figura IV.3.A).

Pueden hacerse las mismas consideraciones en el caso del tensioactivo Brij 35. La CMC teórica del Brij 35 en medio de mineralización ( $CMC_{tens}$ ) obtenida en este ensayo fue de 77.7  $\mu\text{g/ml}$ , y para el sistema suelo-tensioactivo, la  $CMC_{suelo}$  aumentó hasta 817.6  $\mu\text{g/ml}$ . Igual que ocurría para el caso de Tritón X-100, asumiendo que ambos sistemas tienen la misma cantidad de monómeros de tensioactivo, la diferencia entre  $CMC_{tens}$  y  $CMC_{suelo}$  indica que el 90.5 % (740  $\mu\text{g/ml}$  por balance de masas) del tensioactivo añadido fue adsorbido al suelo. De nuevo se deduce que solamente estará la forma micelar presente en el sistema suelo-tensioactivo cuando la concentración del tensioactivo Brij 35 añadido al sistema sea superior a 817.6  $\mu\text{g/ml}$ , y que 740  $\mu\text{g/ml}$  será la concentración de tensioactivo Brij 35 a partir de la cual el suelo se encontrará saturado (figura IV.3.B).

#### IV.4 DESORCIÓN DE HAP PRESENTES EN SUELOS CONTAMINADOS.

En este apartado se mostrarán los resultados obtenidos en el estudio de la desorción de los HAPs en muestras de los suelos B, B1 y E6068. Para ello se estudió la cinética de desorción mediante Tenax de los compuestos así como en presencia de tensioactivos proponiéndose un modelo de desorción micelar de los HAPs desde la matriz del suelo.

##### IV.4.1 CINÉTICA DE DESORCIÓN DE HAPs CON TENAX.

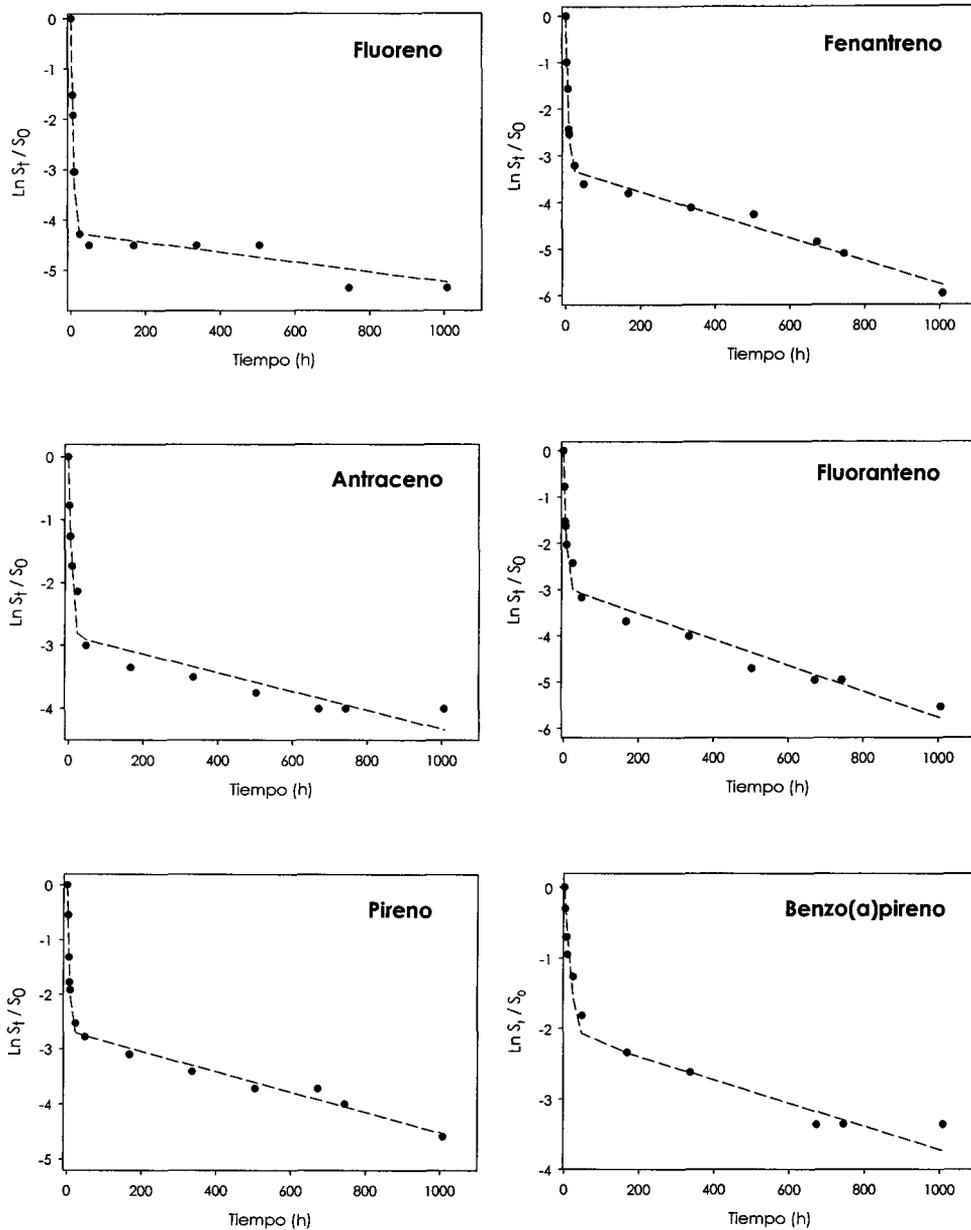
En el estudio de la desorción de HAPs llevado a cabo con el suelo B se obtuvieron los resultados mostrados en la figura IV.4. En ella pueden observarse las curvas obtenidas para cada uno de los HAPs estudiados. Las líneas discontinuas se obtuvieron al ajustar los datos experimentales al modelo teórico de desorción bifásico:

$$S_t / S_o = F_{rápida} \exp (-k_{rápida} \cdot t) + F_{lenta} \exp (-k_{lenta} \cdot t)$$

Siendo  $S_t$  y  $S_o$  las concentraciones de HAP a tiempo  $t$  e inicial respectivamente. El ajuste a dicho modelo se realizó considerando el valor de  $S_o$  como la suma de la concentración total desorbida (mg/kg de suelo seco) para cada HAP más la concentración presente en el suelo al final del ensayo. Los valores de las fracciones de desorción rápida y lenta ( $F_{ráp}$  y  $F_{len}$ ; %), así como los valores de las constantes de desorción de cada una de las fases ( $k_{ráp}$  y  $k_{len}$ ;  $h^{-1}$ ) fueron determinadas por mínimos cuadrados de las fracciones residuales acumulativas entre los valores experimentales y los calculados para  $\ln (S_t/S_o)$  por la ecuación mostrada anteriormente. Las constantes  $K_{ráp}$  y  $K_{len}$ ,  $F_{ráp}$ , así como la fracción resistente a la desorción con tenax para fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, críseno, y benzo(a)pireno, son las mostradas en la tabla IV.9 La magnitud de la constante  $F_{ráp}$  proporciona información sobre la cantidad de contaminante que se encuentra biodisponible en fase acuosa debido a su rápida desorción desde la matriz del suelo (23).

El proceso de desorción observado para los HAPs del suelo B ocurrió, como puede verse en la figura IV.4 para 6 de los HAPs, en dos fases: una primera fase dominada por una desorción muy rápida, de aproximadamente 24 horas, seguida de una segunda fase de desorción más lenta que se prolongó hasta el final del ensayo (42 días, 1008 horas).

Resultados y discusión



**Figura IV.4** Cinéticas de desorción de distintos HAPs del suelo B con Tenax (42 días). Las líneas discontinuas representan el ajuste de los datos experimentales al modelo bifásico de desorción.

**Tabla IV.9** Tamaño de la fracción de desorción rápida ( $F_{ráp}$ ), constantes cinéticas de desorción y concentraciones residuales de HAPs en el suelo B, obtenidas mediante extracción con Tenax durante 42 días. **a**; desviación estándar de muestras por duplicado. **b**; desviación estándar menor al 0,1%. **n.d.**: no detectado. **c**; LD: Flu: 3,47 mg/kg peso seco.

HAPs	$F_{ráp}$ (%)	DE <sup>a</sup>	$K_{ráp}$ (h <sup>-1</sup> )	DE <sup>a</sup>	$K_{len}$ (x 10 <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup> )	DE <sup>a</sup>	Concentración residual (mg/kg peso)	DE <sup>a</sup> :	Recuperación (%)
Fluoreno	98,7	3,0	0,43	0,00 <sup>b</sup>	0,98	0,00 <sup>b</sup>	n.d. <sup>c</sup>	--	65,3
Fenantreno	96,1	0,1	0,38	0,00 <sup>b</sup>	2,70	0,03	3,10	0,62	98,2
Antraceno	94,6	0,6	0,26	0,04	2,69	1,70	2,86	1,68	92,9
Fluoranteno	95,6	1,1	0,30	0,02	2,40	0,58	4,80	1,07	69,3
Pireno	92,3	1,1	0,26	0,03	2,20	0,50	4,50	0,48	101,5
Benzo(a)antraceno	95,9	0,6	0,14	0,03	1,56	0,48	1,94	0,78	103,8
Críseno	66,2	1,0	0,15	0,00 <sup>b</sup>	0,14	0,05	2,38	1,17	81,6
Benzo(a)pireno	86,7	0,9	0,11	0,03	1,80	0,20	0,77	0,13	76,0

Los valores obtenidos para  $F_{r\acute{a}p}$  fueron superiores al 90 % para los HAPs más solubles en agua y de menor complejidad molecular como son fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno. Serán los HAPs con mayor  $F_{r\acute{a}p}$  los que se encuentren en mayor proporción en la fase acuosa como consecuencia de su desorción y por tanto se encontrarán más biodisponibles que aquellos otros que presentan valores más pequeños, como ocurre con criseno y benzo(a)pireno. No se han encontrado valores de  $F_{r\acute{a}p}$  similares en la bibliografía, posiblemente debido a que la fracción de desorción rápida puede variar significativamente, entre otros factores, con el tiempo de permanencia de los contaminantes en el suelo (24), así como con el contenido en materia orgánica de éste. De forma inversa, la fracción de desorción lenta ( $F_{l\acute{e}n}$ ), aumentó con el incremento de hidrofobicidad en la molécula de hidrocarburo, así por ejemplo, dicha fracción fue mayor en el caso de criseno que de fenantreno. Este hecho también fue observado por otros autores (25) (66). Cornelissen et al. (25), observaron dicho efecto en el estudio de las cinéticas de desorción con Tenax de sedimentos contaminados con HAPs, comprobando que la relación entre  $\log (F_{l\acute{e}n}/F_{r\acute{a}p})$  y  $\log K_{oc}^{app}$  era lineal ( $r^2 = 0.96$ ); siendo  $K_{oc}^{app}$  la constante de distribución del compuesto entre el sedimento y la fase acuosa. Asumiendo que tras un cierto tiempo de contacto entre el contaminante y el sedimento se ha producido un grado de equilibrio entre las fases rápida y lenta, la relación citada anteriormente refleja que una menor polaridad de la molécula afecta en mayor grado a la fase de desorción lenta que a la rápida. Esto está de acuerdo con la propuesta de dicho autor, quien asume que la parte exterior de las partículas de sedimento actúa como una fase de cambio rápido, de forma que la materia orgánica presente en la interfase sedimento-agua es probablemente más polar que la materia orgánica que no está en contacto directo con el agua. Así pues, el interior de la materia orgánica puede ser considerada como la parte de menor polaridad siendo la pared que se encuentre en lo más profundo de los poros del sedimento la parte más hidrofóbica. Por tanto, si la desorción lenta de los compuestos orgánicos en el suelo puede ser explicada mediante algún proceso de difusión, la constante  $K_{l\acute{e}n}$  podría depender del tamaño de las moléculas ya que cuanto mayor sea el soluto a difundir más lentamente será capaz de atravesar la matriz orgánica o los poros estrechos. Los estudios de Cornelissen et al. (25) y Pignatello et al. (100, 101), confirman que la constante  $K_{l\acute{e}n}$  muestra una correlación lineal con el volumen molecular del contaminante.

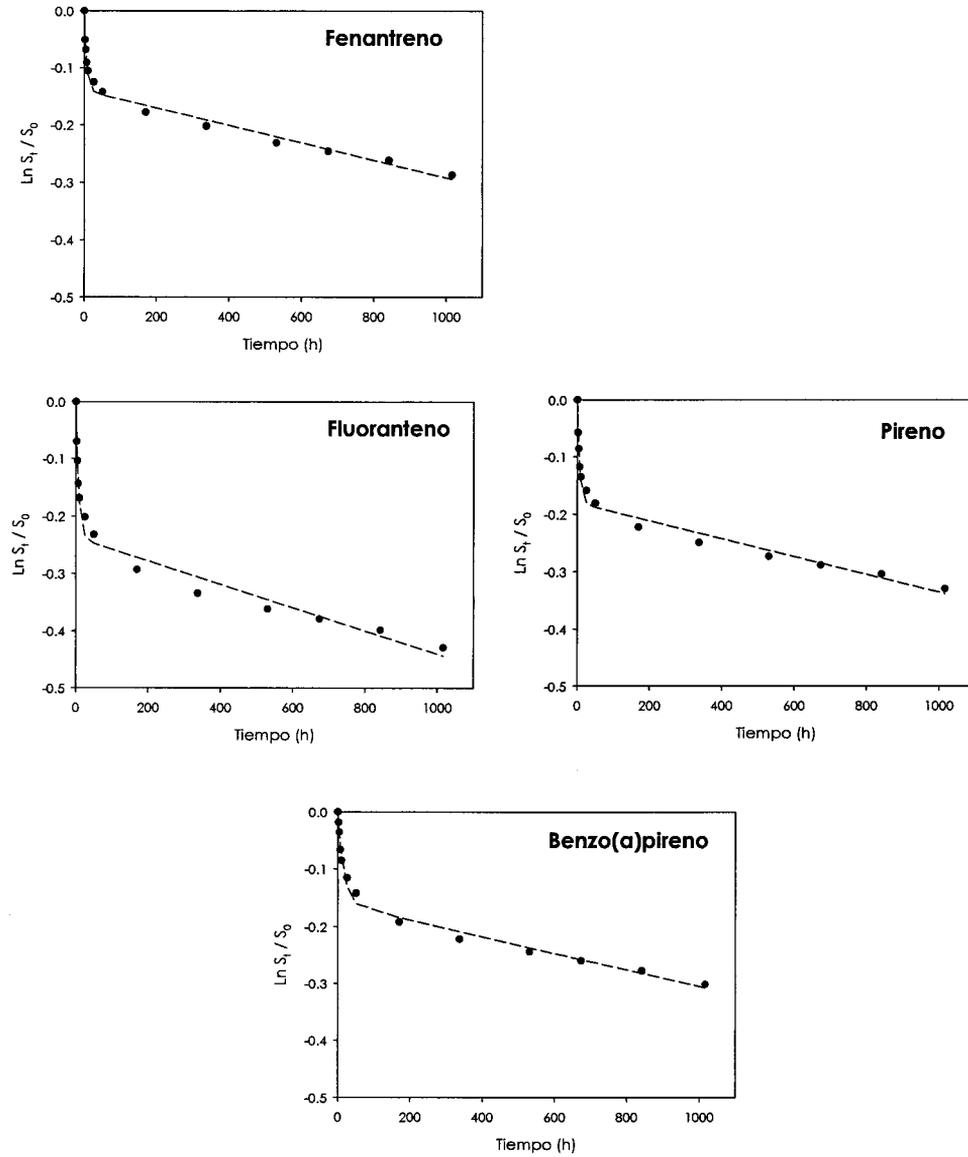
Los valores obtenidos para  $K_{r\acute{a}p}$  estuvieron dentro del intervalo  $0,11 - 0,43 \text{ h}^{-1}$  siendo dichos valores del orden de 60 y 1000 veces mayores que los valores obtenidos para  $K_{l\acute{e}n}$ . Esta diferenciación es necesaria para la validación de la ecuación del modelo bifásico así como para realizar comparaciones entre las fracciones de degradación rápidas y las fracciones degradadas. Los valores de  $K_{l\acute{e}n}$  obtenidos en este estudio para fluoranteno y pireno están en concordancia con los resultados obtenidos por Cornelissen et al. para estos mismos compuestos tras 34 días de extracción Tenax.

Las fracciones residuales presentes en el suelo tras la desorción con Tenax para el suelo B se muestran en la tabla IV.9. Dichos valores representan las concentraciones de HAPs que permanecen en el suelo tras las sucesivas extracciones a las que fue sometido dicho suelo. No se observaron diferencias significativas entre las fracciones resistentes de los HAPs más ligeros y las obtenidas para los más pesados,

siendo además en todos los casos del mismo orden de magnitud. Esta circunstancia podría ser debida al prolongado tiempo de extracción así como a las sucesivas renovaciones de Tenax. Puesto que los ensayos de desorción con Tenax ayudan a predecir la fracción de HAPs biodisponible (14), cabe esperar que las fracciones de dichos compuestos resistentes a la degradación bacteriana sean del mismo orden de magnitud que las obtenidas como fracción resistente a la desorción.

En el caso del suelo E6068, el estudio de la cinética de desorción de los HAPs se realizó de forma similar a la del suelo B. Los resultados obtenidos para cinco de los HAPs presentes en este suelo tras 1016 horas de extracción son los mostrados en la figura IV.5. El proceso de desorción observado para los HAPs del suelo E6068 ocurrió en dos fases: una primera fase de desorción rápida, de aproximadamente 26 horas, seguida de una segunda fase de desorción más lenta que se prolongó hasta el final del ensayo (1016 horas). Los valores obtenidos para  $F_{ráp}$  fueron para los cinco HAP estudiados del mismo orden de magnitud y bastante inferiores a los valores de  $F_{len}$  (tabla IV.10). En dicha tabla puede observarse como la fracción de desorción lenta ( $F_{len}$ ) es superior al 80 % para cada uno de los HAPs. Estos resultados sugieren que la presencia en el suelo de una fracción de desorción lenta de dicha magnitud podría indicar una limitada biodisponibilidad de los HAPs y por tanto una reducida biodegradación de los mismos. Esta limitada biodisponibilidad podría ser la causa de la presencia de una fracción de HAPs resistente a la biodegradación. Se han encontrado en la bibliografía valores de  $F_{ráp}$  del mismo orden de magnitud para sedimentos sometidos a extracción Tenax tras un proceso de bioremediación mediante landfarming ( $12,0 \pm 0,8$  % para pireno y  $11 \pm 2$  para benzo(a)pireno) (23).

Resultados y discusión



**Figura IV.5** Cinéticas de desorción de HAPs del suelo E6068 con Tenax (42 días). Las líneas discontinuas representan el ajuste de los datos experimentales al modelo bifásico de desorción.

**Tabla IV.10** Tamaño de la fracción de desorción rápida ( $F_{ráp}$ ), constantes cinéticas de desorción y concentraciones residuales de HAPs en el suelo E6068, obtenidas mediante extracción con Tenax durante 42 días. **a**; desviación estándar de muestras por duplicado. **b**; desviación estándar menor al 0,1%.

HAPs	$F_{ráp}$ (%)	DE <sup>a</sup>	$K_{ráp}$ (h <sup>-1</sup> )	DE <sup>a</sup>	$k_{len}$ (x 10 <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup> )	DE <sup>a</sup>	Concentración residual (mg/kg peso)	DE <sup>a</sup> :
Fenantreno	12,0	1,6	0,16	0,00 <sup>b</sup>	0,16	0,01		
Antraceno								
Fluoranteno	18,3	4,0	0,14	0,00 <sup>b</sup>	0,19	0,01		
Pireno	15,1	1,9	0,15	0,01	0,15	0,00 <sup>b</sup>		
Benzo(a)pireno	13,7	1,4	0,06	0,00 <sup>b</sup>	0,13	0,01		

#### IV.4.2 FRACCIÓN DE DESORCIÓN RÁPIDA DE HAPs EN SUELOS CONTAMINADOS COMO PREDICCIÓN DE LA EXTENSIÓN DE LA BIORREMEDIACIÓN.

La biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos adsorbidos a suelos y sedimentos puede ser determinada, como se ha comentado anteriormente, mediante el estudio de la cinética de desorción de dichos compuestos utilizando Tenax. El estudio sobre la desorción de los HAPs del suelo B llevado a cabo en el apartado anterior muestra el comportamiento de dichos compuestos tras un largo período de extracción con Tenax. Un contacto prolongado entre suelo y Tenax puede provocar que una parte significativa de la fracción de desorción lenta del compuesto sea desorbida junto con la fracción rápida. Para determinar qué parte de dicha fracción extraída a lo largo del tiempo es únicamente fracción rápida Cornelissen et al. (24), proponen una única extracción con tenax a 6 horas considerando este tiempo suficiente para la extracción de la mayor parte de la fracción de desorción rápida del compuesto. La relación entre dichas fracciones puede ser determinada mediante el cociente  $F_{ráp}/F_{6h}$  donde  $F_{ráp}$  es la fracción de desorción rápida determinada tras 42 días de extracción, obtenida en el apartado anterior para el suelo B, y  $F_{6h}$  la fracción de desorción rápida obtenida en una única extracción Tenax a 6 horas.

Los valores obtenidos para este cociente, en el caso del suelo B, son mostrados en la tabla IV.11. Mediante dicha relación, y conociendo la concentración de cada HAPs desorbida a las 6h, puede calcularse que cantidad de compuesto es desorbida en la fase rápida. Si en el suelo no existen limitaciones microbiológicas para la degradación del compuesto, la magnitud de  $F_{ráp}$  proporciona información sobre la extensión en la que debería producirse la biodegradación de los HAPs. Los valores obtenidos para los hidrocarburos estudiados fueron en todos los casos mayores que la unidad, alcanzándose los valores más altos para los HAPs más pesados. El hecho de que este cociente sea mayor que uno significa que la fracción de contaminante desorbida en 6 horas ( $F_{6h}$ ) y determinada experimentalmente es una fracción de  $F_{ráp}$ , es decir, la relación  $F_{ráp}/F_{6h} = 1,25$  obtenida en el caso de fenantreno en el suelo B significa que la fracción de desorción rápida es 1,25 veces la fracción extraída a las 6 horas. Cuanto mayor es el cociente  $F_{ráp}/F_{6h}$  menor es la fracción de HAPs desorbida a las 6h, indicando así que dichos compuestos son desorbidos más lentamente hacia la fase acuosa y que por tanto su biodisponibilidad será menor (2,05 para benzo(a)antraceno y 4,00 para benzo(a)pireno, en el suelo B). Se ha observado que  $F_{ráp}$  es aproximadamente dos veces  $F_{6h}$  con una desviación de  $\pm 2$ . Esta relación obtenida a partir de los datos experimentales así como los valores del cociente  $F_{ráp}/F_{6h}$  son similares a los encontrados en la bibliografía para HAPs presentes en suelos y sedimentos contaminados con este tipo de compuestos (fluoranteno:  $1,39 \pm 0,17$ ; benzo(a)antraceno:  $2,47 \pm 0,85$ ; criseno:  $1,69 \pm 0,46$  y benzo(a)pireno:  $4,82 \pm 1,31$ ) (24).

Para el cálculo de la fracción de HAPs potencialmente biodisponibles ( $F_{ráp}$  PB) en los suelo B, B1 y E6068 se utilizaron los coeficientes  $F_{ráp}/F_{6h}$  obtenidos para el suelo B. Esta consideración, en el caso del suelo B1, fue hecha en base a la suposición de que los HAPs resistentes a la degradación bacteriana presentes en el suelo B1 (suelo obtenido tras proceso de biodegradación del suelo B) podrían presentar un

comportamiento similar frente a la desorción a la observada en el suelo original B. Los valores de  $F_{ráp PB}$  calculados a partir de  $F_{ráp}/F_{6h}$  y de la concentración de compuesto desorbida tras una única extracción a 6 horas, proporcionó valores orientativos sobre la magnitud en la que podría ocurrir la biodegradación de los HAPs en los diferentes suelos estudiados. En el caso del suelo E6068, los valores de  $F_{ráp PB}$  fueron calculados tomando como valores modelo los cocientes  $F_{ráp}/F_{6h}$  obtenidos para el suelo B.

**Tabla IV.11** Relaciones (con desviación estándar) entre la fracción de desorción rápida ( $F_{ráp}$ ) y la fracción desorbida tras 6 h ( $F_{6h}$ ) para los HAPs del suelo B. Fracciones desorbidas (mg/kg peso seco) tras única extracción Tenax de 6h. Fracción rápida (mg/kg peso seco) potencialmente biodisponible ( $F_{ráp}$  PB)..  $\alpha$ : desviación estándar menor al 0,1%.

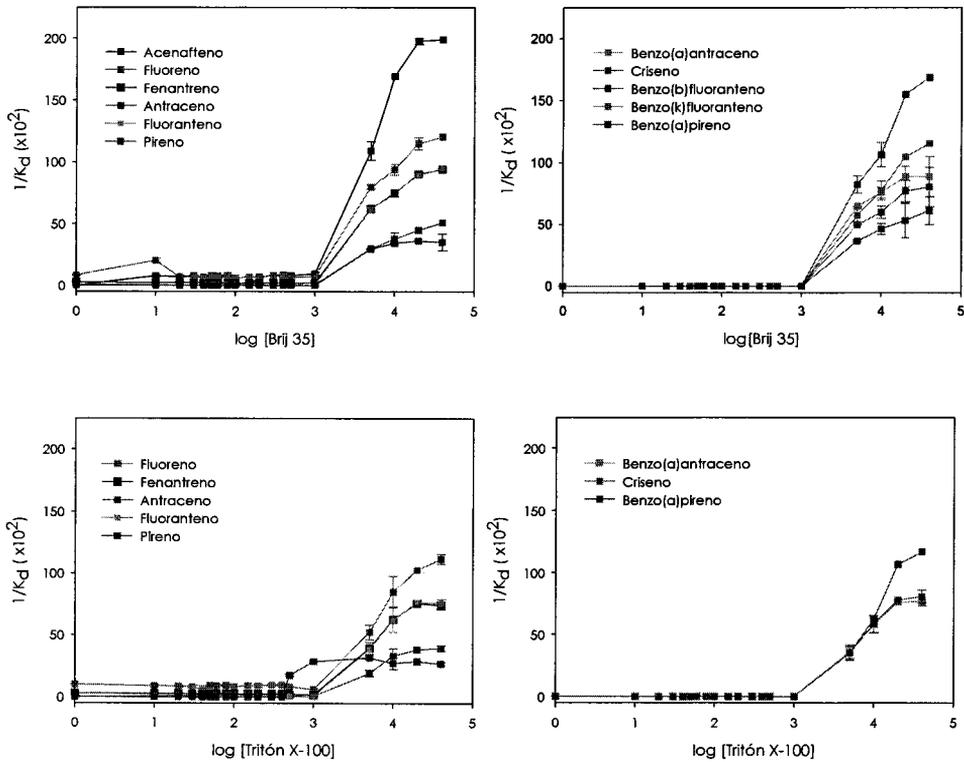
HAPs	Suelo B		Suelo B1		Suelo E6068		
	$F_{ráp}/F_{6h}$	[desorbida] <sub>6h</sub> (mg/kg ps)	$F_{ráp}$ PB (mg/kg ps)	[desorbida] <sub>6h</sub> (mg/kg ps)	$F_{ráp}$ PB (mg/kg ps)	[desorbida] <sub>6h</sub> (mg/kg ps)	$F_{ráp}$ PB (mg/kg ps)
Fluoreno	1,10 ± 0,01	171,16 183,04	188,28 201,34	25,67 25,16	28,24 27,68	1,53 2,90	1,68 3,19
Fenantreno	1,25 ± 0,00 $\alpha$	785,98 810,50	982,47 1013,12	106,70 99,36	133,77 124,20	7,10 6,38	8,87 7,97
Antraceno	1,48 ± 0,08	129,86 138,60	192,19 205,13	98,97 94,59	146,47 140,00	1,42 0,66	2,10 0,97
Fluoranteno	1,46 ± 0,03	514,51 538,46	751,20 786,15	434,86 390,22	634,89 569,72	1,91 1,95	2,79 2,85
Pireno	1,30 ± 0,05	109,71 122,30	142,62 160,00	236,32 231,23	307,22 300,60	1,74 1,70	2,26 2,21
Benzo(a)antraceno	2,05 ± 0,09	54,21 57,95	111,13 118,80	48,16 38,31	98,73 78,53	0,32 0,38	0,66 0,78
Criseno	1,69 ± 0,00 $\alpha$	40,39 41,02	68,26 69,32	40,57 31,48	68,56 53,20	0,33 0,38	0,56 0,64
Benzo(a)pireno	4,00 ± 0,13	6,92 7,35	27,68 29,40	6,08 4,42	24,32 17,68	0,54 0,84	2,16 3,36

#### IV.4.3 DESORCIÓN DE HAPs EN PRESENCIA DE TENSIOSACTIVOS: SISTEMAS EN EQUILIBRIO.

La solubilización de compuestos orgánicos hidrofóbicos, tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, por la presencia de tensioactivos, se inicia generalmente a una concentración característica para cada tensioactivo (CMC) y es proporcional a dicha CMC, (33). El objetivo de este ensayo fue estudiar la desorción de los diferentes HAPs presentes en el sistema suelo-agua por la presencia de tensioactivos en dicho sistema. Para ello se utilizaron sistemas suelo-tensioactivo estériles, equilibrados durante 24 horas. Se ensayaron un amplio rango de concentraciones de los tensioactivos, todas ellas varios ordenes de magnitud por encima del valor de la  $CMC_{MM}$  así como del valor calculado para la  $CMC_{suelo}$  (apartado IV.3.4), asegurando así la presencia de micelas en la fase acuosa. Los valores experimentales obtenidos para la constante de distribución ( $K_d$ ) de los HAPs fueron representados gráficamente frente al logaritmo de la concentración de tensioactivo empleado. La figura IV.6 muestra que, independientemente del tensioactivo empleado, existe una concentración de tensioactivo (1000  $\mu\text{g/ml}$ ;  $\log [\text{tensioactivo}] = 3$ ) a partir de la cual aumenta de manera significativa la desorción de los diferentes HAPs desde el suelo hacia la fase acuosa. Esta concentración es muy superior a la  $CMC_{MM}$  para ambos tensioactivos y muy próxima al valor de  $CMC_{suelo}$  (1122,3  $\mu\text{g/ml}$  en el caso de Tritón X-100 y 817  $\mu\text{g/ml}$  para Brij 35). Cuando la concentración de tensioactivo presente en el sistema es superior a 1 mg/ml, parte de éste (94.06 % para Tritón X-100 y 90.5 % para Brij 35) se encuentra adsorbido al suelo (apartado IV.3.4). A pesar de ello, en la fase acuosa está presente únicamente la forma micelar del tensioactivo, al encontrarse éste en concentración muy superior a su CMC. Cuando el tensioactivo se encuentra en concentraciones inferiores a su CMC, la desorción de HAPs se produce en muy pequeña proporción, debida principalmente a su fuerte adsorción al suelo.

Por tanto, se observó que la presencia de tensioactivos a concentraciones superiores a la  $CMC_{suelo}$ , aumentó significativamente la proporción de HAPs solubilizados en fase acuosa, encontrándose este aumento relacionado de forma exponencial con el incremento en la concentración de tensioactivo presente en el sistema. Estos resultados están de acuerdo con el modelo propuesto por Chu and So; (20) para el "lavado de suelo" (soil washing) con tensioactivos. Dicho modelo plantea que la desorción de los compuestos orgánicos hidrofóbicos presentes en el suelo es diferente, dependiendo de que el tensioactivo se encuentre en forma monomérica o en forma micelar. Por tanto, el "lavado" de un suelo en presencia de tensioactivo ocurre a pesar de que gran parte del tensioactivo se pierda debido a su adsorción en el suelo. El reparto de HAPs en la fase acuosa comienza a aumentar cuando en el sistema la concentración de tensioactivo es superior a la concentración que se adsorbe en el suelo ya que será entonces cuando en el seno de la solución estarán presentes las micelas aumentando así la solubilidad aparente de los HAPs. Por tanto, el "lavado" del suelo estará dominado principalmente por la presencia de micelas en el sistema suelo - fase acuosa.

Resultados y discusión



**Figura IV.6** Reparto de los HAPs en fase acuosa en presencia de distintas concentraciones de tensioactivos en sistemas estériles.

Estudios llevados a cabo por Kumbhakar et al. (68), han demostrado que a pesar de que ambos tensioactivos forman micelas con radios iguales ( $r_{micelar} = 44 \text{ \AA}$  a  $298 \text{ K}$ ), la solubilización y transferencia de masas hacia la fase acuosa de los con Brij 35 es mayor que con Tritón X-100. Este hecho podría ser la causa por la que el reparto de los HAPs más pesados es mayor con Brij 35 que con Tritón X-100.

Estudios recientes (19) proponen un mecanismo para explicar el proceso de "lavado" de suelos que contienen compuestos orgánicos hidrofóbicos con tensioactivos. Este mecanismo, mediante los valores de  $K_d$  obtenidos experimentalmente, explica el proceso de desorción observado para los HAPs del suelo contaminado en presencia de tensioactivos. Este modelo podría explicar el comportamiento observado en la desorción de los HAPs en los casos de Tritón X-100 y Brij 35 según tres etapas, dependiendo de la concentración de tensioactivo presente en el sistema. El modelo propuesto es el siguiente:

A bajas concentraciones de tensioactivo (concentraciones por debajo de  $1000 \text{ \mu g/ml}$ ;  $\log 3$ ), los HAPs, debido a su naturaleza hidrofóbica y a que se encuentran

originalmente adsorbidos al suelo, poseen mayor afinidad por las partículas de suelo que por la fase acuosa. Este hecho explicaría el tramo plano obtenido en las gráficas cuando la concentración del tensioactivo es relativamente baja. En este tramo, los valores de  $1/K_d$  permanecen prácticamente constantes en todos los HAPs estudiados, y para todas las concentraciones de tensioactivo ensayadas inferiores a 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Además, a estas concentraciones, la totalidad del tensioactivo se encuentra adsorbido en el suelo, no observándose ningún efecto en el reparto de los HAPs hacia la fase acuosa.

Cuando la concentración de tensioactivo va aumentando progresivamente en el sistema los términos  $[P]_{\text{liq}}$  y  $[P]_{\text{suelo}}$  de la ecuación (3) (apartado I.1.4) comienzan a aumentar y disminuir respectivamente dado que los HAPs unidos al suelo son los extraídos en las micelas del tensioactivo. Debido a esta situación se produce una rápida reducción de  $[P]_{\text{suelo}}$  y un progresivo aumento de  $[P]_{\text{liq}}$  y por tanto de  $1/K_d$ . Los valores de  $1/K_d$  obtenidos para este rango de concentraciones fueron aumentando conforme se incrementaba la concentración de tensioactivo presente en el sistema (tabla IV.12). El aumento en la liberación de HAPs desde la matriz del suelo en presencia de tensioactivos puede también ocurrir por incremento del gradiente de concentración de los HAPs en la interfase suelo - agua o bien por adsorción y penetración de las moléculas de tensioactivo en la matriz del suelo, causando así el ensanchamiento de ésta y aumentando la difusión de los HAPs a través de dicha matriz hacia la fase acuosa (136). En el caso de los tensioactivos tipo polioxietilenos, su adsorción y su penetración en la matriz del suelo son facilitadas por interacciones entre la cabeza hidrofílica del tensioactivo y zonas hidrofóbicas del suelo (HAPs, y otros compuestos hidrofóbicos, materia orgánica). Además, los tensioactivos con cadenas lineales en su molécula, como es el caso de Brij 35, causan mayor solubilización de los HAPs que aquellos que presentan ramificaciones como resultado de dichas interacciones.

Aparentemente, la densidad de adsorción que presenta cada tensioactivo depende también del tamaño de su molécula. Si realmente la adsorción de los tensioactivos puede llegar a controlar la difusión de los HAPs en la matriz del suelo, el tamaño molecular puede afectar a la proporción en la que se produce su adsorción en el suelo y por tanto la difusión de los contaminantes hacia la fase acuosa. Este comportamiento de los tensioactivos fue justificado con el hecho de que HAPs tales como, benzo(b)fluoranteno y benzo(k)fluoranteno, de mayor tamaño molecular, fueron detectados únicamente cuando en el sistema se encontraba presente el tensioactivo Brij 35. A pesar de que el Tritón X-100 presenta en su molécula un anillo bencénico, Brij 35 cuenta con 23 grupos etoxilatos en disposición lineal frente a los 9,5 que presenta Tritón X-100, lo cuál, como se ha comentado anteriormente, facilita las interacciones con la matriz del suelo aumentando así su adsorción y con ello la difusión de los HAPs hacia la fase acuosa.

## Resultados y discusión

**Tabla IV.12** Constante de distribución ( $1/k_d$ ) de HAPs en presencia de 40 mg/ml de tensioactivo ( $1/k_d$ ) ( $\times 10^{-3}$ ). Valores medios de análisis de muestras por duplicado. En todos los casos la desviación estándar fue menor al 10%.

HAPs	TRITÓN X-100	BRIJ 35
Fluoreno	21,38	20,65
Fenantreno	14,55	16,27
Antraceno	7,69	8,86
Fluoranteno	14,91	16,45
Pireno	5,22	6,85
Benzo(a)antraceno	14,97	17,29
Criseno	15,81	15,63
Benzo(b)fluoranteno	n.d. <sup>o</sup>	11,92
Benzo(k)fluoranteno	n.d. <sup>o</sup>	19,63
Benzo(a)pireno	24,37	29,11

Por tanto, podemos concluir que el proceso de desorción de HAPs de un suelo en presencia de tensioactivos está principalmente dominado por la existencia de micelas en el sistema, sobre todo en la fase acuosa y que la difusión de los HAPs a través de la matriz del suelo puede verse favorecida por un ensanchamiento de esta matriz provocado por el tamaño y naturaleza química de las moléculas de tensioactivo.

#### **IV.4.4 CINÉTICA DE DESORCIÓN DE HAPs EN PRESENCIA DE TENSOACTIVOS.**

##### **IV.4.4.1 Estudio de la desorción de HAPs en el suelo B con diferentes concentraciones de tensioactivos.**

Se estudiaron las cinéticas de desorción de los HAPs desde la matriz del suelo B en presencia de diferentes concentraciones de los tensioactivos Brij 35 y Tritón X-100, todas ellas por encima de sus correspondientes valores de  $CMC_{MM}$  en varios ordenes de magnitud con el fin de conocer en qué medida la presencia de tensioactivos puede aumentar la biodisponibilidad de los HAPs en la fase acuosa. En las figuras IV.7 y IV.8, se muestran las concentraciones desorbidas hacia la fase acuosa para cada uno de los tensioactivos y de los HAPs estudiados frente al tiempo de ensayo. Como sistema control se utilizó la cinética de desorción con Tenax del suelo B en condiciones iguales a las ensayadas.

Tanto en el caso de Brij 35 como en el de Tritón X-100, se observó un incremento tanto en la velocidad como en la proporción de HAPs desorbida conforme aumentaba la concentración de dichos tensioactivos en la suspensión. La extensión en la que se produjo la desorción fue en la mayoría de los casos superior a la del sistema control (extracción con Tenax), excepto en el caso de antraceno en presencia de Tritón X-100 a 40 mg/ml, donde la desorción con Tenax fue mayor que en presencia del tensioactivo. Dependiendo tanto del compuesto como del tensioactivo, así como de la concentración ensayada, los porcentajes de HAPs desorbidos fueron diferentes. En los sistemas con Brij 35, la desorción de los HAPs fue superior a la obtenida con Tenax para todas las concentraciones y compuestos estudiados. En los sistemas con Tritón X-100 a 40 mg/ml se observó que la casi totalidad del compuesto se había desorbido a las 3 horas, siendo este porcentaje para los cuatro HAPs estudiados, prácticamente constante hasta el final del ensayo. Sin embargo, para los sistemas con Brij 35, a pesar de obtenerse un porcentaje final de desorción ligeramente superior al de Tritón X-100, la desorción ocurrió de forma secuencial a lo largo del tiempo del ensayo (tabla IV.13). Esta diferencia podría ser debida a diferencias en las propiedades de ambos tensioactivos. A pesar de que ambos tensioactivos son agentes dispersantes, dicha propiedad puede variar significativamente con el número de grupos etoxilatos presentes en la molécula de tensioactivo. Debido al carácter dispersante de Tritón X-100, las tasas máximas de desorción para los sistemas donde se encontraba presente este tensioactivo fueron superiores a la de los sistemas con Brij 35 (tabla IV.14). Los resultados mostraron un incremento de las tasas máximas de desorción de los HAPs al aumentar la concentración de tensioactivo en el sistema. A pesar de que dicho efecto fue observado para ambos tensioactivos, en el caso de Tritón X-100 el aumento en la velocidad de desorción fue muy superior al del sistema control (desorción con Tenax), llegando a ser entre dos y tres veces superior para algunos de los HAPs estudiados.

La desorción máxima alcanzada para los dos tensioactivos ensayados fue similar, alcanzándose el 100 % de HAPs desorbidos a la fase acuosa para las concentraciones de 20 y 40 mg/ml en el caso de Brij 35 y de 20 mg/ml en el caso de Tritón X-100. A tiempo final (168 h), los porcentajes de los HAPs desorbidos desde

Resultados y discusión

el suelo en presencia de Brij 35 fueron mayores a los obtenidos en la desorción con Tenax, excepto en el caso de pireno en sistemas con Brij 35 a 10 mg/ml donde la desorción con Tenax fue ligeramente superior. Para los sistemas con Tritón X-100, fueron las concentraciones de 20 y 40 mg/ml las que presentaron un porcentaje de desorción superior a las conseguidas con Tenax.

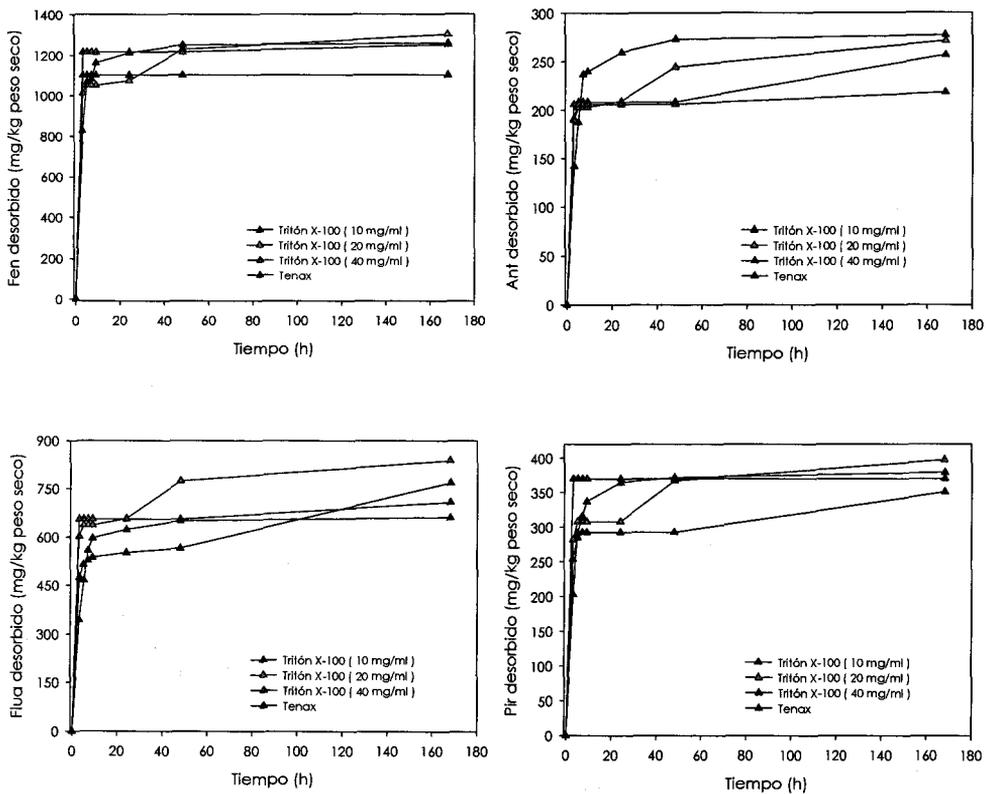


Figura IV.7 Cinéticas de desorción de cuatro HAPs en el suelo B en presencia de diferentes concentraciones de Tritón X-100 tras una semana.

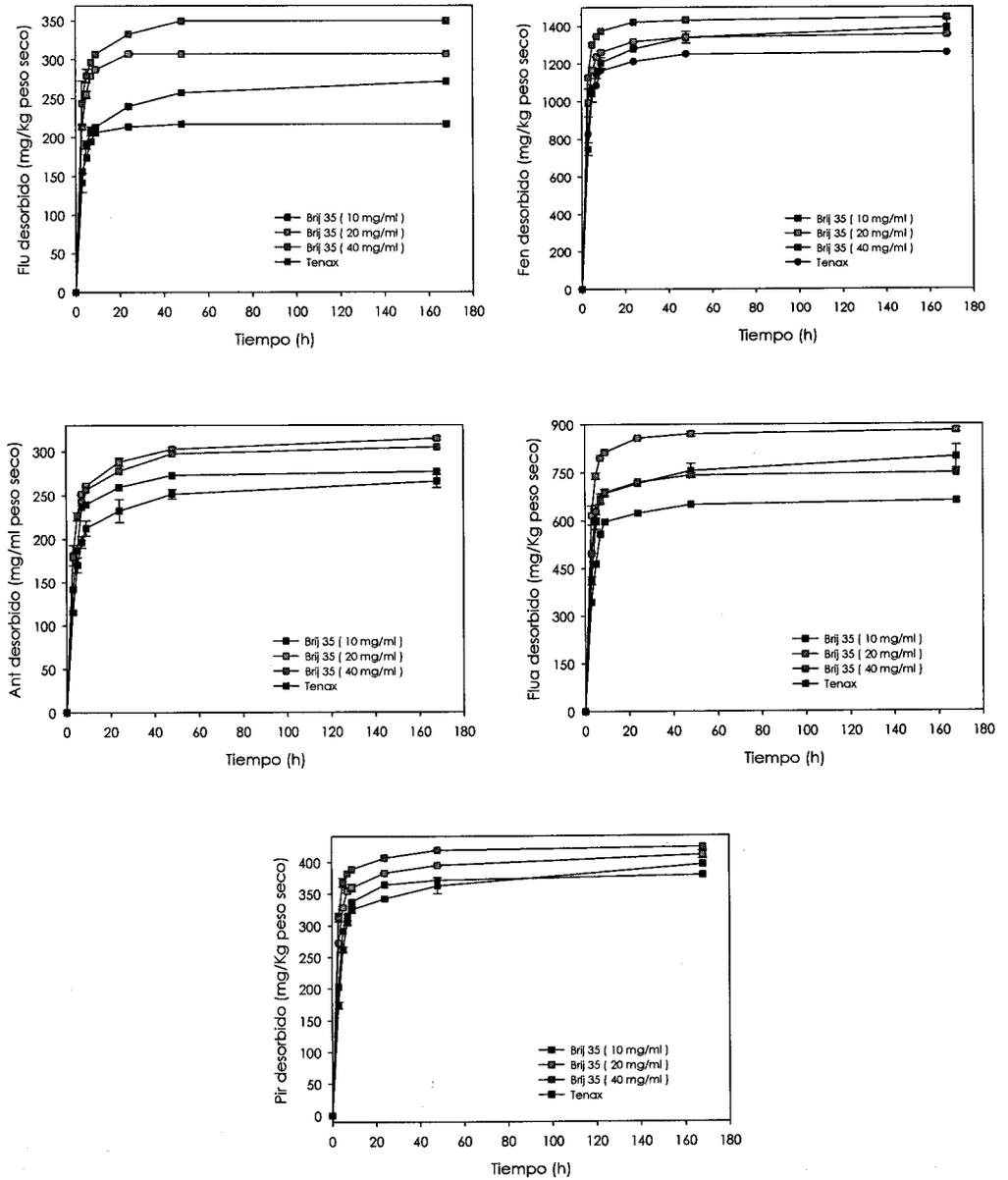


Figura IV.8 Cinéticas de desorción de cinco HAPs en el suelo B en presencia de diferentes concentraciones de Brij 35 tras una semana.

**Tabla IV.13** Porcentajes desorbidos de los diferentes HAPs tras 3h y 168 h para Tritón X-100 y Brij 35 a las concentraciones ensayadas.

% HAPs Desorbido a las 3 horas										
[tensioactivo] (mg/ml)	Tritón X-100					Brij 35				
	Flu	Fen	Ant	Flua	Pir	Flu	Fen	Ant	Flua	Pir
Tenax	51,0	62,2	49,7	38,9	51,3	51,0	62,2	49,7	38,9	51,3
10	-	82,8	66,7	53,9	64,2	46,3	56,2	40,2	46,7	64,2
20	-	76,2	66,2	68,3	71,3	70	74,7	63,4	70	69
40	-	91,4	72,0	74,4	93,5	79,6	84,6	62,7	56,5	93,5

% HAPs Desorbido a las 168 horas										
[tensioactivo] (mg/ml)	Tritón X-100					Brij 35				
	Flu	Fen	Ant	Flua	Pir	Flu	Fen	Ant	Flua	Pir
Tenax	65,0	96,6	91,6	68,0	97,7	65,0	96,6	91,6	68,0	97,7
10	-	82,8	89,6	87,2	88,7	88,6	104,7	92,9	90,5	88,7
20	-	98,0	94,7	95,0	100	100	102	109,9	99,8	100
40	-	91,4	76,1	80,4	93,5	114,2	108,8	106,4	85,0	93,5

**Tabla IV.14** Tasas máximas de desorción de HAPs ( $\text{mg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) en el suelo B en presencia de Tenax y de los tensioactivos Brij 35 y Tritón X-100. Resultados obtenidos de los valores medios de desorción.

HAPs	Flu	Fen	Ant	Flua	Pir
Tratamientos					
Tenax	34,75	129,10	33,87	79,80	58,34
Brij 35 (10 mg/ml)	38,10	163,99	34,07	95,61	52,41
Brij 35 (20 mg/ml)	51,01	233,35	45,17	147,92	65,72
Brij 35 (40 mg/ml)	55,77	260,31	45,45	125,92	75,58
Tritón X-100 (10 mg/ml)	--	367,18	66,33	158,33	84,58
Tritón X-100 (20 mg/ml)	--	337,54	63,23	200,68	93,89
Tritón X-100 (40 mg/ml)	--	405,26	68,63	218,50	123,19

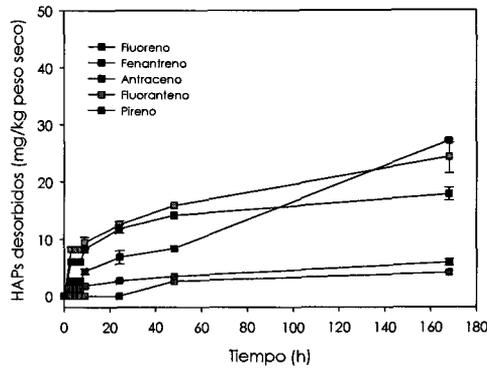
El hecho de que para ambos tensioactivos la desorción de los HAPs haya sido superior a la obtenida con Tenax podría ser explicada en base al diferente mecanismo de extracción de los HAPs en ambos métodos (27). En los dos casos los HAPs fueron desorbidos de la matriz del suelo hasta la fase acuosa, por inclusión o bien en el interior de las partículas de Tenax o bien por pseudo - solubilización en el

interior de las micelas. En ambos métodos, a determinados tiempos se cambió el agente responsable de la extracción, tenax o tensioactivo, de manera que la concentración de los HAPs en la fase acuosa era muy pequeña manteniéndose un gradiente de concentración máximo entre el sólido y la fase acuosa. Este gradiente asegura que la desorción tiene lugar a la mayor velocidad posible. En cambio, la principal diferencia entre ambos métodos depende de la forma en la que interaccionan Tenax y tensioactivo con la matriz del suelo. En los ensayos con Tenax se observa a simple vista como éste no interacciona con la matriz del suelo, en cambio, los tensioactivos Tritón X-100 y Brij 35 sí que mostraron interacciones con dicha matriz, como demuestran los ensayos de adsorción realizados para el cálculo de la  $CMC_{\text{suelo}}$  (apartado IV.3.4) aumentando la cantidad de tensioactivo adsorbido al suelo a lo largo del ensayo. Evaluando los resultados obtenidos en el apartado anterior (apartado IV.4.3), puede concluirse que el aumento en la solubilidad aparente de los HAPs no es el único mecanismo involucrado en el aumento de la disponibilidad observada en presencia de tensioactivos, si no que también interviene el aumento de difusión de los HAPs a través de la matriz del suelo como consecuencia de las interacciones suelo - tensioactivo.

#### **IV.4.4.2 Estudio de la desorción de HAPs en el suelo E6068 con Brij 35.**

Se estudiaron las cinéticas de desorción de los HAPs del suelo E6068 en presencia del tensioactivo Brij 35. Este tensioactivo y la concentración, ensayada fueron elegidos en base a los resultados obtenidos en el apartado anterior para el estudio del suelo B. Para dicho suelo el mayor porcentaje de desorción, para todos los HAPs estudiados, se obtuvo en los sistemas con Brij 35 a una concentración de 20 mg/ml. En la figura IV.9, se muestran las concentraciones desorbidas (mg/kg peso seco) hacia la fase acuosa de cada uno de los HAPs estudiados en el suelo E6068 frente al tiempo de ensayo. Los resultados mostraron que los HAPs presentaban un comportamiento muy diferente para la desorción con Brij 35 comparándolos con los obtenidos en el caso del suelo B. En el caso de la desorción de HAPs en el suelo B en presencia de Brij 35, los porcentajes desorbidos a las 3 horas de ensayo fueron muy superiores a los obtenidos en el caso del suelo E6068. Este comportamiento podría deberse principalmente a la presencia en este suelo de una fracción de HAPs resistente obtenida tras un proceso de biodegradación. Como se observa en la figura IV.9, la desorción tras 168 horas sigue aumentando para fenantreno, fluoranteno y pireno, lo cual indica que el equilibrio aún no se ha alcanzado tras este tiempo y que la desorción puede seguir aumentando con el tiempo. La baja desorción obtenida para antraceno indica la limitada transferencia de masas de dicho compuesto desde la matriz del suelo. La lenta y limitada desorción observada para los HAPs explicaría la persistencia de dichos compuestos tras un tratamiento de bioremediación (15).

Resultados y discusión



**Figura IV.9** Cinética de desorción de cinco HAPs en el suelo E6068 en presencia de Brij 35 (20 mg/ml) tras una semana.

**Tabla IV.15** Porcentajes de HAPs del suelo E6068 desorbidos a la fase acuosa y fracciones resistentes a la desorción (mg/kg peso seco) tras una semana en presencia de 20 mg/ml de Brij 35. n.d.: no detectado. LD: Flu: 2,43 mg/kg peso seco.

HAPs	% Desorbido	Fracción resistente
Fluoreno	89,4	n.d.
Fenantreno	64,1	11,86 ± 2,47
Antraceno	38,2	3,67 ± 0,88
Fluoranteno	44,3	10,77 ± 3,83
Pireno	36,9	13,47 ± 2,83
Benzo(a)antraceno	30,8	2,85 ± 0,60
Criseno	41,2	4,98 ± 1,08
Benzo(a)pireno	28,1	5,06 ± 1,03

Según los resultados obtenidos en el apartado IV.4.2, tabla IV.11, la fracción rápida de HAPs potencialmente biodisponible en el suelo E6068, determinada mediante una única extracción Tenax a 6 horas, es mucho menor que la fracción desorbida en presencia de Brij 35. Estos resultados sugieren que la fracción de HAPs desorbida por la presencia del tensioactivo es, además de dicha fracción rápida, una gran parte de la fracción de desorción lenta, aumentando así la biodisponibilidad de dichos compuestos en la fase acuosa. Las fracciones resistentes a la desorción obtenidas con Brij 35 tras una semana demostraron que efectivamente el tensioactivo podría aumentar la biodisponibilidad de los HAPs del suelo E6068 y por tanto favorecer en mayor grado su biodegradación

## **IV.5 BIODEGRADACIÓN BACTERIANA DE HAPs EN SUELOS ARCILLOSOS.**

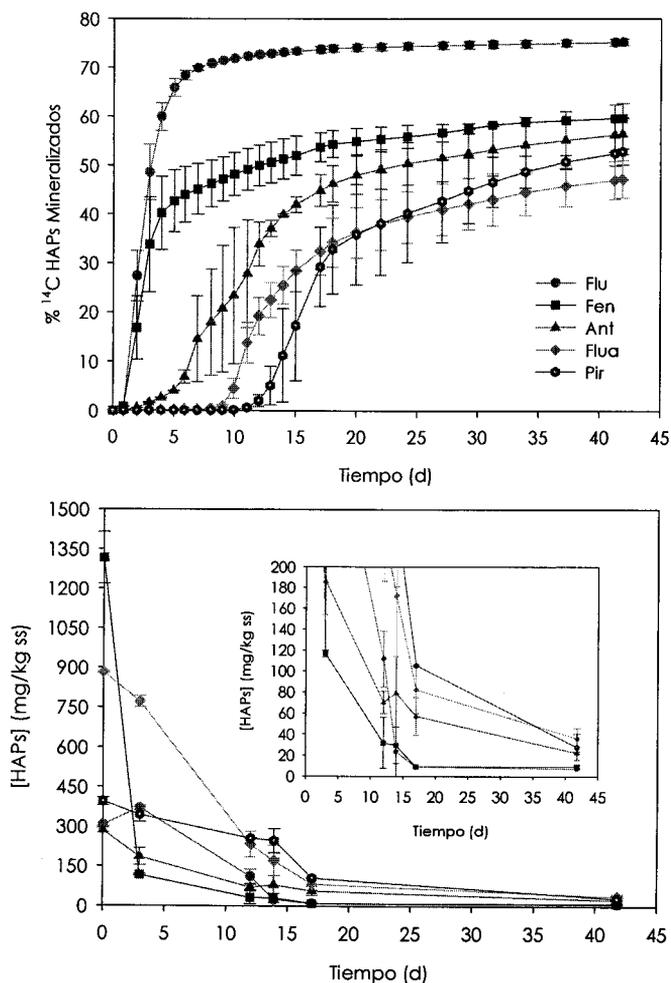
### **IV.5.1 BIODEGRADACIÓN DE HAPs POR BACTERIAS AUTÓCTONAS DEL SUELO.**

El estudio de la biodegradación de los HAPs presentes en el suelo B por las bacterias autóctonas se llevó a cabo en sistemas de suelo en suspensión en la misma proporción suelo-fase acuosa que la utilizada en los ensayos de desorción con tenax. Para ello se siguió, de forma paralela, la mineralización de los cinco HAPs diana (fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno) marcados con  $^{14}\text{C}$ , así como su desaparición a lo largo del tiempo mediante medidas por HPLC. El seguimiento de la biodegradación mediante HPLC se extendió además a los cinco HAPs pesados benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno y benzo(a)pireno.

Las curvas de mineralización representan el porcentaje acumulativo de  $^{14}\text{C}$ -HAPs mineralizado frente al tiempo (figura IV.10). Tanto la mineralización como la biodegradación de los HAPs diana se produjo en orden secuencial de acuerdo con el aumento de peso molecular del contaminante. Las bacterias autóctonas degradaron en primer lugar aquellos HAPs de estructura molecular más simple como son fluoreno, fenantreno y antraceno, de 3 anillos, alcanzándose una mineralización máxima del 75,3 % para fluoreno, 59,7 % para fenantreno y 56,4 % para antraceno en un periodo total de 42 días. A continuación, tras una fase de latencia de 10 días, fueron mineralizados aquellos HAPs con mayor número de anillos en sus moléculas (fluoranteno y pireno con 4 anillos). La mineralización máxima alcanzada para cada uno de ellos fue de 47,2 % y 52,9 % respectivamente.

El retraso en el comienzo de la mineralización de fluoranteno y pireno puede ser explicado de acuerdo a su cinética de desorción (28). Según los resultados obtenidos en el estudio de la cinética de desorción de los HAPs del suelo B con Tenax (apartado IV.4.1, tabla IV.9), cuanto mayor es el peso molecular del compuesto, menor es su fracción de desorción rápida. Esto significa que dichos HAPs se desorberán más lentamente hacia la fase acuosa que aquellos otros que presenten una fracción de desorción rápida mayor, tales como fluoreno y fenantreno, produciéndose un retraso en su mineralización.

El seguimiento de la biodegradación mediante HPLC, llevado a cabo de forma paralela a la mineralización (apartado II.11.2), evidenció el comportamiento bifásico de desaparición de los hidrocarburos por biodegradación, semejante al comportamiento de estos frente a la desorción con tenax. Se observó una primera etapa de biodegradación muy rápida (3 días en el caso de fenantreno) seguida de una segunda etapa mucho más lenta. Aunque se observó este comportamiento bifásico para todos los hidrocarburos estudiados, en los casos de fluoreno y fenantreno, este comportamiento fue mucho más claro. La causa principal de este tipo de comportamiento predicho por las cinéticas de desorción con Tenax, puede ser debida, como se comentó anteriormente, a la mayor biodisponibilidad de estos dos HAPs en la fase acuosa tanto por su cinética de desorción como por su solubilidad.



**Figura IV.10** Mineralización y biodegradación de HAPs por bacterias autóctonas del suelo B.

El hecho de que el antraceno comenzara a ser mineralizado tras una fase de latencia de aproximadamente 3 días puede ser atribuido a su baja solubilidad (0,076 mg/l) comparada con 1,68-1,98 mg/l y 1,20 mg/l para fluoreno y fenantreno respectivamente (30), así como a su lenta desorción (fracción de desorción rápida,  $F_{ráp}$  94,6 % respecto a 98,7 % para fluoreno y 96,1 % para fenantreno). La biodegradación de fluoranteno y pireno ocurrió más retardada que la observada para los HAPs de 3 anillos, fluoreno, fenantreno y antraceno. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos por Park et al. (98), los cuales demostraban que la biodegradación ocurría de forma más rápida para los HAPs de menor peso molecular, así como con los resultados obtenidos del estudio de la cinética de

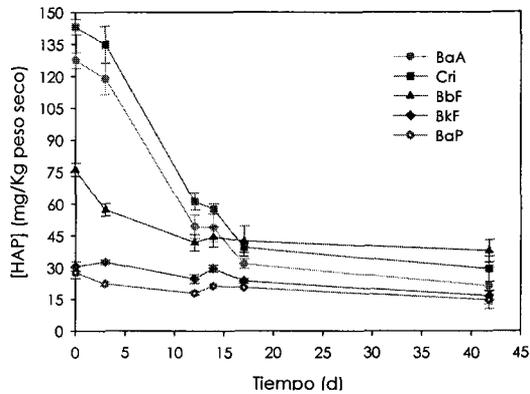
desorción con Tenax (apartado III.4.1, tabla IV.9) donde las fracciones de desorción rápida (Fráp) son menores conforme aumenta el número de anillos del HAPs.

**Tabla IV.16** (1) Concentraciones iniciales de HAPs en el suelo B sin autoclavar. Desviaciones estándar de muestras por duplicado

HAPs	[HAPs] Suelo B (1) (mg/kg s.s)	[HAPs] Fracción resistente a biodegradación (mg/kg s.s)	Tasas máximas de mineralización (% mg kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	% HAPs Biodegradado
Fluoreno	306,33 ± 5,65	7,076	63,22 ± 2,19	97,7
Fenantreno	1329,49 ± 52,72	9,04 ± 1,75	170,32 ± 32,15	99,3
Antraceno	286,31 ± 9,10	22,37 ± 1,08	19,49 ± 2,04	92,2
Fluoranteno	881,50 ± 3,42	44,61 ± 3,06	45,64 ± 3,72	95,0
Pireno	395,22 ± 15,03	17,91 ± 0,04	21,28 ± 5,69	95,5
Benzo(a)antraceno	129,49 ± 3,66	21,37 ± 8,79	-	83,5
Criseno	143,14 ± 3,70	32,09 ± 3,20	-	77,6
Benzo(b)fluoranteno	76,07 ± 3,12	35,28 ± 1,34	-	53,6
Benzo(k)fluoranteno	30,52 ± 2,20	16,71 ± 2,35	-	45,2
Benzo(a)pireno	30,71 ± 4,40	16,59 ± 1,69	-	46,0

Los valores obtenidos como fracciones resistentes a la biodegradación bacteriana (tabla IV.16) fueron superiores a las obtenidas como fracciones resistentes a la desorción con tenax (apartado IV.4.1). Estas diferencias pueden ser debidas a que durante los ensayos de desorción con Tenax el gradiente de concentración en la interfase suelo-agua es mucho mayor que el originado durante los ensayos de biodegradación (15, 23, 72, 130).

A diferencia de lo que ocurrió con los HAPs ligeros, la desaparición de los HAPs más pesados no ocurrió de forma secuencial, sino que se produjo la degradación desde el comienzo del ensayo aunque más lentamente (figura IV.12). La proporción en la que ocurrió la biodegradación de los HAPs de mayor peso molecular, con cuatro y más anillos en sus moléculas, fue menor que la observada para los HAPs más ligeros. Este comportamiento está de acuerdo con los resultados obtenidos por Park et al. (98), donde se demostraba que la biodegradación ocurre de forma más rápida y en mayor extensión para los hidrocarburos de menor peso molecular. En general, cuanto mayor es el número de anillos de benceno en la molécula, más recalcitrante resulta el contaminante (52). Además, el aumento en el número de anillos es un factor determinante de la diferente solubilidad de los HAPs, ya que ésta decrece logarítmicamente con el número de anillos (17, 63).



**Figura IV.12** Biodegradación de los HAPs pesados presentes en el suelo B por las bacterias autóctonas.

Después de 42 días de tratamiento, los HAPs más pesados fueron parcialmente biodegradados aunque en menor proporción que los cinco HAPs estudiados anteriormente (tabla IV.16). La reducción observada en la concentración de los HAPs más pesados se debe probablemente a la presencia en el suelo de bacterias capaces de degradar este tipo de compuestos bien utilizándolos como fuente de carbono (reducción de benzo(a)antraceno y criseno) o bien mediante procesos de cometabolismo (reducción de benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno y benzo(a)pireno) (18, 114). En la figura IV.12 se observa que la mayor tasa de biodegradación para los HAPs más pesados se produjo durante un período inicial de entre tres y doce días, tiempo durante el cuál, parte de la fracción lábil de los HAPs más ligeros ya había sido biodegradada, como en los casos de fluoreno y fenantreno, o bien empezaban a ser biodegradados, como en los casos de antraceno, fluoranteno y pireno, pudiendo ser estos utilizados como co-sustratos en la degradación de los HAPs más pesados vía cometabolismo (61). Esta dependencia de la biodegradación de los HAPs pesados sobre la de los ligeros subraya la importancia de los factores que limitan la biodegradación de estos últimos para mejorar el resultado final tras la aplicación de técnicas de biorremediación en suelos contaminados por HAPs.

Existen numerosos estudios encaminados a demostrar la biodegradación de los HAPs más pesados mediante procesos de cometabolismo bacteriano, sobre todo en el caso de benzo(a)pireno, por ser este compuesto uno de los HAPs de mayor potencial carcinogénico (116), además de uno de los contaminantes prioritarios en la clasificación de la EPA (113). Muchos estudios han tratado de demostrar la biodegradabilidad de benzo(a)pireno, tanto en medio líquido como en suelos, pero no en todos los casos los resultados fueron los esperados. La acción de comunidades bacterianas degradadoras de fluoranteno sobre los HAPs componentes de la creosota fue evaluada por Mueller et al; en medios líquidos

(90). Cuando la bacteria creció utilizando fluoranteno como única fuente de carbono y energía, 13 de los 17 HAPs presentes en la creosota fueron degradados, incluyendo benzo(a)pireno. La degradación de Benzo(a)pireno de la creosota (41,5 % en 28 días) fue también observada por Grifoll et al. (44). En sus estudios, la bacteria *Pseudomonas cepacia* F297 degradó tanto los HAPs ligeros como los pesados en medio acuoso salino.

Mueller et al. (89) evaluaron el funcionamiento de los procesos de bioremediación en la recuperación de suelos contaminados con creosota. Aunque la población autóctona del suelo fue capaz de degradar los HAPs de menor peso molecular (con dos y tres anillos), las concentraciones de los HAPs más pesados (de cuatro, cinco y seis anillos) permanecieron inalteradas tras el ataque bacteriano. Resultados similares fueron obtenidos por Park et al.;(98). Autores como Carmichael and Pfaender (17), estudiaron el incremento producido en la mineralización de benzo(a)pireno en suelos donde ya se había producido la mineralización de otros HAPs tales como fenantreno, pireno, benzo(a)antraceno y criseno. Kanaly and Bartha (62), observaron cómo la presencia de hidrocarburos seleccionados y de mezclas de diferentes hidrocarburos afectaban a la degradación de benzo(a)pireno en suelos. Demostraron que la presencia de petróleo en el suelo, así como algunas de sus fracciones, aumentaba la tasa de mineralización del benzo(a)pireno al contener el crudo los sustratos primarios necesarios para la mineralización de este compuesto. Los períodos de latencia observados en la mineralización del benzo(a)pireno, fueron atribuidos a la presencia en la fracción volátil de dichas mezclas de inhibidores competitivos de la mineralización. Autores como Juhasz et al. (60), han propuesto que la degradación de benzo(a)pireno puede ser debida al aumento en la actividad metabólica de las bacterias como consecuencia de la degradación llevada a cabo más fácilmente de los HAPs de menor peso molecular. Estudios recientes, encaminados a esclarecer la acción cometabólica de algunas bacterias, han demostrado la existencia de genes isofuncionales en bacterias del género *Mycobacterium* los cuales confieren a estas bacterias la capacidad de utilizar HAPs de elevado peso molecular como fuentes de carbono y energía (64, 123).

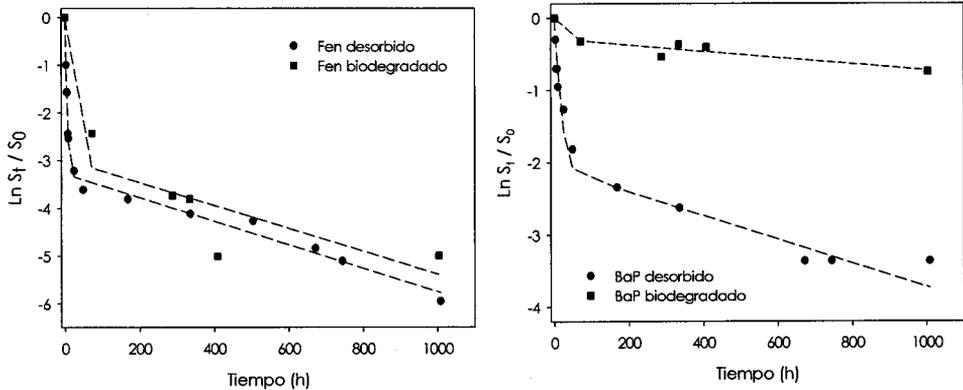
En nuestro ensayo, tras 42 días de tratamiento, las fracciones resistentes a la biodegradación obtenidas para los HAPs estudiados son las mostradas en la tabla IV.16. Las curvas de biodegradación, tanto de los HAPs más ligeros como para los más pesados, mostraron un comportamiento bifásico, similar a la desorción de los HAPs en presencia de Tenax. A partir de los 17 días las curvas de biodegradación no mostraron reducciones significativas en las fracciones resistentes de los HAPs a pesar de prolongar el tiempo del ensayo no lográndose disminuir las fracciones resistentes a biodegradación. Esto indica que la fracción de HAPs aún presente en el suelo, no se encuentra biodisponible para la degradación bacteriana, principalmente por haberse alcanzado la fase de desorción lenta en las cinéticas de dichos compuestos.

En la figura IV.13 se han comparado las cinéticas de desorción con Tenax y las curvas de biodegradación de dos HAPs representativos de los diferentes comportamientos de los compuestos: biodisponibles y biodegradables (fenantreno) y compuestos de desorción lenta y por tanto baja biodisponibilidad (benzo(a)pireno). Para ello se han ajustado los resultados experimentales de

biodegradación al modelo bifásico de desorción. Los resultados obtenidos son mostrados en la figura IV.13 y en la tabla IV.17.

En el caso de fenantreno, desorción y biodegradación mostraron comportamientos bifásicos muy parecidos. Durante la primera etapa, de aproximadamente 48 horas, las fracciones de desorción rápida y biodegradación fueron prácticamente iguales ( $96,1 \pm 0,1 \%$  y  $94,9 \pm 2,5 \%$  respectivamente), aunque la velocidad de degradación ( $K_{ráp} = 0,91 \text{ h}^{-1}$ ) fue superior a la de desorción ( $K_{ráp} = 0,38 \text{ h}^{-1}$ ). Este comportamiento podría ser debido a que la población autóctona del suelo fue capaz de degradar tanto el fenantreno presente en el suelo como el desorbido a la fase acuosa. Tras agotarse la fase de desorción rápida, comenzó una segunda etapa de desorción lenta que se prolongó hasta el final del ensayo (42 días). Las constantes de velocidad lenta ( $K_{len}$ ) confirmaron que en la etapa de desorción lenta la biodegradación de fenantreno ocurrió a la misma velocidad que su desorción. Esto significa que la biodegradación de fenantreno no se encuentra limitada por factores microbiológicos sino por desorción lenta del compuesto hacia la fase acuosa (biodisponibilidad limitada) y que es esta la causa de la presencia de una fracción resistente a la biodegradación.

En el caso del benzo(a)pireno, el comportamiento frente a desorción y a biodegradación fue muy diferente respecto al observado para fenantreno. Según se muestra en la figura IV.13, tanto la desorción como la biodegradación siguieron un comportamiento bifásico similar al observado para fenantreno, sin embargo, tanto la extensión de dichos procesos (medidoa por  $F_{ráp}$  y  $F_{len}$ ) como sus constantes cinéticas fueron muy diferentes. La cinética de desorción de Benzo(a)pireno mostró una fracción de desorción rápida ( $F_{ráp}$ ) de  $86,7 \pm 0,94 \%$ , frente al  $31,4 \pm 4,0 \%$  observado para su biodegradación. Estos valores fueron en ambos casos, menores que los obtenidos para fenantreno. Esta diferencia significa que a pesar de que benzo(a)pireno fuera desorbido más lentamente hacia la fase acuosa podría con el tiempo ser biodegradado. Sin embargo, los datos sugieren que la biodegradación no ocurre de forma paralela a la desorción. La causa de esta situación podría ser la ausencia en el suelo de bacterias degradadoras de benzo(a)pireno y que la biodegradación observada fuera debida exclusivamente a procesos de cometabolismo.



**Figura IV.13** Cinética de desorción con Tenax y cinética de biodegradación de fenantreno y Benzo(a)pireno por la población microbiana autóctona del suelo B tras 42 días. Las líneas discontinuas representan el ajuste de los datos experimentales al modelos bifásico de desorción.

Por tanto, el estudio de las cinéticas de desorción y biodegradación de los HAPs proporciona información sobre cuál puede ser la causa de la presencia de fracciones de contaminantes resistentes a la biodegradación. En el caso de compuestos con una fracción de desorción rápida ( $F_{ráp}$ ) alta, como el fenantreno, es la lenta desorción del compuesto la que limita la biodegradación. Sin embargo, para compuestos con  $F_{ráp}$  algo menores, como benzo(a)pireno, la biodegradación parece estar limitada por factores microbilógicos y no por la reducida biodisponibilidad del compuesto.

**Tabla IV.17** Constantes cinéticas de desorción y biodegradación para fenantreno y benzo(a)pireno en el suelo B obtenidas mediante cinética Tenax y biodegradación durante 42 días.  $\alpha$ : Desviación estándar de muestras por duplicado menor al 0,1%

HAPs	Fenantreno		Benzo(a)pireno	
	Tenax	Biodegradación	Tenax	Biodegradación
$F_{ráp}$ (%)	$96,1 \pm 0,1$	$94,9 \pm 2,5$	$86,7 \pm 0,9$	$31,4 \pm 4,0$
$F_{len}$ (%)	$3,9 \pm 0,1$	$5,1 \pm 2,5$	$13,3 \pm 0,9$	$68,6 \pm 4,0$
$K_{ráp}$ ( $h^{-1}$ )	$0,38 \pm 0,00^\alpha$	$0,91 \pm 0,00^\alpha$	$0,11 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,00^\alpha$
$K_{len}$ ( $\times 10^{-3} h^{-1}$ )	$2,70 \pm 0,03$	$2,20 \pm 0,50$	$1,80 \pm 0,20$	$0,08 \pm 0,00^\alpha$

#### IV.5.2 BIODEGRADACIÓN DE HAPs EN SUSPENSIONES DE SUELO INOCULADAS.

El estudio de las capacidades catabólicas de las poblaciones autóctonas de los suelos contaminados por HAPs tiene la ventaja de la similitud con los sistemas reales sometidos a biorremediación, basados principalmente en estas capacidades. No obstante, tienen el inconveniente del desconocimiento y la complejidad del componente microbiano responsable de la transformación del contaminante así como de los posibles cambios producidos en dicha población por alteración de alguna de las propiedades físico-químicas del suelo o bien simplemente por el paso del tiempo. Por ello, hemos utilizado un sistema modelo en el que el suelo contaminado, tras su esterilización, ha sido inoculado con una estirpe bacteriana conocida. En la mayoría de los ensayos realizados se ha utilizado *Mycobacterium* sp. VM 552, que se seleccionó por ser una estirpe representativa de las bacterias degradadora de HAPs de 3 y 4 anillos (fenantreno, fluoranteno y pireno).

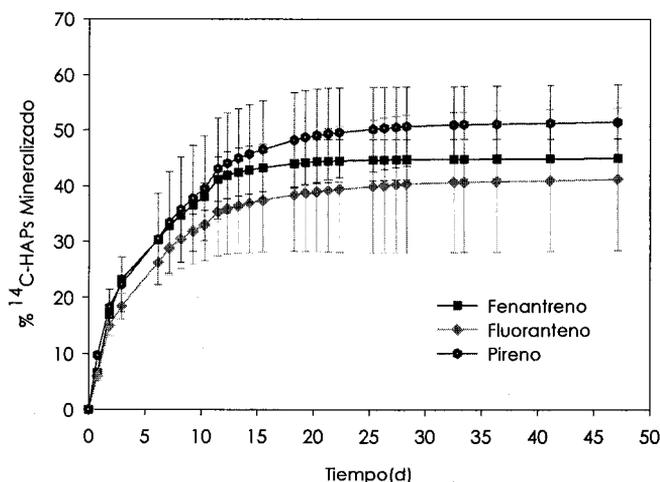


Figura IV.14 Mineralización del suelo B en suspensión por la bacteria VM 552 WT

La figura IV.14 muestra la mineralización de tres HAPs por *Mycobacterium* sp. VM 552, precultivada en fenantreno, en suspensiones del suelo B. Tras 47 días de tratamiento (tiempo muy similar al utilizado en los ensayos con bacterias autóctonas), la mineralización alcanzó un máximo de 45 % para fenantreno, 41.2 % para fluoranteno y 51.5 % para pireno. Estos valores son similares a los obtenidos para estos tres HAPs en la mineralización por bacterias autóctonas. Sin embargo, cuando el sistema fue inoculado con la *Mycobacterium* no se observó el uso secuencial de los HAPs que ocurriría con la población autóctona. Los tres HAPs comenzaron a ser mineralizados prácticamente al mismo tiempo y sin fase previa de latencia. Este comportamiento podría ser explicado en función de la distinta fisiología de la estirpe *Mycobacterium* sp. VM 552 frente a la de las bacterias autóctonas presentes en el suelo B. Es posible, que las especies presentes en el suelo inicialmente, adaptadas a las condiciones *in situ*, estuvieran más adaptadas

a la utilización de los HAPs más ligeros, como fenantreno o fluoreno, y que la utilización de los HAPs de cuatro anillos requiriera el desarrollo de otras poblaciones diferentes, posiblemente *Mycobacterium*. A tiempo final del ensayo, las fracciones resistentes a la biodegradación por la *Mycobacterium* sp. VM 552 fueron las mostradas en la tabla IV.18.

**Tabla IV.18** (1) Concentraciones iniciales de HAPs en el suelo B autoclavado. Desviaciones de medidas por duplicado.

HAPs	[HAPs] Suelo B (1) (mg/kg s.s)	[HAPs]Fracción resistente (mg/kg s.s)	Tasas máximas de mineralización (mg kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Fluoreno	219,77 ± 7,64	4,56	-
<b>Fenantreno</b>	<b>1230,67 ± 13,69</b>	<b>7,32 ± 0,15</b>	<b>97,19 ± 2,47</b>
Antraceno	223,13 ± 4,49	33,09 ± 5,61	-
<b>Fluoranteno</b>	<b>866,57 ± 30,00</b>	<b>87,56 ± 2,23</b>	<b>70,18 ± 8,09</b>
<b>Pireno</b>	<b>391,63 ± 35,49</b>	<b>36,72 ± 2,06</b>	<b>38,11 ± 6,72</b>
Benzo(a)antraceno	136,01 ± 3,76	91,50 ± 0,49	-
Críseno	102,45 ± 3,57	110,83 ± 2,06	-
Benzo(b)fluoranteno	55,58 ± 1,47	53,45 ± 0,23	-
Benzo(k)fluoranteno	31,05 ± 1,43	27,64 ± 0,41	-
Benzo(a)pireno	21,99 ± 1,31	15,63 ± 0,25	-

Las concentraciones de los tres HAPs se redujeron significativamente tras el ensayo, alcanzándose fracciones resistentes a la biodegradación bacteriana del mismo orden de magnitud que las alcanzadas para estos tres HAPs en la biodegradación del suelo B por las bacterias autóctonas (apartado IV.5.1, tabla IV.16). No obstante, cabe destacar que para fenantreno dicha fracción resistente fue muy similar tanto en el caso de la biodegradación en presencia de *Mycobacterium* como en el caso de la población autóctona del suelo. Dicha fracción fue además del mismo orden de magnitud que la obtenida tras los ensayos de desorción con Tenax. Es de destacar que para fluoranteno y pireno dicha fracción fue aproximadamente el doble cuando la suspensión fue inoculada. Esta diferencia puede explicarse postulando que la localización, al menos de una parte de la fracción resistente de los contaminantes, sea en zonas de los agregados del suelo a los que las bacterias inoculadas no puedan acceder, mientras que las ya existentes (población autóctona) sí lo hacen al encontrarse incluso incorporadas a dichos agregados.

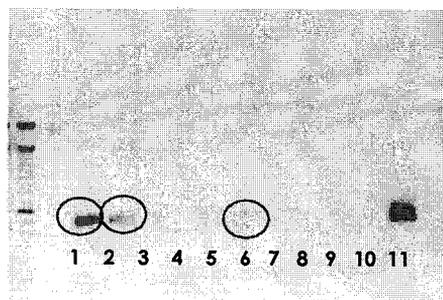
Las concentraciones de algunos de los HAPs más pesados presentes en el suelo B no mostraron variaciones significativas tras el ensayo. Los porcentajes biodegradados tras los 47 días de tratamiento fueron: 0 % de críseno, 3,8 % de benzo(b)fluoranteno y 11 % de benzo(k)fluoranteno. En cambio, fluoreno, antraceno, benzo(a)antraceno y benzo(a)pireno, a pesar de no ser sustratos específicos de *Mycobacterium* sp. VM 552, fueron biodegradados en unas

proporciones del 98 %, 85,2 %, 32,7 % y 29 %, respectivamente. McLellan et al., demostraron que la estirpe RJGII-135, perteneciente al género de las *Mycobacterium*, era capaz de degradar mediante catabolismo un amplio rango de HAPs entre ellos fenantreno, antraceno pireno, y benzo(a)antraceno y benzo(a)pireno (85). Una situación semejante podría ocurrir en nuestro caso.

#### IV.5.3 ESTUDIO DE LA POBLACIÓN MICROBIANA PRESENTE EN EL SUELO: DETERMINACIÓN DEL LIMITE DE DETECCIÓN PARA PCR EN MUESTRAS DE SUELO.

El estudio de la población microbiana por técnicas moleculares puede proporcionarnos información sobre qué estirpes están presentes en el suelo, e incluso en qué número, durante el tratamiento con tensioactivos que pretende llevarse a cabo. El uso de la técnica de PCR como método cuantitativo para el estudio de la población bacteriana en el suelo, necesita de un paso previo como es el establecimiento de un límite de detección de dicha técnica, sobre todo en el caso de suelos con alto contenido en arcilla como el estudiado.

Para la determinación del límite de detección, se inocularon diferentes muestras de suelo seco con distintas diluciones de un cultivo puro de *Mycobacterium sp. VM 552* (apartado II.12.5). Tras la extracción, purificación, PCR y electroforesis en gel de agarosa del DNA bacteriano, realizados siguiendo los protocolos expuestos en el apartado de materiales y metodología, las bandas obtenidas para estas muestras fueron las se mostradas en la figura IV.15.



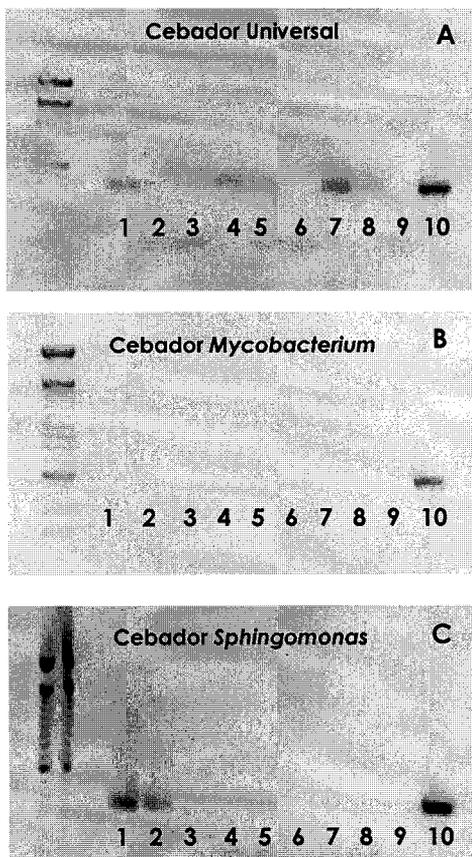
BANDAS	TRATAMIENTO
1	DNA 4x10 <sup>8</sup>
2	Dilución 1:10
3	Dilución 1:100
4	Dilución 1:1000
5	Dilución 1:10000
6	DNA 4x10 <sup>6</sup>
7	Dilución 1:10
8	Dilución 1:100
9	Dilución 1:1000
10	Dilución 1:10000
11	Control <i>Mycobacterium</i>

Figura IV.15 Determinación del límite de detección de PCR

De acuerdo con las bandas obtenidas para cada una de las diluciones, el límite de detección para el análisis de DNA bacteriano mediante la técnica de PCR fue establecido, para el suelo contaminado arcilloso objeto de estudio, entre 10<sup>7</sup> y 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias (CFU) por gramo de suelo (bandas 2, 3 y 6

aunque en la figura no se aprecie ésta última con claridad al encontrarse prácticamente en el límite de detección de la técnica).

Para el estudio de la población microbiana tanto del suelo original B (húmedo y seco) como del B1, obtenido tras un proceso de biodegradación clásica, el procedimiento seguido fue igual al descrito en el apartado II.12 del capítulo de materiales y metodología siguiendo los pasos descritos para la extracción, purificación y amplificación por PCR del DNA bacteriano. Para el estudio de la población microbiana total, presente en las muestras de suelo, la reacción por PCR fue realizada con cebadores universales. Se utilizaron cebadores específicos de *Mycobacterium* y *Sphingomonas* para el estudio de éstas poblaciones en concreto.



BANDA	TRATAMIENTO
1	DNA Suelo B1
2	Dilución 1:10
3	Dilución 1:100
4	DNA Suelo Seco
5	Dilución 1:10
6	Dilución 1:100
7	DNA Suelo Húmedo
8	Dilución 1:10
9	Dilución 1:100
10	Control Myco/Sphingo

Figura IV.16 Bandas obtenidas para el suelo B con diferentes cebadores.

Las bandas obtenidas para cada uno de los suelos y con cada uno de los cebadores fueron las mostradas en la figura IV.16. La reacción de PCR con cebadores universales (figura IV.16.A), permitió el estudio de la población autóctona total de los suelos. Las bandas 1 y 2, pertenecientes al suelo B1 original y diluido diez veces mostraban la presencia de DNA bacteriano, a pesar del tratamiento al que había sido sometido este suelo en su obtención (inoculación con *Sphingomonas* y congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; apartado II.2 del capítulo de materiales y metodología).

Este estudio reveló que la población microbiana, como cabía esperar, era mayor en el suelo húmedo original (bandas 7 y 8) que en el suelo seco (bandas 4 y 5). Esta diferencia fue debida a que en el proceso de secado del suelo se produjo una disminución en la población microbiana autóctona. La intensidad de dichas bandas confirmó además que la población microbiana se encontraba en una concentración superior al límite de detección de la técnica tanto para el suelo original, tanto seco como húmedo, como para el B1.

En la figura IV.16.B obtenida para la reacción de PCR con cebadores específicos de *Mycobacterium*, no se observó ninguna banda (excepto la del control) para ninguno de los suelos objeto del estudio. Esto significa que en el suelo original, y por tanto de igual forma para el B1, no existía población autóctona detectable del género *Mycobacterium*. En el tercer caso (figura IV.16.C), la reacción de PCR fue realizada con cebadores específicos de *Sphingomonas*. Solamente se obtuvieron bandas en el caso del suelo B1, ya que había sido este suelo el que al someterse al proceso de biodegradación clásica para la obtención de un suelo parado, había sido inoculado con ésta estirpe. A pesar de que en el proceso de obtención de este suelo B1, éste fue sometido a temperaturas extremas de  $-80^{\circ}\text{C}$  para detener la actividad bacteriana, el DNA de *Sphingomonas* permaneció en buen estado de conservación debido principalmente al alto contenido en arcilla del suelo (60 %).

## IV.6 INFLUENCIA DE LOS AGENTES TENSIOACTIVOS EN LA BIODISPONIBILIDAD DE HAPs EN SUELOS.

### IV.6.1 EFECTO DE LOS TENSIOACTIVOS SOBRE LA MINERALIZACIÓN DE HAPs Y EL CRECIMIENTO BACTERIANO EN SUELOS.

La mineralización de fenantreno en sistemas de suelo en suspensión formados por 1 g de suelo seco estéril y 70 ml de fase acuosa (medio de mineralización), inoculados con *Mycobacterium* sp. VM 552 y en presencia de diferentes tensioactivos no iónicos fue seguida durante seis semanas aproximadamente. Los tensioactivos ensayados fueron Brij 30, Brij 35 y Tritón X-100, en concentraciones muy superiores a sus  $CMC_{MM}$  en varios ordenes de magnitud, oscilando entre 5 y 500 veces el valor de la  $CMC_{MM}$  de cada uno de ellos.

Como puede observarse en la figura IV.17, no todos los tensioactivos, ni todas las concentraciones ensayadas siguieron el mismo comportamiento. Según se observa en la figura IV.19.A, la población bacteriana inoculada mineralizó un 44 % de  $^{14}C$ -fenantreno en ausencia de tensioactivos a tiempo final del ensayo. La presencia en el sistema de los tensioactivos Tritón X-100 y Brij 35, a una concentración de 0,5 mg/ml, mostró un ligero aumento en la extensión en la que se produjo la mineralización (46,3 % en el caso del Tritón X-100 y 52,1 % en el caso del Brij 35). A pesar de ello, las tasas máximas de mineralización alcanzadas no fueron superiores a las obtenidas en los sistemas sin tensioactivos (tabla IV.19). La mineralización de  $^{14}C$ -fenantreno en los sistemas con Brij 30 fue muy diferente a la observada tanto para Tritón X-100 como para Brij 35. Cuando Brij 30 se encontraba en el sistema a una concentración de 0,5 mg/ml, la mineralización del fenantreno ocurrió tras un período de latencia de 10 días con una tasa máxima de mineralización del compuesto marcado menor que en los casos de Tritón X-100 y Brij 35, a pesar de que se alcanzó un porcentaje máximo del 47 % al finalizar el ensayo, valor muy similar al de los tensioactivos mencionados anteriormente.

Cuando se aumentó la concentración de tensioactivos hasta 10 mg/ml los sistemas con Tritón X-100 y con Brij 35 mostraron un ligero aumento de las tasas máximas de mineralización pero no en la extensión en la que ésta se produjo (38 % y 37 % respectivamente). En cambio, cuando la concentración de Brij 30 fue de 10 mg/ml, la mineralización de  $^{14}C$ -fenantreno fue prácticamente inhibida alcanzándose un porcentaje de mineralización inferior al 7%.

La presencia de Brij 30 en concentraciones de 20 y 40 mg/ml inhibió totalmente la mineralización del  $^{14}C$ -fenantreno. En cambio, estas concentraciones para Brij 35, mostraron un comportamiento muy diferente. Aunque la extensión en la que se produjo la mineralización fue ligeramente menor que en el caso del sistema control (44 % y 40 % para el Brij 35 a 20 y 40 mg/ml respectivamente frente al 52 % del control), las tasas máximas de mineralización fueron muy superiores (tabla IV.19).

Resultados y discusión

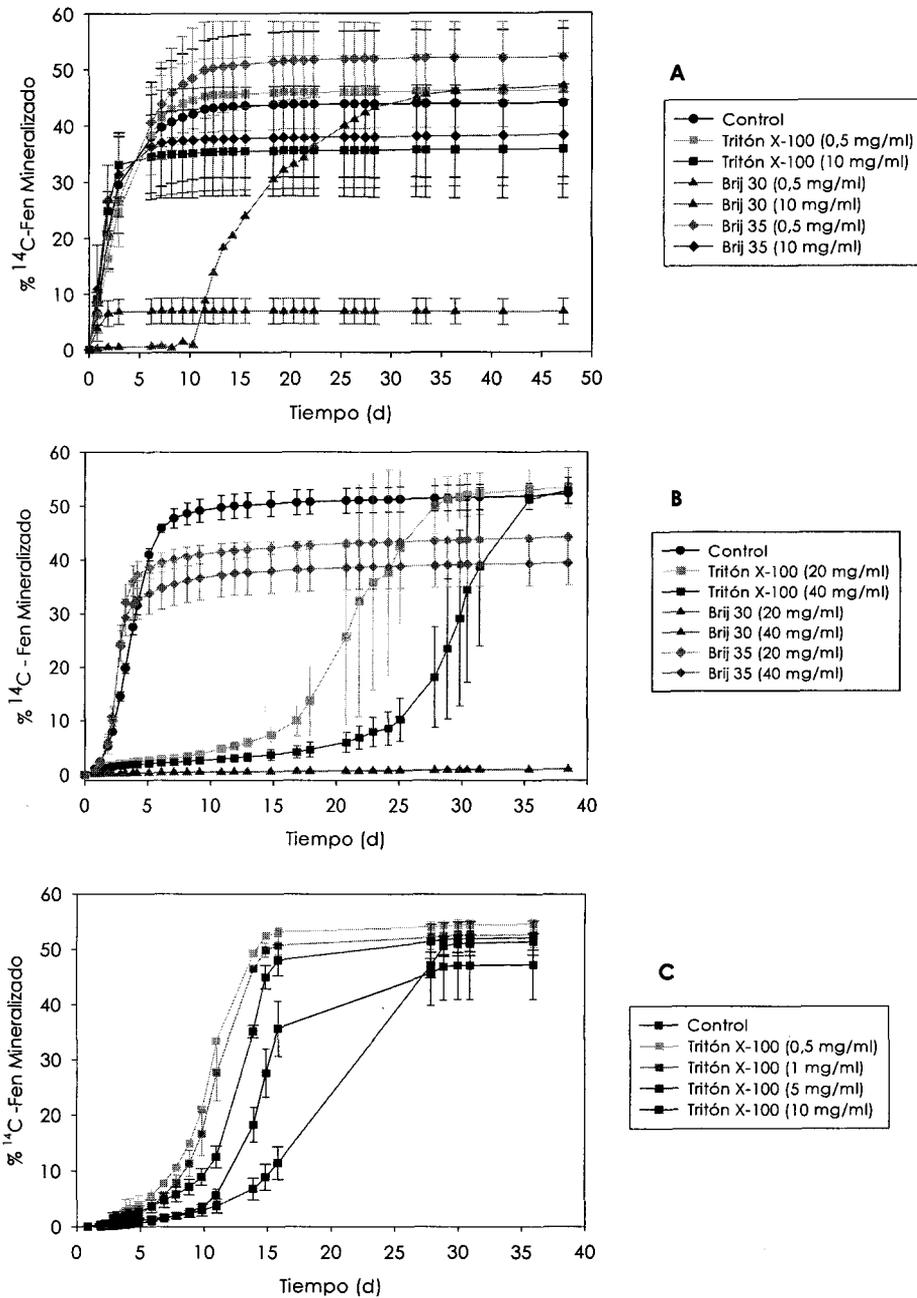


Figura IV.17 Mineralización de fenantreno en el suelo B por la bacteria VM 552 en presencia de los tensioactivos Brij 30, Brij 35 y Tritón X-100 en concentraciones superiores a sus CMC.

**Tabla IV.19** Valores de tensión superficial y tasas máximas de mineralización a tiempo final de los ensayos. (1) Medidas de muestras por duplicado con desviaciones estándar menores al 0,1 %.

Tratamiento	Tensión superficial (dyn/cm) (1)	Tasa máxima de mineralización (mg kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Control A	93,80	132,16 ± 37,15
Tritón X-100 (0,5 mg/ml)	51,95	106,62 ± 35,18
Tritón X-100 (10 mg/ml)	43,95	158,00 ± 3,28
Brij 30 (0,5 mg/ml)	87,30	78,00 ± 0,10
Brij 30 (10 mg/ml)	39,90	30,78 ± 1,14
Brij 35 (0,5 mg/ml)	66,95	105,38 ± 4,09
Brij 35 (10 mg/ml)	60,00	117,14 ± 2,06
Control B	89,90	124,51 ± 17,06
Tritón X-100 (20 mg/ml)	--	81,32 ± 10,97
Tritón X-100 (40 mg/ml)	--	75,30 ± 3,39
Brij 30 (20 mg/ml)	--	--
Brij 30 (40 mg/ml)	--	--
Brij 35 (20 mg/ml)	57,65	<b>261,64 ± 8,53</b>
Brij 35 (40 mg/ml)	57,75	<b>229,52 ± 6,96</b>
Control C	--	70,56 ± 10,66
Tritón X-100 (0,5 mg/ml)	--	115,28 ± 1,20
Tritón X-100 (1 mg/ml)	--	109,69 ± 6,43
Tritón X-100 (5 mg/ml)	--	108,34 ± 0,49
Tritón X-100 (10 mg/ml)	--	38,78 ± 0,40

Las medidas de tensión superficial, realizadas a tiempo final del ensayo para las concentraciones de 0,5 y 10 mg/ml, indicaron que los tres tensioactivos ensayados se encontraban en la fase acuosa en concentraciones inferiores a sus respectivas CMC<sub>MM</sub>, debido a que gran parte de ellos, más del 90 % en los casos del Tritón X-100 y del Brij 35, se encontraba adsorbida en el suelo (apartado IV.3.4). Los valores de tensión superficial, medidos en los sistemas con concentraciones de 20 y 40 mg/ml de los tensioactivos Tritón X-100 y Brij 35 confirmaban, que en posteriores ensayos, las concentraciones de tensioactivo empleadas deben ser de este orden de magnitud, para asegurar la presencia de micelas en la fase acuosa.

Los datos de tensión superficial, junto con los obtenidos en la mineralización del compuesto, sugieren que el efecto inhibitorio observado en la degradación

bacteriana del fenantreno, en presencia de Brij 30 parece estar relacionada con un fenómeno de toxicidad de la bacteria hacia el tensioactivo cuando este se encuentra en el sistema en concentraciones muy superiores a su  $CMC_{MM}$ . En la bibliografía, las causas más citadas de la inhibición en la mineralización bacteriana de HAPs, en presencia de altas concentraciones de tensioactivos son: (i) efecto tóxico (109); (ii) menor biodisponibilidad del compuesto al encontrarse en el interior de las micelas (46, 125); pudiendo verse afectada además por el tipo de tensioactivo utilizado (137) o (iii) interacciones del tensioactivo con componentes lipídicos estructurales de la membrana bacteriana así como reacción de las moléculas de tensioactivo con enzimas y otras proteínas esenciales para el apropiado funcionamiento de la bacteria. (70). Los tensioactivos no iónicos son en general los que menos actividad presentan contra las bacterias, siendo los más inofensivos aquellos que presenten junto con el grupo etoxilato una cadena más larga (69). A pesar de ello, algunos tensioactivos no iónicos, pueden solubilizar la bicapa lipídica de la membrana bacteriana, pudiendo incluso integrarse como parte de ella (51, 135). Los tensioactivos no iónicos forman complejos con proteínas que están más o menos ajustadas a la membrana bacteriana y que juegan un papel importante en el transporte de materiales a través de ella. Por ello, la formación de este tipo de complejos puede afectar al mecanismo de transporte de sustratos al interior bacteriano. En el caso de los tensioactivos no iónicos, la formación de complejos entre el tensioactivo y las proteínas bacterianas ocurre en concentraciones próximas o superiores a la CMC, posiblemente por la existencia de interacciones directas de las proteínas con las micelas (117). Otra posible causa de la toxicidad del Brij 30 hacia *Mycobacterium* podría estar relacionada con su coeficiente HLB (Hydrophil-Lipophil-Balance) característico de cada tensioactivo (tabla IV.1) (120). Este coeficiente mide la relación entre la parte hidrofílica y la parte hidrofóbica de la molécula de tensioactivo. De los tres tensioactivos ensayados, Brij 30 es el que presenta menor coeficiente HLB (9,7 en comparación con 13,5 de Tritón X-100 y 16,9 de Brij 35) y por tanto una mayor parte hidrofóbica en su molécula. Un aumento en la hidrofobicidad del tensioactivo podría provocar una mayor interacción con las enzimas y otras proteínas localizadas en la membrana hidrofóbica de la *Mycobacterium sp.* VM 552, inhibiendo la biodegradación de fenantreno

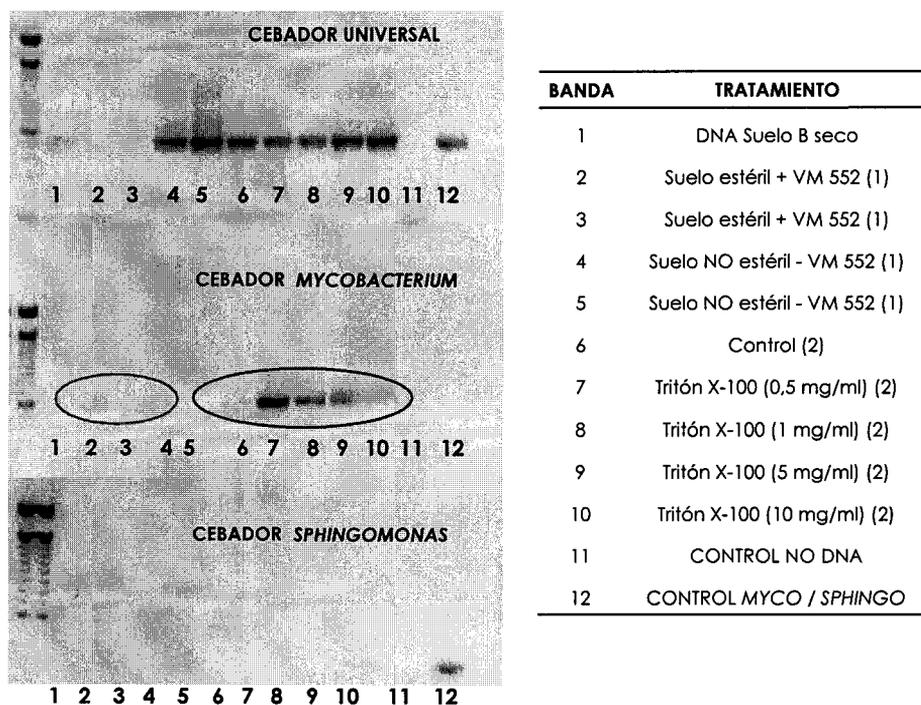
La mineralización de fenantreno fue muy distinta cuando se aumentó hasta 20 y 40 mg/ml la concentración de tensioactivo presente en la suspensión (figura IV.17.B). La mineralización máxima alcanzada en ausencia de tensioactivos después de 38 días fue del 52 %. La presencia en el sistema de 20 y 40 mg/ml de Tritón X-100, no mostró cambios en la extensión en la que se produjo la mineralización (53 % en ambos casos) a pesar de que esta comenzó tras una fase de latencia de 15 y 20 días respectivamente para cada una de las concentraciones ensayadas. Las tasas máximas de mineralización en los sistemas con diferentes concentraciones de Tritón X-100 (figura IV.17.C) fueron inferiores a las obtenidas para el control en los ensayos A y B. Sin embargo, en el ensayo C se observó que la velocidad de mineralización de fenantreno aumentó con el incremento de la concentración del tensioactivo. Este comportamiento no se dio para la concentración de 10 mg/ml, con lo cual se consideró esta concentración como el umbral de toxicidad de *Mycobacterium* al Tritón X-100 (tabla IV.19).

Las diferencias observadas en la mineralización de fenantreno en presencia de distintas concentraciones de Tritón X-100 (figura IV.17.C) podrían ser debidas principalmente a una reducción parcial en la biodisponibilidad del fenantreno al encontrarse pseudo-solubilizado en el interior de las micelas. Autores como Makkar and Rockne (83), estudiaron dicha reducción en la biodisponibilidad de los HAPs presentes en la fase micelar, concluyendo que a pesar de la disminución observada, los HAPs del interior de la micela pueden reabaster la fase acuosa a medida que los HAPs presentes en la fase acuosa vayan siendo biodegradados. Esta reducción de la biodisponibilidad también fue observada por otros autores (138). El hecho de que el sustrato en el interior de la micela no se encuentre biodisponible podría tener consecuencias importantes a la hora de aplicar tensioactivos en la remediación biológica de suelos.

Los análisis de la población microbiana por técnicas moleculares mostraron que los diferentes retrasos en el comienzo de la mineralización del fenantreno, para cada una de las concentraciones de Tritón X-100, fueron debidas a una fase de crecimiento de la población microbiana. Los análisis fueron realizados utilizando tres tipos de cebadores diferentes con el fin de poder estudiar la población general del suelo (cebador universal), así como poblaciones específicas (cebadores de *Mycobacterium* y *Sphingomonas*). Los análisis de la población bacteriana se llevaron a cabo cuando la mineralización del compuesto había alcanzado el máximo en tres de las cuatro concentraciones de Tritón X-100 ensayadas (16 días). Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.18.

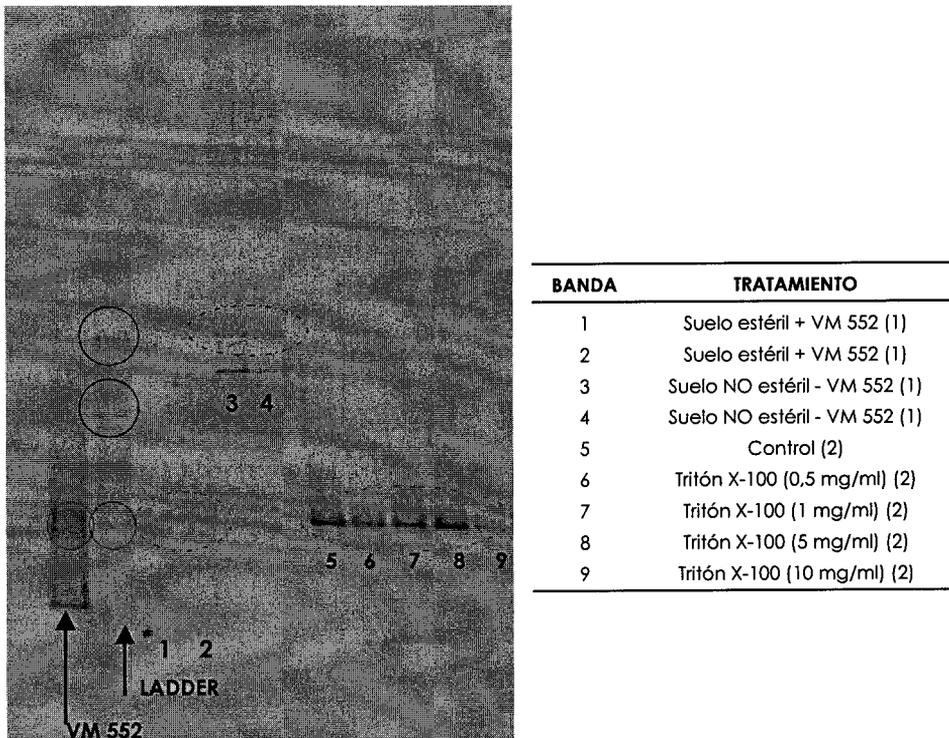
Las bandas obtenidas en la PCR con cebadores universales mostraron la presencia de población bacteriana en todos los sistemas ensayados. La intensidad de dichas bandas puso de manifiesto que la población presente en cada uno de los casos estudiados, se encontraba en concentración superior a  $10^7 - 10^6$  unidades formadoras de colonias (CFU) por gramo de suelo, valor en el que fue establecido el límite de detección de dicha técnica para muestras de suelos arcillosos. Las intensidades de las bandas 2 y 3 fueron casi inapreciables al encontrándose estas prácticamente en el límite de detección. Esto fue debido a que dichas bandas se obtuvieron exclusivamente por la población bacteriana inoculada en el suelo estéril a tiempo inicial del ensayo ( $10^6 - 10^7$  CFU/ml por matraz). La mayor intensidad de las bandas 6, 7, 8, 9 y 10 en comparación con las bandas 2 y 3 pudo ser debida a un aumento de la población bacteriana tras 16 días.

El análisis específico de la población de *Mycobacterium* confirmó el aumento de dicha población tras 16 días de la inoculación del sistema. El análisis por PCR con cebadores de *Mycobacterium* mostró bandas en todos los sistemas que habían sido inoculados con *Mycobacterium* sp. VM 552. Las bandas 2 y 3, al igual que en el caso del análisis con cebadores universales, mostraron una baja intensidad al encontrarse la población inoculada en el límite de detección de la técnica. Las bandas correspondientes a los tratamientos con Tritón X-100 mostraron intensidades diferentes entre ellas pero en todos los casos superiores a las de las bandas 2 y 3. Este hecho confirma que efectivamente, tras 16 días de tratamiento la población de *Mycobacterium* había crecido de manera significativa con respecto a la inoculada inicialmente (bandas 2 y 3) así como respecto al tratamiento control (banda 6).



**Figura IV.18** Análisis mediante PCR de la población de *Mycobacterium VM 552* en presencia de Tritón X-100. (1) Análisis a tiempo inicial del ensayo. (2) Análisis a los 16 días de la inoculación del sistema.

El aumento más significativo se obtuvo para la población bacteriana en el sistema con Tritón X-100 a 500  $\mu\text{g/ml}$  (banda 7). Se observó como el incremento en la concentración del tensioactivo provocó un menor aumento de la población inoculada (bandas 8, 9 y 10). Este hecho, junto con las curvas de mineralización obtenidas, confirma la existencia de un período de aclimatación de la bacteria al tensioactivo, el cual es mayor conforme aumenta la concentración del Tritón X-100 en la suspensión (figura IV.18.C) y tras el cual la bacteria VM 552 mineralizó el fenantreno a mayor velocidad que en ausencia de tensioactivo y por igual en todos los sistemas. Este período de adaptación de la bacteria al tensioactivo ha sido observado por otros autores. Prak y Pritchard (104) observaron que la mineralización de HAPs en fase acuosa ocurría con retraso en los sistemas en los que estaba presente el tensioactivo Tween 80 en altas concentraciones con respecto a los sistemas sin tensioactivo. El retraso era provocado por un efecto tóxico del tensioactivo en un primer período, tras el cuál, la población bacteriana se recuperó y procedió a la degradación de los HAPs en igual o mayor proporción que en ausencia de Tween 80.



**Figura IV.19** Análisis DGGE de la población de *Mycobacterium* sp. VM 552 en presencia de Tritón X-100. (1) Análisis a tiempo inicial del ensayo. (2) Análisis a los 16 días de la inoculación del sistema.

La técnica de PCR permite un análisis cuantitativo de la población bacteriana pero no cualitativo. Por ello, para el análisis molecular de la población específica de *Mycobacterium* sp. VM 552 se utilizó la técnica de DGGE con el fin de corroborar que la bacteria presente en los sistemas estudiados era la *Mycobacterium* inoculada. Para la obtención de una banda de control de la población de VM 552, se utilizó DNA extraído de un cultivo líquido puro de dicha bacteria. El Ladder utilizado contenía fragmentos de DNA de *Mycobacterium* (figura IV.19, círculo rojo) y de *Shingomonas* (figura IV.19, círculos azules). Las bandas 1 y 2, al igual que por PCR, confirmaron la presencia, a tiempo inicial del ensayo, de la población inoculada de *Mycobacterium*. Las bandas 3 y 4, de intensidad moderada, son debidas a la presencia en el suelo B sin esterilizar de bacterias del género *Shingomonas*. El hecho de que estas bandas (círculos azules discontinuos) no aparezcan en el resto de tratamientos, donde el suelo fue esterilizado mediante 3 ciclos de autoclavado, confirma que en los sistemas inoculados la única bacteria presente es la *Mycobacterium* sp. VM 552. Las bandas 5, 6, 7, 8 y 9, pertenecientes a los diferentes tratamientos con Tritón X-100, confirman los resultados obtenidos

anteriormente por PCR. Se observa como las bandas obtenidas coinciden en posición con el Ladder de *Mycobacterium* así como con la posición de las bandas características de la *Mycobacterium* sp. VM 552 (círculos rojos), confirmando que es dicha bacteria la única presente en los sistemas. De nuevo, el aumento en la intensidad de las bandas muestra el crecimiento bacteriano producido en los sistemas en los que se encontraba el tensioactivo Tritón X-100.

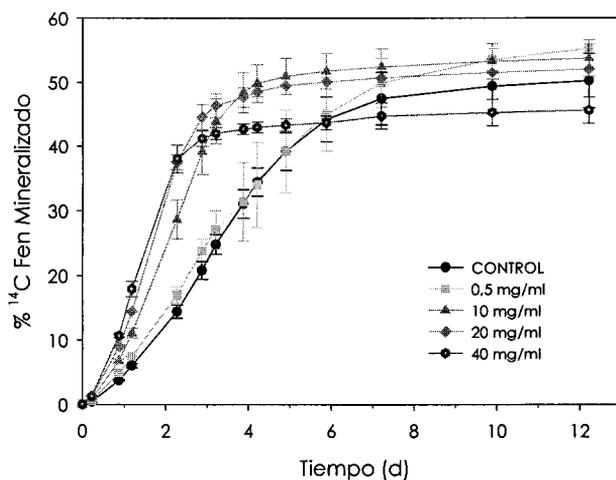
No son muy numerosas las referencias bibliográficas que hacen alusión a este comportamiento de la población bacteriana. Willumsen et al. (133), propusieron que la respuesta de la población bacteriana degradadora de HAPs frente a la presencia de tensioactivos era frecuentemente función del número de células empleadas en el experimento, encontrándose una proporción molar crítica de tensioactivo y bacteria que determina la mineralización óptima y por encima de la cuál las bacterias no son capaces de preservar su viabilidad ni su actividad. En la bibliografía existen pocas referencias a la relación entre la concentración de tensioactivo y la densidad de población bacteriana necesaria para conseguir un aumento considerable de la biodegradación de los HAPs. Van der Werf et al. (128), publicaron que la permeabilización de la membrana celular y la lisis bacteriana provocada por la presencia de Tritón X-100 en concentraciones superiores a su CMC dependía, en parte, de la proporción entre la concentración de tensioactivo y la densidad de población bacteriana. Este comportamiento podría ser debido a (i) un efecto en la biomasa (mayor número de bacterias degradarán mayor cantidad de sustrato) o (ii) una dilución del efecto tóxico causado por el tensioactivo en sí (menos tensioactivo por bacteria) o por el sustrato y/o la acumulación de sus metabolitos (menos sustrato por bacteria).

#### IV.6.2 INFLUENCIA DE BRIJ 35 EN LA BIODEGRADACIÓN DE HAPs EN SUELOS.

En base a la información obtenida en las secciones anteriores, seleccionamos el tensioactivo Brij 35 como el más adecuado para su aplicación en los ensayos de biodegradación. En dicha elección se ha considerado principalmente la falta de efectos tóxicos significativos sobre la población bacteriana responsable de la degradación de los HAPs, su efecto estimulador, así como su carácter claramente biodegradable. Por ello, realizamos un estudio más detallado sobre la influencia del tensioactivo Brij 35 en la población bacteriana inoculada, así como sobre la fracción de HAPs resistente a la degradación. Para ello, los ensayos fueron realizados en sistemas de suelo en suspensión estériles. Dichos sistemas fueron inoculados con *Mycobacterium* sp. VM 552. Se siguió la mineralización de <sup>14</sup>C-fenantreno, y de forma paralela la biodegradación del compuesto nativo en el suelo B mediante análisis por HPLC. Las concentraciones del tensioactivo Brij 35 ensayadas fueron en todos los casos superiores a su CMC<sub>MM</sub>. Las concentraciones de Brij 35 fueron de 0,5, 10, 20 y 40 mg/ml, ya que en los ensayos previos habían sido estas las que mostraron un aumento significativo de las tasas máximas de mineralización cuando el tensioactivo estaba en la suspensión en este rango.

La mineralización de fenantreno por *Mycobacterium* se produjo para cada una de las concentraciones de Brij 35 ensayadas en las suspensiones (figura IV.20). Las extensiones en las que se produjo la mineralización del compuesto, en cada uno de los tratamientos, no mostraban diferencias significativas (tabla IV.20). Aunque estas diferencias no fueron relevantes, los valores obtenidos en las tasas máximas de mineralización si fueron demostrativas de la influencia de los tensioactivos en la velocidad de biodegradación de los HAPs. Se observó que la velocidad de mineralización del fenantreno aumentó conforme incrementaba la concentración de Brij 35 en la suspensión duplicándose para las concentraciones más altas. Los datos mostraron claramente la mineralización del fenantreno solubilizado por el tensioactivo, aunque el compuesto se encontrara en el interior de la micela. Recientes trabajos (45, 47, 48), han demostrado que una fracción del contaminante solubilizado en el interior de la micela de algunos tensioactivos no iónicos, se encuentra directamente biodisponible. Esto es posible, debido a que el contaminante puede ser transferido directamente desde el núcleo de la micela hasta la bacteria sin ser transferido previamente a la fase acuosa.

Los valores de tensión superficial medidos en la fase acuosa a tiempo final del ensayo estuvieron en concordancia con los resultados obtenidos previamente sobre la adsorción del tensioactivo al suelo (apartado IV.3.4). A pesar de la fuerte adsorción de Brij 35 al suelo (90,5 %), la reducción observada en la tensión superficial de los sistemas en los que el Brij 35 se encontraba por encima de 0,5 mg/ml, indica que la forma del tensioactivo presente en la fase acuosa era la micelar.



**Fig IV.20** Mineralización de fenantreno por la bacteria VM 552 en presencia de diferentes concentraciones del tensioactivo Brij 35

**Tabla IV.20** Parámetros experimentales obtenidos en la mineralización de fenantreno por la bacteria VM 552 en presencia de diferentes concentraciones de Brij 35 (>CMC) tras 12 días. (1) Medidas de tensión superficial de la fase acuosa a tiempo final del ensayo.

Tratamiento con Brij 35	Mineralización máxima alcanzado (%)	Tasas máximas de mineralización (mg kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	Tensión superficial (dyn/cm) (1)
Control	50,26	121,99 ± 0,42	84,15 ± 2,76
0,5 mg/ml	55,30	109,36 ± 16,55	65,05 ± 0,07
10 mg/ml	53,78	199,25 ± 20,02	56,65 ± 0,35
20 mg/ml	52,02	<b>251,73 ± 8,61</b>	56,70 ± 0,28
40 mg/ml	45,63	<b>221,41 ± 13,24</b>	56,70 ± 0,14

Las fracciones resistentes a la biodegradación, tanto para fenantreno como para el resto de los HAPs presentes en el suelo B, fueron determinadas al final del ensayo. Los valores obtenidos son mostrados en la tabla IV.20. Las fracciones resistentes a biodegradación obtenidas para el control indican que, efectivamente, la bacteria inoculada es capaz de degradar los HAPs fenantreno, fluoranteno y pireno. En los tratamientos con diferentes concentraciones de Brij 35, estas fracciones resistentes fueron siendo menores conforme aumentaba la concentración del tensioactivo en la suspensión, llegando incluso a no ser detectados en el análisis por cromatografía líquida cuando la concentración del tensioactivo era igual o superior a 10 mg/ml. Estos resultados indican que *Mycobacterium sp. VM 552* fue capaz de degradar el/los compuesto/s desorbido/s a la fase acuosa como consecuencia de la pseudo-solubilización de los HAPs provocada por la presencia del tensioactivo en forma micelar (presencia confirmada por los valores de tensión superficial medidos en la fase acuosa, (tabla IV.20). La disminución en la concentración de los HAPs más pesados (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno y benzo(a)pireno) observada a tiempo final del ensayo en los sistemas con Brij 35, en concentración igual o superior a 10 mg/ml, fue atribuida a procesos de desorción de dichos compuestos en gran proporción hacia la fase acuosa como consecuencia de la presencia del tensioactivo y no debida a procesos de biodegradación. El análisis de la fase acuosa a tiempo final del ensayo, mediante cromatografía líquida, confirmó dicha hipótesis.

Las concentraciones de los HAPs más pesados permanecieron prácticamente constantes tras 12 días de ensayo. Según los resultados obtenidos en el apartado IV.5.2, *Mycobacterium sp. VM 552*, en ausencia de tensioactivos y bajo las mismas condiciones experimentales, fue capaz de biodegradar algunos de los HAPs más pesados, como benzo(a)antraceno y benzo(a)pireno posiblemente mediante procesos de cometabolismo (tabla IV.18). Estas diferencias observadas pueden ser explicadas en base al tiempo de duración del ensayo. Las fracciones de HAPs resistentes a la biodegradación mostradas en el apartado IV.5.2 fueron obtenidas tras 47 días, tiempo suficiente para que la bacteria cometabolizara dichos compuestos. En cambio, en este ensayo, 12 días no fue un tiempo suficiente para el desarrollo de la actividad cometabolica bacteriana para dichos HAPs pesados.

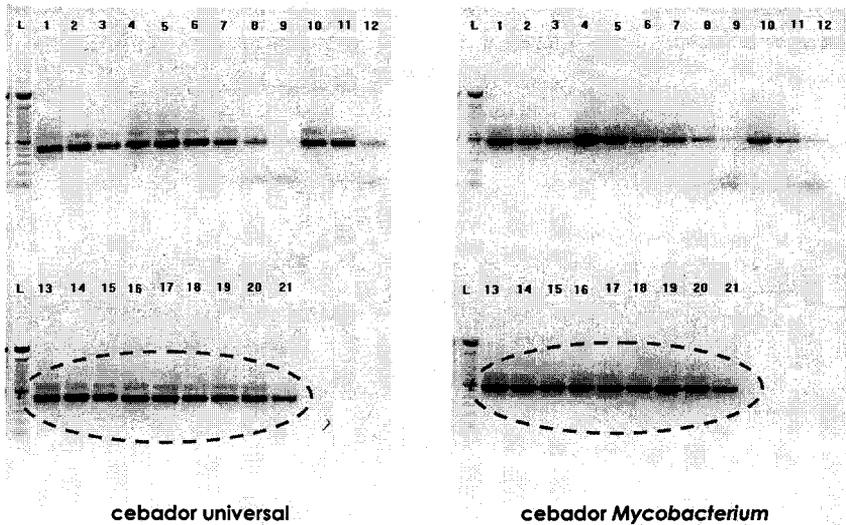
**Tabla IV.21** Fracciones de HAPs (mg /kg peso seco) resistentes a la biodegradación por la bacteria VM 552 en presencia de Brij 35. **a.** Concentraciones iniciales de HAPs en el suelo B autoclavado. **b.** balance de masas de los HAPs presentes en el suelo y en la fase acuosa. **c.** HAPs degradados por VM 552 en ausencia de tensioactivos (tabla III.9). n.d.: No detectado. LD: Flu: 2,68 mg/kg, Fen: 2,53 mg/kg, Flua: 2,60 mg/kg y Pir: 0,52 mg/kg suelo seco.

HAPs	Suelo B <sup>a</sup>	Control	Brij 35 0,5 mg/ml	Brij 35 10 mg/ml	Brij 35 20 mg/ml	Brij 35 40 mg/ml
Fluoreno <sup>c</sup>	219,77 ± 7,64	4,43	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Fenantreno <sup>c</sup></b>	<b>1230,67 ± 13,69</b>	<b>19,28 ± 3,46</b>	<b>9,41 ± 2,41</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>
Antraceno <sup>c</sup>	223,13 ± 4,49	88,97 ± 30,07	53,09 ± 7,00	33,74 ± 1,31	21,93 ± 3,13	18,02 ± 0,84
<b>Fluoranteno <sup>c</sup></b>	<b>866,57 ± 30,00</b>	<b>114,73 ± 30,69</b>	<b>74,13 ± 5,03</b>	<b>10,16 ± 1,70</b>	<b>7,81 ± 0,13</b>	<b>n.d.</b>
<b>Pireno <sup>c</sup></b>	<b>391,63 ± 35,49</b>	<b>88,64 ± 1,36</b>	<b>37,97 ± 0,59</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>
Benzo(a)antraceno <sup>c</sup>	136,01 ± 3,76	126,62 ± 9,07	132,67 ± 7,18	139,43 ± 4,93 <sup>b</sup>	145,90 ± 5,85 <sup>b</sup>	132,88 ± 1,29 <sup>b</sup>
Criseno	102,45 ± 3,57	103,80 ± 11,15	86,46 ± 14,46	109,32 ± 4,41 <sup>b</sup>	115,48 ± 4,93 <sup>b</sup>	111,10 ± 6,94 <sup>b</sup>
Benzo(b)fluoranteno	55,58 ± 1,47	56,03 ± 5,00	44,32 ± 6,80	51,13 ± 3,11 <sup>b</sup>	49,90 ± 0,54 <sup>b</sup>	53,95 ± 1,52 <sup>b</sup>
Benzo(k)fluoranteno	31,05 ± 1,43	35,54 ± 3,60	26,90 ± 2,60	30,63 ± 2,93 <sup>b</sup>	30,81 ± 1,22 <sup>b</sup>	23,83 <sup>b</sup>
Benzo(a)pireno <sup>c</sup>	21,99 ± 1,31	20,87 ± 1,32	14,19 ± 2,54	25,60 ± 1,75 <sup>b</sup>	21,52 ± 0,45 <sup>b</sup>	20,73 ± 2,14 <sup>b</sup>
Indeno (1,2,3-cd)pireno	13,40,67 ± 1,18	18,44 ± 0,08	14,69 ± 1,22	10,30 ± 2,79	8,85 ± 0,79	8,80 ± 2,43

Los análisis por técnicas moleculares de la población microbiana inoculada, mostraron variaciones significativas en la población de *Mycobacterium* sp. VM 552 durante la mineralización del fenantreno en presencia de Brij 35. Los análisis fueron realizados utilizando dos tipos de cebadores para la reacción de PCR, con el fin de poder estudiar tanto la población general del suelo (cebador universal) como la población inoculada (cebadores de *Mycobacterium*). Los análisis se realizaron cuando la mineralización del compuesto había alcanzado el máximo en tres de las cuatro concentraciones de Brij 35 ensayadas (4,2 días). Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.21. Las bandas obtenidas tanto para PCR con cebadores universales como con cebadores específicos de *Mycobacterium* mostraron, como cabía esperar, la presencia de población bacteriana en todos los sistemas ensayados. La intensidad de dichas bandas puso de manifiesto que la población presente en cada uno de los casos estudiados era superior a  $10^7 - 10^6$  unidades formadoras de colonias (CFU) por gramo de suelo, valor este del límite de detección de la técnica para muestras de suelos arcillosos. Las bandas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 (control A y B), en ambas PCR, fueron debidas exclusivamente a la población bacteriana inoculada en el suelo estéril a tiempo inicial del ensayo ( $D.O_{600\text{ nm}} = 0.905$ ;  $10^7 - 10^8$  CFU/ml en cada matraz).

El análisis específico de la población de *Mycobacterium* confirmó el aumento de la población tras 4,2 días de la inoculación del sistema. El análisis por PCR con cebadores de *Mycobacterium* mostró bandas en todos los sistemas que habían sido inoculados con VM 552. Las bandas obtenidas en los tratamientos con Brij 35 fueron mucho más intensas (bandas de la 10 a la 21) que las obtenidas en el control (bandas 7, 8 y 9), debido al crecimiento bacteriano producido en los sistemas con Brij 35. Este crecimiento es debido al aumento de sustrato en solución como consecuencia de su mayor desorción de la matriz del suelo por la presencia del tensioactivo en la suspensión. Debido a la gran intensidad de las bandas obtenidas fueron necesarias realizar diluciones con el fin de observar posibles diferencias entre los tratamientos. La pérdida de intensidad en las bandas desde la 7 a la 12 por dilución, permitieron comprobar que la población bacteriana presente en el control y en presencia de 0,5 mg/ml de Brij 35 era menor que para el resto de tratamientos con el tensioactivo. Las bandas desde la 10 a la 21, correspondientes a la población bacteriana presente en los sistemas con mayor concentración de Brij 35, confirmaron que efectivamente, a los 4,2 días de tratamiento, la población de *Mycobacterium* había crecido de manera significativa con respecto a la inoculada inicialmente (bandas de la 1 a la 6) y con respecto al control (bandas 7, 8 y 9). El aumento más significativo se obtuvo para la población bacteriana de los sistemas con Brij 35 en concentraciones de 10, 20 y 40 mg/ml (bandas de la 13 a la 21) donde la intensidad de las bandas no mostraba diferencias significativas a pesar de la dilución.

Resultados y discusión



BANDA	TRATAMIENTO
L	100 bp DNA
1	Control A estéril + VM 552 (1)
2	Control A estéril + VM 552. Dilución 1:10 (1)
3	Control A estéril + VM 552. Dilución 1:100 (1)
4	Control B estéril + VM 552 (1)
5	Control B estéril + VM 552. Dilución 1:10 (1)
6	Control B estéril + VM 552. Dilución 1:100 (1)
7	Control (2)
8	Control. Dilución 1:10 (2)
9	Control. Dilución 1:100 (2)
10	Brij 35 (0,5 mg/ml) (2)
11	Brij 35 (0,5 mg/ml). Dilución 1:10 (2)
12	Brij 35 (0,5 mg/ml). Dilución 1:100 (2)
13	Brij 35 (10 mg/ml) (2)
14	Brij 35 (10 mg/ml). Dilución 1:10 (2)
15	Brij 35 (10 mg/ml). Dilución 1:100 (2)
16	Brij 35 (20 mg/ml) (2)
17	Brij 35 (20 mg/ml). Dilución 1:10 (2)
18	Brij 35 (20 mg/ml). Dilución 1:100 (2)
19	Brij 35 (40 mg/ml) (2)
20	Brij 35 (40 mg/ml). Dilución 1:10 (2)
21	Brij 35 (40 mg/ml). Dilución 1:100 (2)

**Figura IV.21** Análisis de la población de *Mycobacterium* VM 552 en presencia de Brij 35 mediante PCR. (1) Análisis a tiempo inicial del ensayo. (2) Análisis a los 4,2 días de la inoculación del sistema con *Mycobacterium*.

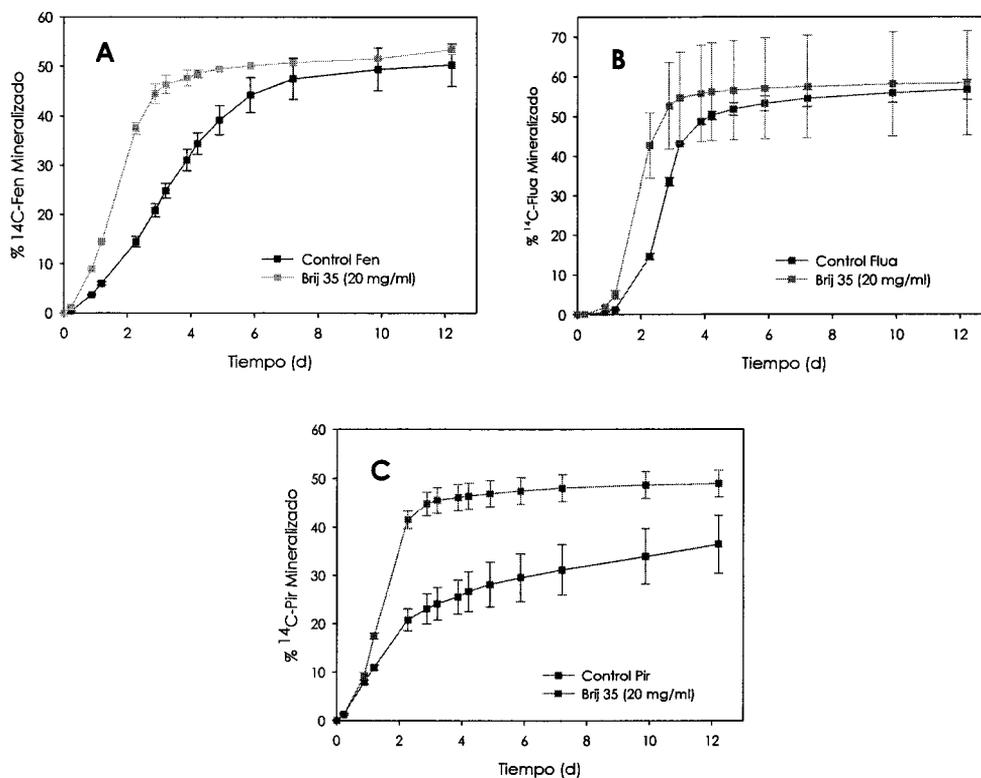
### IV.6.3 BIODISPONIBILIDAD DE HAPs EN PRESENCIA DE BRIJ 35.

Los resultados obtenidos en los ensayos anteriores muestran una clara reducción en la fracción de los HAPs fenantreno, fluoranteno y pireno, resistentes a la biodegradación por *Mycobacterium sp. VM 552*. En base a la información aportada por dichos ensayos, se realizó un estudio sobre la influencia del Brij 35 en el aumento en la biodisponibilidad de dichos compuestos. Para ello se utilizaron, al igual que en los ensayos anteriores, suspensiones de suelo estéril inoculadas con *Mycobacterium sp. VM 552*. La concentración de Brij 35 ensayada fue de 20 mg/ml ya que dicha concentración, además de no mostrar efectos tóxicos sobre la población de *Mycobacterium*, fue con la que se obtuvo mayor tasa de mineralización para fenantreno (apartado IV.6.2, tabla IV.21).

En la figura IV.22, se muestran las curvas de mineralización de <sup>14</sup>C-HAPs obtenidas para fenantreno, fluoranteno y pireno en presencia del tensioactivo Brij 35 tras 12 días de ensayo. La mineralización de los compuestos marcados ocurrió en todos los casos sin fase de latencia. En los casos de fenantreno y fluoranteno (figuras IV.22.A y IV.22.B), la extensión alcanzada en la mineralización fue muy similar, tanto en ausencia como en presencia del tensioactivo. En cambio, dicha extensión en el caso de la mineralización de pireno (figura IV.22.C) fue superior en presencia de Brij 35 (tabla IV.21). El incremento en la mineralización del pireno podría deberse a la falta de limitaciones en la biodisponibilidad del compuesto por la presencia de una elevada concentración de Brij 35 además de un aumento en el coeficiente de partición de este HAP en el interior de las micelas. La adsorción de pireno a los suelos es debida, principalmente, a su hidrofobicidad y mantenida en parte por la fracción de carbono orgánico presente en el suelo. Debido a esta hidrofobicidad, el pireno tiende a concentrarse en el interior del núcleo hidrofóbico de las micelas, aumentando su coeficiente de reparto en la fase acuosa y por tanto su biodisponibilidad (119). Este comportamiento también ha sido observado por otros autores. Guha et al. (48) y Mukerjee et al. (91), estudiaron la solubilización de mezclas de HAPs en presencia de tensioactivos no iónicos observando que el incremento en el coeficiente de partición puede ser explicado por el particionamiento del compuesto solubilizado en el interior del núcleo de la micela. Esta situación provoca cambios en la energía libre del sistema, aumentando el volumen del núcleo micelar permitiendo una mayor solubilización potencial del compuesto.

Las tasas máximas de mineralización de los sistemas con Brij 35 fueron superiores, para los tres compuestos, a las alcanzadas por los controles. Las diferencias más significativas se obtuvieron en los casos de fenantreno y pireno, donde la velocidad de mineralización de los compuestos diana en presencia de Brij 35 fue el doble a la obtenida en los sistemas con ausencia del tensioactivo.

## Resultados y discusión



**Figura IV.22** Mineralización de fenantreno, fluoranteno y pireno por *Mycobacterium* sp. VM 552 en presencia de 20 mg/ml de Brij 35.

**Tabla IV.22** Parámetros experimentales obtenidos en la mineralización de fenantreno, fluoranteno y pireno por la bacteria VM 552 en presencia de 20 mg/ml de Brij 35 (> CMC) tras 12,2 días de tratamiento.

Tratamiento con Brij 35	Mineralización máxima alcanzada (%)	Tasas máximas de mineralización (mg kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Control Fen	50,26	121,99 ± 0,42
Fen +Brij 35 20 mg/ml	52,02	251,73 ± 8,61
Control Flua	56,72	251,18 ± 23,34
Flua +Brij 35 20 mg/ml	58,34	301,73 ± 57,02
Control Pir	36,48	40,55 ± 0,14
Pir +Brij 35 20 mg/ml	48,95	90,78 ± 2,99

Las fracciones resistentes a la biodegradación fueron determinadas al final del ensayo (tabla IV.22). En el análisis por cromatografía líquida, ni fenantreno ni pireno fueron detectados, mientras que fluoranteno presentó una fracción resistente a la biodegradación similar a la obtenida en el ensayo anterior (tabla IV.21). Ninguno de los tres compuestos se detectaron en fase acuosa, confirmándose que la reducción observada en el suelo fue debida a procesos de biodegradación y no a procesos de desorción por la presencia del tensioactivo. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en el estudio de las cinéticas de desorción de los HAPs en presencia de tensioactivos (apartado IV.4.4), donde fenantreno y pireno fueron desorbidos a la fase acuosa en su totalidad por la presencia de 20 mg/ml de Brij 35 tras una semana de contacto mientras que en el caso del fluoranteno la desorción fue de 99,8 %. El hecho de que la totalidad del fenantreno y del pireno, hayan sido biodegradados por *Mycobacterium sp. VM 552* confirma que efectivamente el paso limitante en la biodegradación de los HAPs es la baja biodisponibilidad de dichos compuestos y que la presencia de tensioactivos no tóxicos para la población microbiana encargada de la degradación y en concentraciones superiores a su  $CMC_{MM}$ , es una buena herramienta para aumentar el reparto de dichos compuestos en fase acuosa, facilitando así su biodegradación.

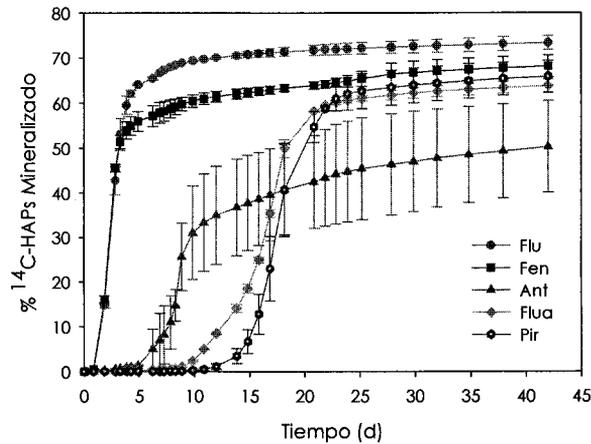
#### **IV.6.4 INFLUENCIA DE BRIJ 35 EN LA CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE LA POBLACIÓN MICROBIANA DEL SUELO.**

La aplicación de tensioactivos a sistemas modelos inoculados con una estirpe representativa degradadora de HAPs de tres y cuatro anillos, ha mostrado una reducción significativa de la fracción de HAPs resistentes a la biodegradación. Sin embargo, los sistemas reales sometidos a biorremediación hacen uso de las capacidades catabólicas de la población bacteriana autóctona presente en los suelos. La aplicación de tensioactivos en la remediación de suelos contaminados puede influir en la capacidad de degradación de la población autóctona. Por ello, el estudio de la biodegradación de los HAPs presentes en el suelo B por las bacterias autóctonas en presencia del tensioactivo Brij 35 se llevó a cabo en sistemas de suelo en suspensión en la misma proporción suelo-fase acuosa que la utilizada en los ensayos previos de desorción con tenax (apartado IV.4) y en los ensayos de biodegradación de la población autóctona en ausencia de tensioactivos (apartado IV.5.1). Para ello se siguió, de forma paralela, la mineralización de los cinco HAPs diana (fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno) marcados con  $^{14}\text{C}$ , así como su desaparición a lo largo del tiempo mediante medidas por HPLC al final del ensayo. El seguimiento de la biodegradación se extendió además a los cinco HAPs pesados benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno y benzo(a)pireno.

Se siguió la mineralización de los HAPs diana durante 42 días, tiempo similar al empleado en la mineralización por la población autóctona. El tensioactivo ensayado fue Brij 35 en una concentración de 20 mg/ml (figura IV.23). La elección del tensioactivo y de su concentración se realizó en base a los resultados obtenidos en los ensayos de desorción (apartado IV.4.4), así como en los ensayos de biodegradación del suelo B inoculado en presencia de dicho tensioactivo (apartado IV.6.2. y IV.6.3).

La figura IV.23, muestra las curvas de mineralización obtenidas al representar el porcentaje acumulativo de  $^{14}\text{C}$ -HAPs mineralizado frente al tiempo. La mineralización de los cinco HAPs diana se produjo en orden secuencial de acuerdo con el aumento de peso molecular del compuesto. Este comportamiento de la población autóctona en presencia de Brij 35 fue similar al seguido por dicha población en ausencia de tensioactivo. En ambos casos, las bacterias autóctonas degradaron en primer lugar aquellos HAPs de estructura molecular más simple como son fluoreno, fenantreno y antraceno, de 3 anillos. La mineralización máxima alcanzada fue 73,3 % para fluoreno, 68,1 % para fenantreno y 50,3 % para antraceno en un periodo total de 42 días.

A continuación, fueron mineralizados aquellos HAPs con mayor número de anillos en sus moléculas (fluoranteno y pireno con 4 anillos) tras una fase de latencia de 10 y 14 días respectivamente. La mineralización máxima alcanzada para cada uno de ellos fue de 62,7 % y 65,8 % siendo estos valores superiores a los obtenidos en los sistemas con ausencia de tensioactivo (apartado IV.5.1, tabla IV 16).



**Figura IV.23** Mineralización de HAPs por las bacterias autóctonas del suelo B en presencia de 20 mg/ml de Brij 35.

**Tabla IV.23** Porcentaje de HAPs mineralizados por las bacterias autóctonas del suelo B y tasas máximas de dicha mineralización, en ausencia y en presencia del tensioactivo Brij 35 (20 mg/ml).

HAPs	% Mineralizado		Tasa máxima de mineralización (mg kg <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	
	SIN Brij 35	CON Brij 35	SIN Brij 35	CON Brij 35
Fluoreno	75,3	73,3	63,22 ± 2,19	63,07 ± 1,29
Fenantreno	59,7	68,1	170,32 ± 32,15	280,03 ± 8,92
Antraceno	56,4	50,3	19,49 ± 2,04	26,05 ± 17,37
Fluoranteno	47,2	63,7	45,64 ± 3,72	72,91 ± 5,90
Pireno	52,9	65,8	21,28 ± 5,69	36,05 ± 5,13

Las tasas máximas de mineralización obtenidas en presencia de Brij 35 mostraron un incremento significativo con respecto a las obtenidas en ausencia de este, debido al aumento en la biodisponibilidad de los HAPs en la fase acuosa por la presencia del tensioactivo. Los aumentos más relevantes fueron para fenantreno y fluoranteno. Las fracciones de HAPs resistentes a la biodegradación fueron determinadas a tiempo final del ensayo. Se analizó tanto la fracción de HAPs presente en el suelo como resultado de la biodegradación, como la fracción presente en la fase acuosa resultante de la desorción por la presencia del tensioactivo. Los valores de tensión superficial medidos en la fase acuosa al final del ensayo ( $58,9 \pm 0,7$  dyn/cm), confirmaron que era la forma monomérica del tensioactivo la que se encontraba presente en el sistema al ser la tensión superficial mayor que la correspondiente a la CMC<sub>suelo</sub> con Brij 35 (figura IV.4.B). La reducción

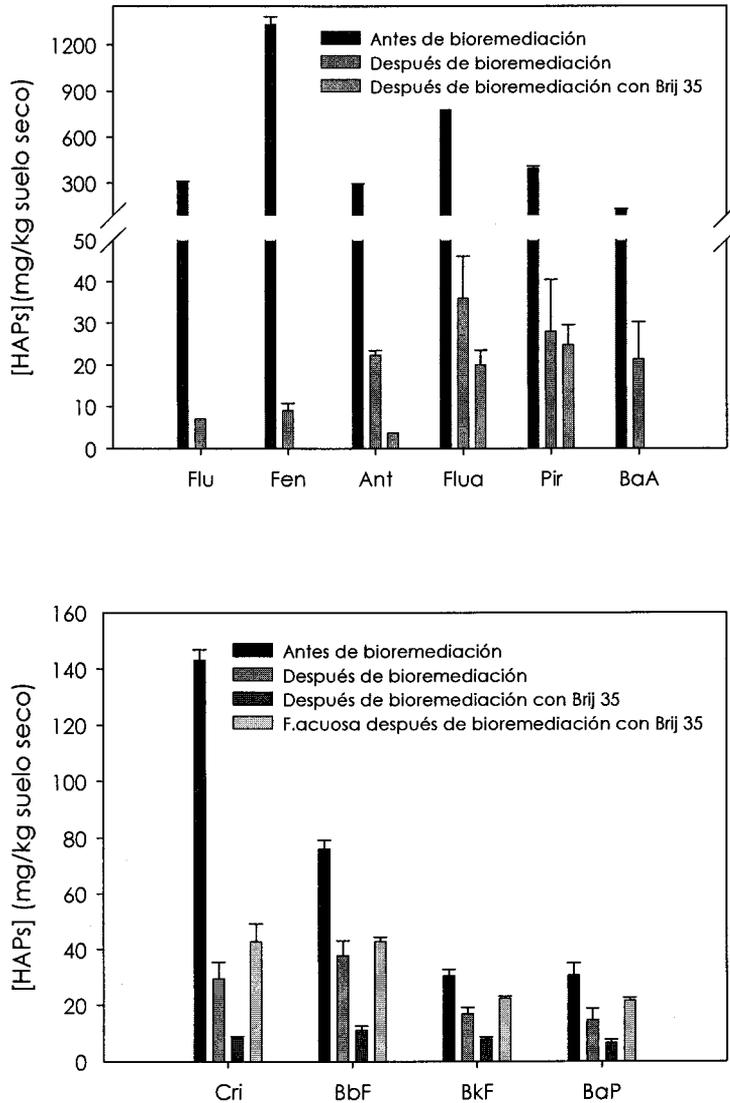
en la concentración del tensioactivo observada podría ser debida a la presencia en el suelo de estirpes autóctonas capaces de biodegradar Brij 35. Esta reducción no se produjo en los sistemas inoculados con *Mycobacterium sp.* VM 552 porque dichos sistemas fueron esterilizados para el estudio únicamente del comportamiento de la población inoculada. La reducción en la concentración de Brij 35 está de acuerdo con estudios recientes donde se ha comprobado mediante respirometría que tensioactivos no iónicos, tales como Tween 80, Tritón X-100, y Brij 30 (alquiletoxilato de serie homóloga a la de Brij 35), pueden ser utilizados por los microorganismos del suelo como única fuente de carbono y que por tanto pueden ser considerados biodegradables (65, 103).

**Tabla IV.24** Fracciones de HAPs resistentes a la biodegradación(mg/kg peso seco) por las bacterias autóctonas del suelo B en ausencia y en presencia del tensioactivo Brij 35 (20 mg/ml). Desviaciones estándar de muestras por duplicado. a: balance de masas de los HAPs presentes en el suelo y en la fase acuosa. n.d.: No detectados, LD: Flu 2,30 mg/kg; Fen 2,14 mg/kg y BaA 2,44 mg/kg suelo seco.

HAPs	Antes Bioremediación	Después Bioremediación	Después Bioremediación con Brij 35
Fluoreno	219,77 ± 7,64	7,076	n.d.
Fenantreno	1230,67 ± 13,69	9,04 ± 1,75	n.d.
Antraceno	223,13 ± 4,49	22,37 ± 1,08	3,71
Fluoranteno	866,57 ± 30,00	44,61 ± 3,06	20,03 ± 3,44
Pireno	391,63 ± 35,49	17,91 ± 0,04	24,72 ± 4,82
Benzo(a)antraceno	136,01 ± 3,76	21,37 ± 8,79	n.d.
Criseno	102,45 ± 3,57	32,09 ± 3,20	51,00 ± 0,49
Benzo(b)fluoranteno	55,58 ± 1,47	35,28 ± 1,34	52,72 ± 1,44
Benzo(k)fluoranteno	31,05 ± 1,43	16,71 ± 2,35	30,02 ± 0,88
Benzo(a)pireno	21,99 ± 1,31	16,59 ± 1,69	28,02 ± 1,17

Los resultados muestran una reducción significativa en las fracciones de los HAPs más ligeros resistentes a la biodegradación en presencia de Brij 35 con respecto a las obtenidas en sistemas en ausencia del tensioactivo (tabla IV.24 y figura IV.24). Las disminuciones más relevantes se obtuvieron para fluoreno y fenantreno llegando estos compuestos a no ser detectados en el análisis por cromatografía líquida. Esta reducción podría ser debida a que la población autóctona del suelo es capaz de degradar la totalidad del compuesto desorbido desde el suelo hasta la fase acuosa, hecho que según los resultados obtenidos en el apartado IV.4.4, ocurre en una proporción del 100% para fluoreno y fenantreno cuando el tensioactivo Brij 35 se encuentra en la suspensión a una concentración de 20 mg/ml. Una situación semejante se dió en el caso del benzo(a)antraceno. A pesar de ser uno de los HAPs más pesado posee una solubilidad en fase acuosa superior a la del resto de los hidrocarburos pesados (tabla I.2). Probablemente, la presencia del tensioactivo,

incrementó su concentración en fase acuosa, aumentando su biodisponibilidad y por tanto su biodegradación.



**Figura IV.24** Fracciones resistentes de HAPs a la biodegradación por las bacterias autóctonas del suelo B en presencia y en ausencia de Brij 35 (20 mg/ml).

En el caso de los HAPs más pesados, podría pensarse que la reducción observada en las fracciones resistentes es también producida por biodegradación. Sin embargo, los análisis de la fase acuosa al final del ensayo mostraron la presencia de los HAPs criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno y benzo(a)pireno, poniendo de manifiesto que la reducción en la fracción resistente a la biodegradación observada no había sido obtenida únicamente como resultado del proceso de degradación bacteriana de los compuestos sino también como consecuencia de procesos de desorción por la presencia del tensioactivo (figura IV.24). El hecho de que estos compuestos no fueran biodegradados en mayor proporción, a pesar de encontrarse biodisponibles en la fase acuosa, podría deberse a un efecto tóxico del Brij 35 en esta concentración sobre la población bacteriana autóctona responsable de la degradación de los HAPs pesados, a la baja biodisponibilidad de estos compuestos en el interior de las micelas (45, 79) o bien que el aumento en la velocidad de biodegradación de los HAPs más ligeros, debida a la presencia del Brij 35, no fuera tiempo suficiente para que la población bacteriana produjera las enzimas necesarias para la degradación, vía cometabolismo de los HAPs más pesados, o por agotamiento de los sustratos primarios (HAPs más ligeros) necesarios para el desarrollo de dicho proceso. Todas estas posibles situaciones confirman, que la fracción resistente a biodegradación de los HAPs más pesados obtenida en suspensiones en ausencia de Brij 35, es debida únicamente a procesos de cometabolismo.

## IV.7 INFLUENCIA DE LOS TENSIOSACTIVOS EN LA FRACCIÓN DE HAPs RESISTENTE A BIODEGRADACIÓN.

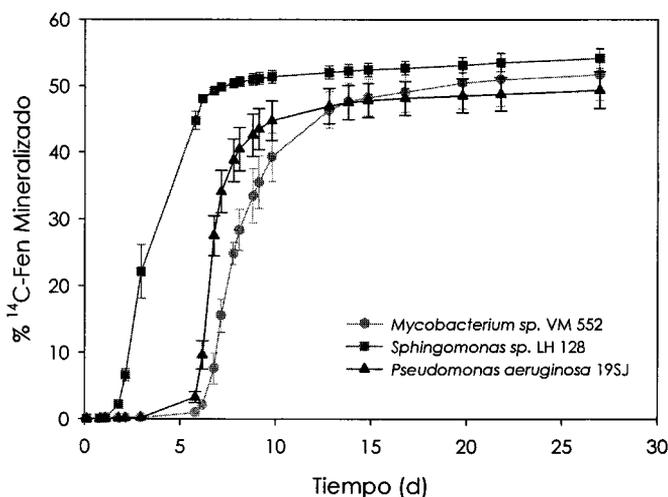
### IV.7.1 BIODEGRADACIÓN DE HAPs EN SUELOS CON FRACCIÓN RESISTENTE.

Los ensayos de biodegradación realizados anteriormente con suspensiones en ausencia de tensioactivos, muestran como mediante la inoculación con estirpes degradadoras específicas de HAPs, así como la estimulación de la propia población bacteriana del suelo fueron procedimientos donde las bacterias no fueron capaces de degradar los contaminantes en su totalidad. La presencia de una fracción resistente de HAPs a la biodegradación, como consecuencia de la limitada biodisponibilidad de los compuestos, plantea la necesidad de estudiar la influencia de la población bacteriana inoculada responsable de la degradación sobre dicha fracción resistente.

Para ello se siguió la mineralización de  $^{14}\text{C}$ -fenantreno en suspensiones estériles de suelo B1 e inoculadas con diferentes estirpes, todas ellas representativas de bacterias degradadoras de HAPs en suelos. Las estirpes ensayadas fueron, *Mycobacterium* sp. VM 552, *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ y *Sphingomonas* sp. LH 128 todas ellas precultivadas en fenantreno. La elección de fenantreno marcado como sustrato para el seguimiento de la mineralización fue hecha en base a que las tres estirpes seleccionadas eran capaces de utilizar este compuesto como fuente de carbono.

Como puede observarse en la figura IV.25, la mineralización de fenantreno fue diferente para cada una de las estirpes inoculadas, observándose la aparición de una fase de latencia de 6 días en los sistemas inoculados con *Mycobacterium* y *Pseudomonas aeruginosa*. Aunque los tres sistemas fueron inoculados con igual número de bacterias ( $10^6$  CFU/ml), la aparición de la fase de latencia podría ser explicada de acuerdo a los diferentes mecanismos empleados por las estirpes ensayadas para aumentar la biodisponibilidad del sustrato. Las estirpes del género *Mycobacterium* presentan gran capacidad de adhesión al sustrato y *Pseudomonas* de producción de biosurfactantes. Sin embargo, *Sphingomonas* es la estirpe que presenta mayor afinidad por el sustrato (131).

A pesar de que la mineralización máxima de fenantreno fue muy similar para cada una de las estirpes (51,7 % para *Mycobacterium*, 54,2 % para *Sphingomonas* y 49.4 % para *Pseudomonas*), las tasas máximas de mineralización del compuesto sí presentaron diferencias significativas, alcanzándose la mayor velocidad de mineralización en los sistemas inoculados con la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* 19 SJ (tabla IV.25).



**Figura IV.25** Mineralización de fenantreno en suspensiones del suelo B1 por diferentes estirpes bacterianas.

**Tabla IV.25** Tasas máximas de mineralización ( $\text{mg kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) y fracciones de fenantreno resistentes a la biodegradación ( $\text{mg/kg}$  peso seco) tras 27 días de la inoculación con diferentes estirpes bacterianas.

Bacteria	Tasas máximas de mineralización	[Fen] Resistente a biodegradación
<i>Mycobacterium</i> sp. VM 552	$28,96 \pm 5,01$	$13,42 \pm 3,14$
<i>Sphingomonas</i> sp. LH 128	$28,18 \pm 5,29$	$8,54 \pm 0,21$
<i>Pseudomona Aeruginosa</i> 19 SJ	$37,65 \pm 2,90$	$13,79 \pm 0,20$

Las diferencias observadas en la velocidad de mineralización del fenantreno en los sistemas inoculados con *Pseudomona Aeruginosa* podrían deberse a que dicha bacteria es capaz de producir tensioactivos naturales (rhamnolípidos) como mecanismo para aumentar la biodisponibilidad del sustrato. Estudios previos llevados a cabo por García-Junco et al. (40), demostraron que dicha bacteria era capaz de excretar rhamnolípidos cuando crecía en presencia de fenantreno como única fuente de carbono, incrementando la proporción en solución de dicho compuesto. A pesar de las diferencias observadas en la velocidad de mineralización del compuesto, las fracciones resistentes a biodegradación de fenantreno, no mostraron diferencias significativas tras 27 días. Estas fracciones fueron además del mismo orden de magnitud que las obtenidas en los ensayos de biodegradación de los HAPs del suelo B tanto por las bacterias autóctonas de dicho suelo (apartado IV.5.1) como en los sistemas inoculados con *Mycobacterium*

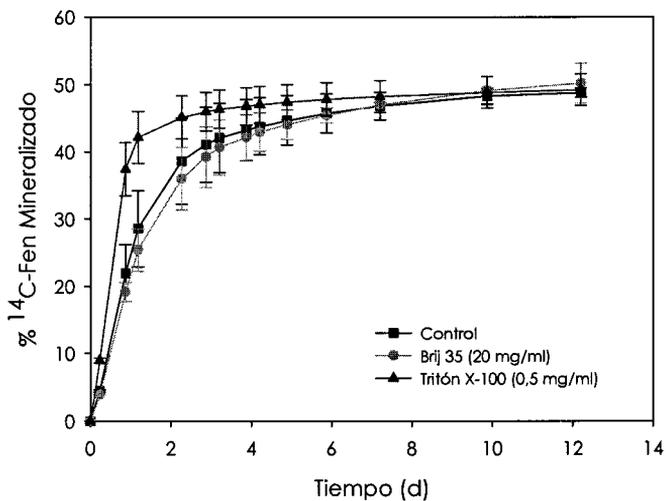
sp. VM 552 (apartado IV.5.2). Debido a que no existen diferencias significativas en las fracciones resistentes de los diferentes sistemas y a los resultados obtenidos en los estudios previos del suelo B, los ensayos con el suelo B1 inoculado serán realizados con la estirpe *Mycobacterium* sp. VM 552, ya que esta bacteria es capaz de degradar tres HAPs.

#### **IV.7.2 INFLUENCIA DE LOS TENSOACTIVOS EN LA FRACCIÓN RESISTENTE A BIODEGRADACIÓN.**

Los resultados obtenidos en el apartado anterior muestran que la utilización de estirpes degradadoras específicas de HAPs y con mecanismos capaces de aumentar la biodisponibilidad del contaminante, no resulta una herramienta eficiente para la reducción de la fracción de contaminante resistente a la biodegradación. Por ello, y teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos en este trabajo de investigación, se estudió la aplicación de tensioactivos en suelos que presentan fracción de HAPs resistentes a la degradación bacteriana.

Para dicho estudio se siguió la mineralización de  $^{14}\text{C}$ -fenantreno en suspensiones de suelo B1 estériles e inoculadas con *Mycobacterium* sp. VM 552. Se ensayaron los tensioactivos Tritón X-100 y Brij 35 en concentraciones de 0,5 y 20 mg/ml respectivamente, ya que fueron estas las que presentaron mayores tasas de mineralización en los ensayos realizados anteriormente con el suelo B (apartados IV.6.1. y IV.6.2).

La mineralización de fenantreno por *Mycobacterium* se produjo para cada uno de los tensioactivos ensayados en las suspensiones sin fase de latencia (figura IV.26). Las extensiones en las que se produjo la mineralización del compuesto, en cada uno de los tratamientos, no mostraban diferencias significativas (tabla IV.26). Aunque estas diferencias no fueron relevantes, los valores obtenidos en las tasas máximas de mineralización si fueron demostrativas de la influencia de los diferentes tensioactivos en la velocidad de biodegradación de los HAPs. Esta diferencia pudo ser debida a un menor efecto tóxico del tensioactivo Tritón X-100 sobre la bacteria inoculada, al encontrarse éste en una concentración mucho menor que la ensayada para Brij 35. Además, el elevado porcentaje en el que Tritón X-100 se adsorbe en el suelo hace que su concentración en fase acuosa sea aún menor. Los valores de tensión superficial medidos en la fase acuosa al final del ensayo confirmaron que la concentración de Tritón X-100 en dicha fase era menor al valor de tensión correspondiente a su  $\text{CMC}_{\text{MM}}$  (tabla IV.1) y que por tanto en la fase acuosa únicamente se encontraba presente la forma monomérica del tensioactivo. Las fracciones de HAPs resistentes a la biodegradación por VM 552 en los distintos tratamientos mostraron diferencias muy significativas (tabla IV.27).



**Figura IV.26** Mineralización de fenantreno en el suelo B1 por *Mycobacterium* sp. VM 552 en presencia de los tensioactivos Tritón X-100 y Brij 35.

**Tabla IV.26** Parámetros experimentales obtenidos en la mineralización de fenantreno por la bacteria VM 552 en el suelo B1 en presencia de Tritón X-100 y Brij 35 tras 12 días. (1) Medidas de tensión superficial de la fase acuosa a tiempo final del ensayo.

Tratamiento	Mineralización máxima alcanzado (%)	Tasas máximas de mineralización ( $\text{mg kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ )	Tensión superficial ( $\text{dyn/cm}$ ) (1)
Control	48,77	$39,26 \pm 8,93$	$78,70 \pm 3,70$
Tritón X-100 (0,5 mg/ml)	50,18	$66,32 \pm 7,50$	$48,00 \pm 0,20$
Brij 35 (20 mg/ml)	49,23	$34,84 \pm 4,76$	$56,70 \pm 0,10$

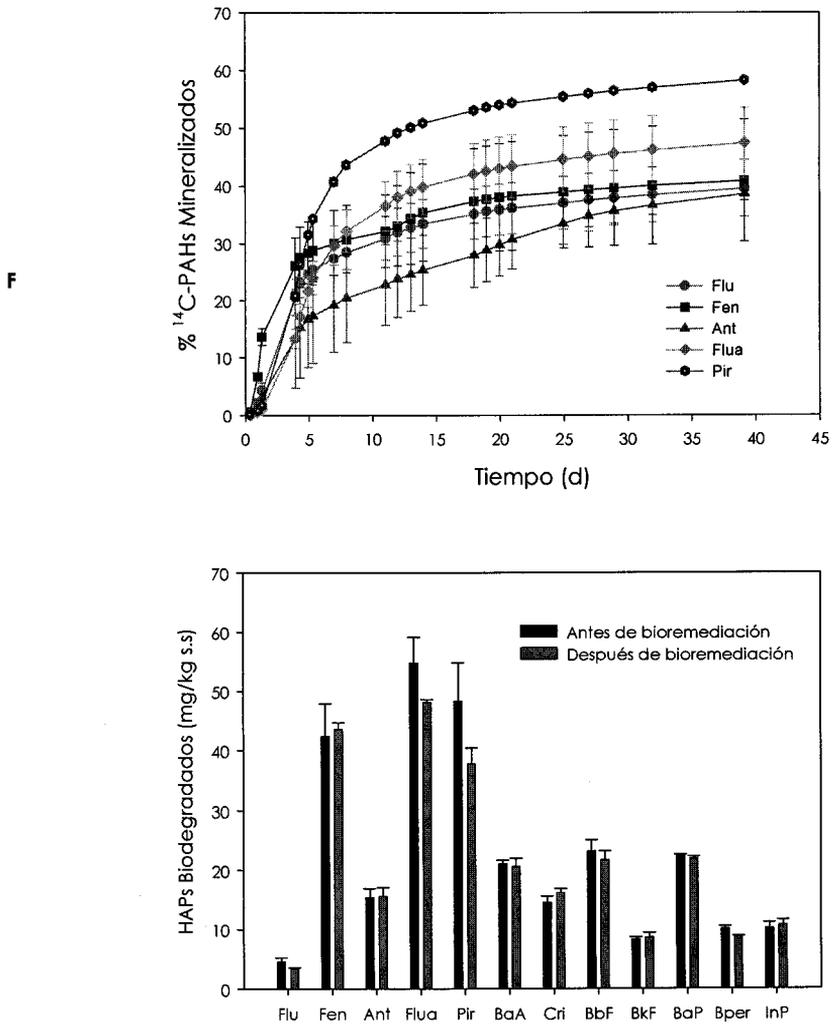
**Tabla IV.27** Fracciones de HAPs (mg/kg peso seco) en el suelo B1 resistentes a la biodegradación por la bacteria VM 552 en presencia de Brij 35 (20 mg/ml) y Tritón X-100 (0,5 mg/ml) después de 12 días. **a**, balance de masas de los HAPs presentes en el suelo y en la fase acuosa tras biodegradación. **b**, n.d.: No detectado. LD<sub>50</sub>: Flu: 2,86 mg/kg, Fen: 2,72 mg/kg, Flua: 2,91 mg/kg

HAPs	[HAPs] Suelo B1	Control	Brij 35	Tritón X-100
Fluoreno	36,34 ± 1,23	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>	n.d. <sup>b</sup>
<b>Fenantreno</b>	<b>165,35 ± 14,22</b>	<b>6,14 ± 0,88</b>	<b>n.d. <sup>b</sup></b>	<b>12,71 ± 1,26</b>
Antraceno	191,57 ± 8,55	75,61 ± 1,57	38,33 ± 3,85 <sup>a</sup>	74,64 ± 1,64
<b>Fluoranteno</b>	<b>800,05 ± 42,28</b>	<b>97,57 ± 1,03</b>	<b>n.d. <sup>b</sup></b>	<b>51,83 ± 4,39</b>
<b>Pireno</b>	<b>367,11 ± 13,24</b>	<b>55,13 ± 3,11</b>	<b>n.d. <sup>b</sup></b>	<b>110,08 ± 4,64</b>
Benzo(a)antraceno	126,69 ± 5,08	124,35 ± 5,27	131,45 ± 8,84 <sup>a</sup>	133,55 ± 3,02
Criseno	120,80 ± 18,99	107,39 ± 4,54	127,39 ± 2,19 <sup>a</sup>	115,58 ± 1,71
Benzo(b)fluoranteno	59,50 ± 3,65	57,77 ± 2,76	57,91 ± 2,52 <sup>a</sup>	57,80 ± 4,42
Benzo(k)fluoranteno	32,37 ± 0,90	33,54 ± 1,81	32,65 ± 1,75 <sup>a</sup>	37,62 ± 1,39
Benzo(a)pireno	27,74 ± 1,35	28,81 ± 2,64	29,43 ± 0,43 <sup>a</sup>	26,73 ± 1,41

Las fracciones de HAPs resistentes a la biodegradación obtenidas para los tres compuestos que *Mycobacterium* es capaz de degradar (fenantreno, fluoranteno y pireno) mostraron una clara reducción tanto en presencia como en ausencia de tensioactivos. Sin embargo, en presencia del tensioactivo Brij 35, dichas fracciones fueron menores que el límite de detección de la técnica de análisis. En cambio, no se observó reducción alguna en las concentraciones de los HAPs más pesados tales como benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno y benzo(a)pireno. A pesar de que la presencia del tensioactivo favoreció la desorción de dichos compuestos a la fase acuosa, reduciendo su concentración en el suelo, estos no fueron biodegradados posiblemente debido a que 12 días de tratamiento no fuera tiempo suficiente para la aparición de procesos de cometabolismo bacteriano para estos HAPs más pesados (tabla IV.27). Estos resultados fueron similares a los obtenidos con el suelo original B inoculado con la misma estirpe bacteriana y en presencia de Brij 35 (apartado IV.6.2).

#### **IV.7.3 BIODEGRADACIÓN DE HAPs EN SUELOS BIOREMEDIADOS.**

Para estudiar hasta qué punto la población bacteriana presente en el suelo es capaz de reducir la fracción resistente a la biodegradación generada en el suelo tras un proceso de bioremediación anterior, se siguió la mineralización de cinco HAPs marcados con  $^{14}\text{C}$  por las bacterias autóctonas en suspensiones del suelo E6068. Como se observa en la gráfica, la mineralización ocurrió en todos y cada uno de los HAPs ensayados sin previa fase de latencia. Los porcentajes máximos mineralizados fueron 39,5 % fluoreno, 40,9 % fenantreno, 38,6 % antraceno, 47,4 % fluoranteno y 58,3 % pireno (figura IV.27). Sin embargo, el análisis de las fracciones resistentes a biodegradación al final del ensayo mostró que tras 38 días, no se habían producido cambios significativos en las fracciones de los HAPs presentes en el suelo, manteniéndose prácticamente constantes las concentraciones iniciales (tabla IV.28). Por tanto, la mineralización observada había sido exclusivamente del compuesto marcado añadido para el seguimiento de la mineralización y no de los compuestos nativos del suelo E6068. Este comportamiento fue debido a la baja biodisponibilidad de los HAPs en el suelo E6068 por su lenta desorción. El hecho de que este suelo fuera sometido anteriormente a técnicas de bioremediación podría ser la causa de la lenta desorción de los HAPs observada, al haber sido biodegradada con anterioridad la fracción de desorción rápida y permanecer únicamente la fracción de desorción lenta como fracción resistente (completar con datos cinética tenax). La desorción lenta de dicha fracción de HAPs podría ser la causa de su limitada biodisponibilidad.



**Figura IV.27** Mineralización de cinco HAPs por las bacterias autóctonas del suelo E6068 en suspensión y fracciones resistentes a la biodegradación (mg/kg peso seco) tras 38 días.

**Tabla IV 28** Tasas máximas de mineralización ( $\text{mg kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), concentraciones iniciales de HAPs ( $\text{mg/kg}$  peso seco) en el suelo E6068 y fracciones resistentes a la biodegradación ( $\text{mg/kg}$  peso seco) por la población autóctona del suelo tras 38 días.

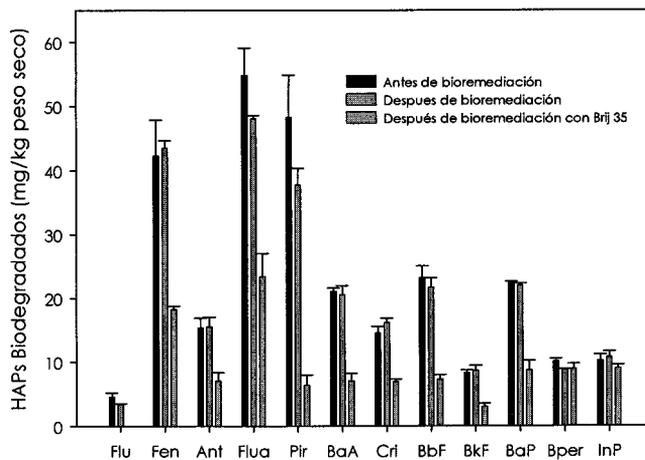
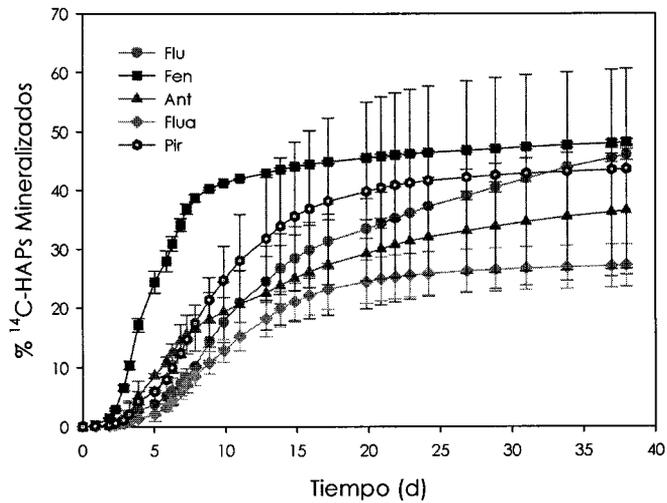
HAPs	Tasa máxima de mineralización	[HAPs] suelo E6068	[HAPs] Resistente a biodegradación
Fluoreno	0,26 ± 0,03	4,53 ± 0,68	3,32 ± 0,19
Fenantreno	2,87 ± 0,57	42,29 ± 5,58	43,49 ± 1,18
Antraceno	0,50 ± 0,28	15,39 ± 1,53	15,53 ± 1,53
Fluoranteno	2,45 ± 0,29	54,80 ± 4,32	48,07 ± 0,50
Pireno	3,31 ± 0,04	48,29 ± 6,55	37,76 ± 2,67
Benzo(a)antraceno	--	21,04 ± 0,59	20,54 ± 1,44
Críseno	--	14,54 ± 1,07	16,16 ± 0,70
Benzo(b)fluoranteno	--	23,19 ± 1,85	21,67 ± 1,51
Benzo(k)fluoranteno	--	8,24 ± 0,43	8,56 ± 0,85
Benzo(a)pireno	--	22,43 ± 0,13	21,95 ± 0,37
Benzo(ghi)perileno	--	10,05 ± 0,45	8,72 ± 0,12
Indeno(1,2,3-cd)pireno	--	10,15 ± 0,98	10,68 ± 0,93

#### IV.7.4 APLICACIÓN DE TENSOACTIVOS A SUELOS BIOREMEDIADOS

El estudio de la influencia de los agentes tensioactivos en la fracción de HAPs resistentes a la biodegradación, se realizó con un suelo que había sido sometido con anterioridad a procesos de bioremediación clásicos por la empresa SOILREM y que como se ha comentado en el apartado anterior IV.7.3 continúa presentando dicha fracción. Para ello se siguió la mineralización de cinco HAPs marcados con  $^{14}\text{C}$  en suspensiones del suelo E6068. El tensioactivo ensayado fue Brij 35 a una concentración de 20 mg/ml. Tanto el tensioactivo como su concentración fueron elegidos de acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos previos realizados con los suelos B y B1 (apartados IV.6.2 y IV.7.2).

La mineralización, como puede observarse en la figura IV.28, se produjo para cada uno de los compuestos marcados después de una pequeña fase de latencia de aproximadamente 3 días, y con una secuencia diferente a la ocurrida para los mismos sistemas en ausencia de tensioactivo (apartado IV.7.2, figura IV.27) pero de acuerdo con la secuencia obtenida en los estudios de desorción con tensioactivos (apartado IV.4.4.2). Los porcentajes de mineralización alcanzados tras 38 días fueron de 46,1 % fluoreno, 48,2 % fenantreno, 36,6 % antraceno, 27,2 fluoranteno y 43,6 % pireno. El estudio de las cinéticas de desorción de los HAPs para este suelo en presencia de Brij 35 (apartado IV.4.4.1) mostró que la mayor proporción de desorción de los HAPs se producía entre las 3 y las 48 horas de ensayo, excepto en los casos de fenantreno, fluoranteno y pireno donde dicha proporción continuó aumentando de forma progresiva con el tiempo. Este retraso en la mayor proporción de la desorción de los HAPs coincide con la fase de latencia observada en la mineralización de dichos compuestos en presencia del tensioactivo

confirmando que el retraso observado no fue debido a factores microbiológicos sino a la lenta desorción de los HAPs desde la matriz del suelo hacia la fase acuosa.



**Figura IV.28** Mineralización de cinco HAPs por las bacterias autóctonas del suelo E6068 en suspensión en presencia de Brij 35 (20 mg/ml) y fracciones resistentes a la biodegradación en ausencia y en presencia del tensioactivo tras 38 días.

**Tabla IV.29** Tasas máximas de mineralización ( $\text{mg kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ ), concentraciones iniciales de HAPs ( $\text{mg/kg}$  peso seco) en el suelo E6068, fracciones resistentes a la biodegradación ( $\text{mg/kg}$  peso seco) y porcentaje de dicha fracción presente en el suelo tras biodegradación por la población autóctona del suelo tras 38 días. **a**: Desviaciones estándar de muestras por triplicado. **b**: Balance de masas de HAPs presentes en el suelo y en la fase acuosa. n.d.: no detectado. LD: Flu: 2,84  $\text{mg/kg}$  peso seco.

HAPs	Tasa máxima de mineralización	[HAPs] suelo E6068	[HAPs] Resistente a biodegradación a,b	% de fracción resistente en el suelo
Fluoreno	$0,27 \pm 0,09$	$4,53 \pm 0,68$	n.d.	–
Fenantreno	$2,77 \pm 0,05$	$42,29 \pm 5,58$	$18,20 \pm 0,58$	100
Antraceno	$0,63 \pm 0,02$	$15,39 \pm 1,53$	$7,82 \pm 1,41$	89,40
Fluoranteno	$1,44 \pm 0,23$	$54,80 \pm 4,32$	$25,97 \pm 3,73$	89,99
Pireno	$1,76 \pm 0,67$	$48,29 \pm 6,55$	$7,58 \pm 2,00$	83,90
Benzo(a)antraceno	–	$21,04 \pm 0,59$	$8,51 \pm 1,28$	82,14
Criseno	–	$14,54 \pm 1,07$	$8,44 \pm 0,47$	82,11
Benzo(b)fluoranteno	–	$23,19 \pm 1,85$	$8,21 \pm 0,82$	87,94
Benzo(k)fluoranteno	–	$8,24 \pm 0,43$	$3,49 \pm 0,52$	85,10
Benzo(a)pireno	–	$22,43 \pm 0,13$	$9,67 \pm 1,50$	90,07
Benzo(ghi)perileno	–	$10,05 \pm 0,45$	$9,97 \pm 0,83$	88,66
Indeno(1,2,3-cd)pireno	–	$10,15 \pm 0,98$	$10,06 \pm 0,72$	88,77

Al final del ensayo, la tensión superficial medida en la fase acuosa fue de  $61,3 \pm 0,2$  dyn/cm valor superior al correspondiente a la CMC<sub>MM</sub> Brij 35. Esta reducción en la concentración del tensioactivo en fase acuosa podría ser debida a dos causas. O bien Brij 35 es adsorbido al suelo E6068 en mayor proporción que al suelo B (94 %) o bien existe una población microbiana en este suelo capaz de biodegradar el tensioactivo. Un comportamiento similar fue observado tras la mineralización de los HAPs del suelo B por la población autóctona y en presencia de la misma concentración de Brij 35 que la ensayada en este caso (apartado IV.6.4).

Las fracciones de HAPs resistentes a la biodegradación fueron determinadas al final del ensayo y son mostradas en la tabla IV.29. Las tasas máximas de mineralización fueron, para los cinco HAPs estudiados, menores que en el caso de los sistemas en ausencia de tensioactivos. Esta diferencia fue debida a que, como se comentó en el apartado anterior, la mineralización había sido exclusivamente de los compuestos marcados añadidos a la suspensión para el seguimiento de la mineralización, los cuales se encontraban biodisponibles al estar menos adsorbidos al suelo que los compuestos nativos. La reducción de la fracción de HAPs resistente a biodegradación observada en presencia del tensioactivo Brij 35, confirma que la mineralización observada en este caso es debida a los compuestos nativos del suelo. La población autóctona del suelo E6068 en presencia de Brij 35 fue capaz de reducir la fracción de HAPs resistentes a la biodegradación presente en el suelo.

Dicha reducción se observó para todos los HAPs excepto en los casos de benzo(ghi)perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno. El análisis de la fase acuosa al final del ensayo confirmó la presencia de HAPs en concentraciones muy bajas, excepto para fluoreno y fenantreno los cuales no fueron detectados. Para todos los HAPs estudiados, el porcentaje de fracción resistente a la biodegradación tras tratamiento con Brij 35 presente en el suelo fue superior al 82 %.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los estudios de desorción del suelo E6068 en presencia del tensioactivo Brij 35 (apartado IV.4.4.1). Excepto para fluoranteno, las fracciones resistentes a la biodegradación con Brij 35 son del mismo orden de magnitud que las obtenidas como fracciones resistentes a la desorción con el tensioactivo. El hecho de que la concentración de HAPs se reduzca significativamente confirma la existencia de una población autóctona capaz de degradar los contaminantes, incluso algunos de los HAPs más pesados, cuando en el sistema no existen limitaciones de biodisponibilidad por la presencia de un agente tensioactivo. En la bibliografía, se han encontrado resultados similares en sistemas análogos a los empleados en este trabajo. Autores como Boonchan et al. (13), demostraron que la estirpe *Stenotrophomonas maltophilia*, aislada de un suelo contaminado con HAPs, era capaz de degradar o transformar HAPs pesados en presencia de tensioactivos no iónicos.

En el caso del suelo E6068, a diferencia de lo ocurrido para el suelo B, la biodegradación parcial observada para los HAPs más pesados en presencia de Brij 35, podría deberse a que el tiempo transcurrido para la desorción de los HAPs ligeros y su biodegradación sea un período de tiempo suficiente para la biodegradación de los HAPs más pesados vía cometabolismo.

#### **IV.8 DISCUSIÓN FINAL: INFLUENCIA DE LOS TENSIOSACTIVOS EN LA DESORCIÓN Y BIODEGRADACIÓN DE HAPs EN SUELOS.**

Desafortunadamente, la biorremediación de suelos contaminados con HAPs es un proceso que normalmente no concluye con la eliminación total del contaminante. En la mayoría de los casos, incluso bajo condiciones favorables para la biodegradación, los HAPs permanecen en el suelo, debido entre otras causas a su lenta desorción desde el suelo hacia la fase acuosa donde podrían ser biodegradados. Esta lenta desorción es la causa más probable de la limitada biodegradación observada y la responsable de la presencia de una fracción de HAPs resistente a la biodegradación que en la mayoría de los casos es superior a los niveles legales establecidos.

La desorción de los compuestos orgánicos desde la matriz del suelo, suele mostrar un comportamiento bifásico: una fase de desorción rápida seguida de una segunda fase de desorción lenta. Este comportamiento bifásico también ocurre durante la biorremediación. Este comportamiento de los HAPs ha sido caracterizado en este trabajo mediante ensayos de desorción con Tenax (apartado IV.4.1) y ensayos de biodegradación en suspensiones bajo las mismas condiciones (apartado IV.5.1). Tomando fenantreno como compuesto mineralizable representativo, los resultados mostraron dicho comportamiento bifásico en ambos casos (fracción de desorción rápida de 96,1 % en la desorción

con Tenax y de 94,9 % en la biodegradación) y la presencia de una fracción de HAPs resistente a desorción ( $3,10 \pm 0,62$  mg/kg peso seco) del mismo orden de magnitud que la obtenida tras los ensayos de biodegradación ( $9,04 \pm 1,75$  mg/kg peso seco). Estas observaciones se repiten con el resto de los HAPs mineralizables. Ello confirma que la causa de la persistencia de dichos compuestos no es debida a factores microbiológicos sino a su lenta desorción desde el suelo hacia la fase acuosa. Asimismo, este comportamiento fue diferente en el caso de los HAPs más pesados, tales como benzo(a)pireno. Dicho compuesto fue degradado solo hasta un 46 %, a pesar de presentar 86,7 % de fracción de desorción rápida, concluyéndose que la biodegradación de los HAPs más pesados no se encuentra limitada por su desorción lenta sino por factores microbiológicos.

El objetivo de esta tesis fue investigar en qué medida la presencia de tensioactivos podría disminuir dicha fracción resistente a la biodegradación, aumentando la desorción de los HAPs. Se ensayaron tres tensioactivos no iónicos, Tritón X-100, Brij 30 y Brij 35, siempre en concentraciones superiores a sus respectivas CMC en varios ordenes de magnitud. Las cinéticas de desorción de los HAPs en suspensiones estériles y en presencia de diferentes concentraciones de tensioactivos, mostraron que las tasas máximas de desorción de los HAPs en presencia de Brij 35 y Tritón X-100 fueron muy superiores a las obtenidas mediante desorción con Tenax, llegando a ser entre dos y cuatro veces superior (tabla IV.14) y que el porcentaje de dichos compuestos desorbidos tras solo una semana de extracción era del mismo orden que para Tenax, en el caso de Tritón X-100 y superior (del orden del 100 % del contenido inicial) en el caso de Brij 35 (tabla IV.13). En ambos métodos, la concentración de HAPs en fase acuosa fue probablemente muy pequeña, manteniéndose un gradiente de concentración máximo entre el suelo y la fase acuosa, asegurándose así, que la desorción tiene lugar a la mayor velocidad posible. Pero la principal diferencia entre ambos métodos depende de la forma en la que interaccionan Tenax y tensioactivo con la matriz del suelo. En los ensayos con Tenax, se observó a simple vista que éste no interacciona con la matriz del suelo, en cambio, los ensayos de adsorción llevados a cabo en esta tesis mostraron que Tritón X-100 y Brij 35 interaccionaban con dicha matriz (apartado IV.3.4). Los resultados de desorción mostraron que el aumento observado en la solubilidad aparente de los HAPs en presencia de tensioactivos no es el único mecanismo involucrado en el aumento de la disponibilidad, sino que también interviene el aumento de difusión de los HAPs a través de la matriz del suelo como consecuencia de las interacciones suelo – tensioactivo. El resultado final fue la movilización, por parte de los tensioactivos, de la fracción de desorción lenta.

Se hacía por tanto necesario determinar si esta movilización causada por los tensioactivos resultaba también en una mayor biodegradación de la fracción inicialmente resistente. Por ello, el estudio de la influencia de los agentes tensioactivos en la biorecuperación se llevó a cabo mediante con suspensiones de suelo estériles, en iguales condiciones a los ensayos de desorción, e inoculadas con *Mycobacterium* sp. VM 552, estirpe representativa de las bacterias degradadoras de HAPs de 3y 4 anillos (fenantreno, fluoranteno y pireno).

La presencia de Tritón X-100, Brij 30 y Brij 35 en los sistemas estudiados causó diferencias significativas tanto en el proceso de biodegradación de los HAPs como en las fracciones resistentes resultantes de dicho proceso (apartado IV.6). El

tensioactivo Brij 30 resultó tóxico para la población de *Mycobacterium* inoculada mientras que Tritón X-100 y Brij 35, a iguales concentraciones, aumentaron las tasas máximas de mineralización, provocaron el crecimiento de la población bacteriana inoculada y redujeron la fracción resistente de los HAPs significativamente. El efecto más claro se observó en aquellos sistemas donde Brij 35 se encontraba en concentraciones de 20 y 40 mg/ml, donde las tasas máximas de mineralización del sustrato marcado se vieron duplicadas y a tiempo final del ensayo, las concentraciones residuales de fenantreno, fluoranteno y pireno no fueron detectadas mediante análisis por HPLC (tabla IV.21). El estudio de la población microbiana mediante técnicas de análisis molecular mostró que debido a la presencia de Brij 35 en el sistema y al aumento de biodisponibilidad de los HAPs provocado por dicho agente, la población bacteriana inoculada creció de forma considerable durante el transcurso de los ensayos (figura IV.21). Finalmente, estos resultados se pusieron a prueba con la población autóctona de los suelos, tanto en nuestra muestra de suelo original como en suelos previamente sometidos a biorremediación, obteniendo resultados análogos.

Por tanto, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que el uso de concentraciones de tensioactivos no iónicos (Brij 35) en concentraciones superiores a su CMC podría ser una alternativa razonable para mejorar la biorremediación de suelos contaminados con HAPs, disminuyendo las restricciones de biodisponibilidad de dichos compuestos en el suelo impuestas por su lenta desorción.

## **CAPÍTULO V: CONCLUSIONES**

## Conclusiones

Las conclusiones más importantes obtenidas en esta tesis son:

**La cinética de desorción de los HAPs utilizando Tenax es una buena herramienta para predecir la bioaccesibilidad de los contaminantes.** Biodegradación y desorción mostraron un comportamiento bifásico, produciéndose una primera fase muy rápida, seguida de una segunda fase mucho más lenta. Esta segunda fase parece ser el paso limitante en la biodegradación de los HAPs, originándose una fracción resistente, en ambos casos, del mismo orden de magnitud.

**La presencia de tensioactivos en suspensiones de suelo aceleró de manera significativa la desorción de los HAPs hacia la fase acuosa y redujo la fracción resistente a desorción.** No obstante, este efecto depende del tensioactivo empleado, de su concentración y de su coeficiente de adsorción al suelo.

**De los tres tensioactivos ensayados, Brij 30 y Tritón X-100 inhibieron y retardaron, respectivamente, la mineralización de fenantreno por *Mycobacterium*.** Para ambos tensioactivos dicho efecto fue más acusado conforme se incrementaba su concentración en la fase acuosa.

**En cambio, el tensioactivo Brij 35 aumentó de manera considerable la tasa máxima de mineralización de los HAPs y redujo significativamente la fracción resistente a biodegradación de fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno.** El estudio de la población microbiana por técnicas de análisis molecular mostró un aumento de la población de *Mycobacterium* como consecuencia de la mayor biodisponibilidad de los HAPs en presencia del tensioactivo.

**Brij 35 modificó la capacidad degradadora de HAPs pesados en la población bacteriana autóctona del suelo.** El aumento en la velocidad de biodegradación de los HAPs más ligeros por la presencia del tensioactivo inhibió el proceso cometabólico de los HAPs más pesados.

**La aplicación de Brij 35 a suelos que habían sido sometidos anteriormente a procesos de biorremediación redujo significativamente la fracción de HAPs resistentes a biodegradación.** Este hecho confirma la existencia en dicho suelo de una población autóctona, capaz de degradar los contaminantes, incluso algunos de los HAPs más pesados, cuando en el sistema no existen limitaciones de biodisponibilidad por la presencia del agente tensioactivo.

**La aplicación de tensioactivos no iónicos y biodegradables, como Brij 35, en concentraciones superiores a su CMC, es una alternativa razonable para mejorar la biorremediación de suelos contaminados con HAPs en los que existan fuertes limitaciones en la biodisponibilidad de los contaminantes.**

## **CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA**

## Bibliografia

1. **Aceves, M.** 1993. Seasonally dependent size distributions of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban aerosols from densely populated areas. *Environmental Science & Technology*. **27**: 2896 - 2908 .
2. **Alexander, M.** 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science & Technology*. **34**: 4259 - 4265.
3. **Alexander, M.** 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*. **211**: 132 - 138.
4. **Alexander, M.** 1991. Research needs in bioremediation. *Environmental Science & Technology*. **25**: 1972 - 1973.
5. **Alexander, M.** 1995. How toxic are toxic chemicals in soil? *Environmental Science & Technology*. **29**: 2713 - 2717.
6. **Aronstein, B. N. and Alexander, M.** 1993. Effect of a non-ionic surfactant added to the soil surface on the biodegradation of aromatic hydrocarbons within the soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **39**: 386 - 390.
7. **Atagana, H. I., Haynes, R. J., and Wallis, F. M.** 2003. The use of surfactants as possible enhancers in bioremediation of creosote contaminated soil. *Water, Air and Soil Pollution*. **142**: 137 - 149.
8. **Bastiaens, L.** 1998. Isolation and characterisation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. Evaluation of the use of the isolates in soil slurry bioremediation.
9. **Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., de Wachter, R., Verachtert, H., and Diels, L.** 2001. Isolation Of Adherent Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Degrading Bacteria Using PAH-Sorbing Carriers. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 1834 - 1843.
10. **Beurskens, J. E. M., Dekker, C. G. C., and van der Velde, L. E.** 1990. Extended abstract. COST 641. Workshop, Copenhagen.
11. **Bewley, R. J. F., Ellis, B., and Rees, J. F.** 1990. Development of a microbiological treatment for restoration of oil contaminated soil. *Land Degradation & Rehabilitation*. **2**: 1 - 11.
12. **Bonten, L.** 2001. Improving bioremediation of PAH contaminated soils by thermal pretreatment. PhD.Thesis Wageningen University, Netherlands.
13. **Boonchan, S., Britz, M. L., and Stanley, G. A.** 1998. Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnology and Bioengineering*. **59**: 482 - 494.
14. **Braida, W. J., White, J. C., and Pignatello, J. J.** 2004. Indices for bioavailability and biotransformation potential of contaminants in soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **23**: 1585 - 1591.

15. **Breedveld, G. D. and Karlson, D. A.** 2000. Estimating the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons for bioremediation of creosote contaminated soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **54**: 255 - 261.
16. **Carmichael, L. M., Christman, R. F., and Pfaender, F. K.** 1997. Desorption and mineralization kinetics of phenanthrene and chrysene in contaminated soils. *Environmental Science & Technology*. **31**: 126 - 132.
17. **Carmichael, L. M. and Pfaender, F. K.** 1997. Polynuclear aromatic hydrocarbon metabolism in soils: relationship to soil characteristics and preexposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **16**: 666 - 675.
18. **Cerniglia, C. E.** 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*. **3**: 351 - 368.
19. **Chu, W. and Chan, K. H.** 2003. The mechanism of the surfactant-aided soil washing system for hydrophobic and partial hydrophobic organics. *The Science of the Total Environment*. **307**: 83 - 92.
20. **Chu, W. and So, W. S.** 2001. Modeling the two stages of surfactant-aided soil washing. *Water Research*. **35**: 761 - 767.
21. **Chung, N. and Alexander, M.** 1999. Effect of concentration on sequestration and bioavailability of two polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science & Technology*. **33**: 3605 - 3608.
22. **Cornelissen, G.** 1999. Mechanism and consequences of slow desorption of organic compounds from sediments. PhD.Thesis.University of Amsterdam.Netherlands.
23. **Cornelissen, G., Rigterink, H., Ferdinandy, M. M. A., and van Noort, P. C. M.** 1998. Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation. *Environmental Science & Technology*. **32**: 966 - 970.
24. **Cornelissen, G., Rigterink, H., Ten Hulscher, D. E. M., Vrind, B. A., and van Noort, P. C. M.** 2001. A simple Tenax extraction method to determine the availability of sediment-sorbed organic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **20**: 706 - 711.
25. **Cornelissen, G., van Noort, P. C. M., and Gover, H. A. J.** 1997. Desorption kinetics of chlorobenzenes, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorinated biphenyls: sediment extraction with Tenax and effects of contact time and solute hydrophobicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **16**: 1351 - 1357.
26. **Cuypers, C.** 2001. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and sediments. Prediction of bioavailability & Characterization of organic matter domains. PhD.Thesis Wageningen University.Netherlands.
27. **Cuypers, C., Pancras, T., Grotenhuis, T., and Rulkens, W.** 2002. The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere*. **46**: 1235 - 1245.
28. **Deschênes, L., Lafrance, P., Villeneuve, J.-P., and Samson, R.** 1996. Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits polycyclic

## Bibliografía

aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **46**: 638 - 646.

29. **Deshpande, S., Shiau, B. J., Wade, D., Sabatini, D. A., and Harwell, J. H.** 1999. Surfactant selection for enhancing *ex situ* soil washing. *Water Research*. **33**: 351 - 360.
30. **Dzombak, D. A. and Luthy, R. G.** 1984. Estimating adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils. *Soil Science*. **137**: 292 - 308.
31. **Edmonds, R. L.** 1976. Survival of coliform bacteria in sewage sludge applied to a forest clearcut and potential movement into groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*. **32**: 537 - 546.
32. **Edwards, D. A., Adeel, Z., and Luthy, R. G.** 1994. Distribution of nonionic surfactant and phenanthrene in a sediment/aqueous system. *Environmental Science and Technology*. **28**: 1550 - 1560.
33. **Edwards, D. A., Luthy, R. G., and Liu, Z.** 1991. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solution. *Environmental Science and Technology*. **25**: 127 - 133.
34. **Ellis, B., Harold, P., and Kronberg, H.** 1991. Bioremediation of a creosote contaminated soil. *Environmental Technology*. **12**: 447 - 459.
35. **Erikson, M., Dalhammar, G., and Borg-Karlson, A.-K.** 2000. Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **53**: 619 - 626.
36. **FAO.** 1970. Physical and Chemicals methods and Water analysis. *Soils Bulletin*. Roma. **10**:
37. **Fischer, S. G. and Lerman, L. S.** 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*. **16**: 191 - 200.
38. **Fu, M. H., Mayton, H., and Alexander, M.** 1994. Desorption and biodegradation of sorbed styrene in soil and aquifer solids. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **13**: 749 - 753.
39. **Gannon, J. T., Manilal, V. B., and Alexander, M.** 1991. Relationship between cell-surface properties and transport of bacteria through soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**: 190 - 193.
40. **García-Junco, M., De Olmedo, E., and Ortega-Calvo, J. J.** 2001. Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid (NAPL)-dissolved phenanthrene to the biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ. *Environmental Microbiology*. **3(9)**: 561 - 569.
41. **García, J. M., Wick, L. Y., and Harm, H.** 2001. Influence of the nonionic surfactant Brij 35 on the bioavailability of solid and sorbed Dibenzofuran. *Environmental Science and Technology*. **35**: 2033 - 2039.
42. **Garrigues, P. and Bellocq, J.** 1989. Rapid cleanup of natural organic extracts for the recovery polycyclic aromatic hydrocarbons by solid phase extraction. *Journal of High Resolution Chromatography*. **12**: 400 - 403.

43. **Grasso, D., Subramaniam, K., Pignatello, J. J., Yang, Y., and Ratté, D.** 2001. Micellar desorption of polynuclear aromatic hydrocarbons from contaminated soil. *Colloids and Surfaces*. **194**: 65 - 74.
44. **Grifoll, M., Selifonov, S. A., Gatlin, C. V., and Chapman, P. J.** 1995. Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**: 3711 - 3723.
45. **Guha, S. and Jaffé, P. R.** 1996. Bioavailability of hydrophobic compounds partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environmental Science & Technology*. **30**: 1382 - 1391.
46. **Guha, S. and Jaffé, P. R.** 1996. Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of non-ionic surfactants. *Environmental Science & Technology*. **30**: 605 - 611.
47. **Guha, S., Jaffé, P. R. , and Peters, C. A.** 1998. Bioavailability of mixtures of PAHs partitioned into the micellar phase of nonionic surfactant. *Environmental Science and Technology*. **32**: 2317 - 2324.
48. **Guha, S., Jaffé, P. R. , and Peters, C. A.** 1998. Solubilization of PA mixtures by a nonionic surfactant. *Environmental Science and Technology*. **32**: 930 - 935.
49. **Gutiérrez-Dabán, A.** 2003. Estudio de la contaminación atmosférica por hidrocarburos aromáticos policíclicos y su distribución por tamaño de partícula en la ciudad de Sevilla. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. España.
50. **Heitkamp, M. and Cerniglia, C. E.** 1987. The effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in fresh water and stuarine ecosystems. *Environmental Science & Technology*. **6**: 535 - 546.
51. **Helenius, A. and Simons, K.** 1975. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta*. **415**: 29 - 79.
52. **Herbes, S. E. and Schwall, L. R.** 1978. Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleum-contaminated sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. **35**: 306 - 316.
53. **Heuer, H. and Smalla, K.** Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. *Studing Soil Microbial Communities*. **12b**: 353 - 373.
54. **Heuer, H., Wieland, G., Schönfeld, J., Schönwälder, A., Gomes, N. C. M., and Smalla, K.** 2001. Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis. *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*. 177 - 190.
55. **Holben, W. E.** Isolation and purification of bacterial community DNA from environmental samples. *Soil, Rhizosphere, and Phyllosphere*. **47**: 431 - 444.
56. **Hwang, S. and Cutright, T.** 2003. Effect of expandable clays and cometabolism on PAH biodegradability. *Environ. Sci & Pollut. Res.* **10**: 277 - 280.

## Bibliografía

57. **Jackson, A., Roy, D., and Breitenbeck, G.** 1994. Transport of a bacterial suspension through a soil matrix using water and an anionic surfactant. *Water Research*. **28**: 943 - 949.
58. **Johnson, W. P. and Logan, B. E.** 1996. Enhanced transport of bacteria in porous media by sediment-phase and aqueous-phase natural organic matter. *Water Research*. **30**: 923 - 931.
59. **Jones, K. C., Strafford, J. A., Waterhouse, K. S., and Vogt, N. B.** 1989. Organic contaminants in Welsh soils: polynuclear aromatic hydrocarbons. *Environmental Science & Technology*. **23**: 540 - 550.
60. **Juhász, A. L.** 1998. Microbial degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. PhD.Tesis, Victoria University of Technology, Melbourne, Australia.
61. **Juhász, A. L., Britz, M. L., and Stanley, G. A.** 1997. Degradation of Benzo[a]pyrene, Dibenzo[a,h]anthracene and coronene by *Burkholderia Cepacia*. *Water Science and Technology*. **36**: 45 - 51.
62. **Kanaly, R. A. and Harayama, S.** 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*. **182**: 2059 - 2067.
63. **Kelsey, J. W. and Alexander, M.** 1997. Declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **16**: 582 - 585.
64. **Khan, A. A., Wang, R.-F., Cao, W.-W., Doerge, D. R., Wennerstrom, D., and Cerniglia, C. E.** 2001. Molecular cloning nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 3577 - 3585.
65. **Kim, I., Park, J.-S., and Kim, K.-W.** 2001. Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry. *Applied Geochemistry*. **16**: 1419 - 1428.
66. **Knaebel, D. B., Federle, T. W., McAvoy, D. C., and Vestal, J. R.** 1994. Effect of mineral and organic soil constituents on microbial mineralization of organic compounds in a natural soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 4500 - 4508.
67. **Koeber, R., Bayoma, J., and Niessner, R.** 1999. Determination of Benzo[a]pyrene diones in air particulate matter with liquid chromatography mass spectrophotometry. *Environmental Science & Technology*. **33**: 1552 - 1558.
68. **Kumbhakar, M., Goel, T., Mukherjee, T., and Pal, H.** 2004. Role of micellar size and hydration on solvation dynamics: a temperature dependent study in Triton X-100 and Brij 35 micelles. *J.Phys.Chem.B*. **108**: 19246 - 19254.
69. **Laha, S. and Luthy, R. G.** 1991. Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactant in soil-water systems. *Environmental Science and Technology*. **25**: 1920 - 1930.
70. **Laha, S. and Luthy, R. G.** 1992. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of Phenanthrene in soil-water systems. *Biotechnology and Bioengineering*. **40**: 1367 - 1380.

71. **Lahlou, M., Harm, H., Springael, D., and 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.
72. **Lahlou, M. and 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.
73. **Laumorex, E. and Bownawell, B.** 1999. Chemical and biological availability of sediment sorbed hydrophobic organic contaminants. *Environmental Science & Technology*. **18**: 1733 - 1741.
74. **Leal-Granadillo, I. A., García-Alonso, J. I., and Sanz-Medel, A.** 2000. Determination of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate and vapour phases in Oviedo, Spain. *J. Environ. Monit.* **2**: 218 - 222.
75. **Leys, N. M., Bastiaens, L., Verstraete, W., and Springael, D.** 2005. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **66**: 726 - 736.
76. **Leys, N. M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E. M., and Springael, D.** 2004. Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strain in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and environmental Microbiology*. **70**: 1944 - 1955.
77. **Leys, N. M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Wattiau, P., Top, E. M., Verstraete, W., and Springael, D.** 2005. Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology*. **51**: 375 - 388.
78. **Liu, Z., Edwards, D. A., and Luthy, R. G.** 1992. Sorption of non-ionic surfactants onto soil. *Water Research*. **26**: 1337 - 1345.
79. **Liu, Z., Jacobson, A. M., and Luthy, R. G.** 1995. Biodegradation of Naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems. *Applied and environmental Microbiology*. **61**: 145 - 151.
80. **Liu, Z., Laha, S., and Luthy, R. G.** 1991. Surfactant solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in soil-water suspensions. *Water Science and Technology*. **23**: 475 - 485.
81. **Madsen, E. L. and Alexander, M.** 1982. Transport of *Rhizobium* and *Pseudomonas* through soil. *Soil Science Society of America Journal*. **46**: 557 - 560.
82. **Madsen, T. and Kristensen, P.** 1997. Effects of bacterial inoculation and nonionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **16**: 631 - 637.
83. **Makkar, R. S. and Rockne, K. J.** 2003. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **22**: 2280 - 2292.

## Bibliografía

84. **Marín Mateo, R.** 1998. Manual de derecho ambiental. Ed.Trivium, 2ed., Madrid.
85. **McLellan, S. L., Warshawsky, D., and Shann, J. R.** 2002. The effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on the degradation of Benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* SP. strain RJGIL-135. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **21**: 253 - 259.
86. **Millette, D., Barker, J. F., Comeau, Y., Butler, B. J., Frind, E. O., Clément, B., and Samson, R.** 1995. Substrate interaction during aerobic biodegradation of creosote-related compounds: a factorial batch experiment. *Environmental Science & Technology*. **29**: 1944 - 1952.
87. **Ministerio de Agricultura, P. y. A.** 1986. Métodos oficiales de análisis. **Vol.III. Madrid:**
88. **Mueller, J. G., Chapman, P. J., and Pritchard, P. H.** 1989. Action of a fluoranthene-utilising bacterial community of polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**: 3085 - 3090.
89. **Mueller, J. G., Lantz, S. E., Blattmann, B. O., and Chapman, P. J.** 1991. Bench-scale evaluation of alternative biological treatment process for the remediation of pentachlorophenol and creosote contaminated materials: slurry phase bioremediation. *Environmental Science & Technology*. **25**: 1055 - 1061.
90. **Mueller, J. G., Chapman, P. J., Blattmann, B. O., and Pritchard, P. H.** 1990. Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**: 1079 - 1086.
91. **Mukerjee, P.** 1978. Rates of adsorption of wetting agents and detergents. *Nature*. **217**: 1046 - &.
92. **Mulligan, C. N., Yong, R. N., and Gibbs, B. F.** 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*. **60**: 371 - 380.
93. **Muyzer, G., Hottenträger, S., Teske, A., and Wawer, C.** 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16SrDNA- a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. *Molecular Microbial Ecology Manual*. **3.4.4**: 1 - 23.
94. **Myers, R. M., Maniatis, T., and Lerman, L. S.** 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in enzymology*. **155**: 501 - 527.
95. **Neu, T. R.** 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Micobiological Reviews*. **60**: 151 - 166.
96. **Ortega-Calvo, J. J., Birman, I., and Alexander, M.** 1995. Effect of varying the rate of partitioning of phenanthrene in nonaqueous-phase liquids on biodegradation in soil slurries. *Environmental Science and Technology*. **29**: 2222 - 2225.
97. **Ortega-Calvo, J. J. and Sain-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.

98. **Park, K. S., Sims, R. C., and Dupont, R. R.** 1990. Transformation of PAHs in soil systems. *J. Environ. Eng.* **116**: 632 - 641.
99. **Peters, C. A., Knightes, C. D., and Brown, D. G.** 1999. Long-term composition dynamics of PAH-containing NAPLs and implications for risk assessment. *Environmental Science & Technology.* **33**: 4499 - 4507.
100. **Pignatello, J. J.** 1990. Slowly reversible sorption of aliphatic halocarbons in soil. II. mechanistic aspects. *Environmental Toxicology and Chemistry.* **9**: 1117 - 1126.
101. **Pignatello, J. J.** 1990. Slowly reversible sorption of aliphatic halocarbons in soils. I. Formation of residual fractions. *Environmental Toxicology and Chemistry.* **9**: 1107 - 1115.
102. **Pignatello, J. J. and Xing, B. S.** 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environmental Science & Technology.* **30**: 1 - 11.
103. **Piskonen, R. and Hävaara, M.** 2004. Evaluation of chemical pretreatment of contaminated soil for improved PAH bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **65**: 627 - 634.
104. **Prak, D. J. L. and Pritchard, P. H.** 2002. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in micellar nonionic surfactant solutions. *Water Research.* **36**: 3463 - 3472.
105. **Pritchard, P. D., Mueller, J., Lantz, S., and Santavy, D.** 1995. The potential importance of biodiversity in environmental biotechnology applications: Bioremediation of PAH-contaminated soils and sediments. In Allsop, D, Hawsworth, D, Colwell, R, eds, *Microbial Diversity and Ecosystem Function*. CAB International. Cambridge, MA, USA. 161 - 182.
106. **Ray, A. and Nemethy, G.** 1992. Effects of monohydric alcohols and dioxane on hydrophobic association. *The American Chemical Society.* **164**: 122 - &.
107. **Reid, B. J., Stokes, J. D., Jones, K. C., and Semple, K. T.** 2000. Nonexhaustive Cyclodextrin-Based Extraction Technique for the Evaluation of PAH Bioavailability. *Environmental Science and Technology.* **34**: 3174 - 3179.
108. **Rijnaarts, H. H. M., Bachmann, A., Jumelet, J. C., and Zehnder, A. J. B.** 1990. Effect of desorption and intraparticle mass-transfer on the aerobic biomineralization of alpha-hexachlorocyclohexane in a contaminated calcareous soil. *Environmental Science & Technology.* **24**: 1349 - 1354.
109. **Roch, F. and Alexander, M.** 1995. Biodegradation of hydrophobic compounds in the presence of surfactants. *Environmental Toxicology and Chemistry.* **14**: 1151 - 1158.
110. **Rockne, K. J., Shor, L. M., Young, L. Y., Taghon, G. L., and Kason, D. S.** 2002. Distributed sequestration and release of PAHs in weathered sediment: the role of sediment structure and organic carbon properties. *Environmental Science & Technology.* **36**: 2636 - 2644.
111. **Scholl, M. A. and Harvey, R. W.** 1992. Laboratory investigations on the role of sediment surface and groundwater chemistry in transport of bacteria through a contaminated sandy aquifer. *Environmental Science & Technology.* **26**: 1410 - 1417.

## Bibliografía

112. **Scow, K. M. and Alexander, M.** 1992. Effect of diffusion on the kinetics of biodegradation: Experimental results with synthetic aggregates. *Soil Science Society of America Journal*. **56**: 128 - 134.
113. **Smith, J. R., Nakles, D. V., Sherman, D. M., Neuhauser, E. F., and Loehr, R. C.** 1989. Environmental fate mechanisms influencing biological degradation of coal-tar derived polynuclear aromatic hydrocarbons in soil systems. In 3rd International Conference on New Frontiers for Hazardous Waste Management. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. 397 - 405.
114. **Smith, M. R.** 1990. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation*. **1**: 191 - 196.
115. **Stenström, T. A.** 1989. Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**: 142 - 147.
116. **Sutherland, J. B., Rafic, F., Khan, A. A., and Cerniglia, C. E.** 1995. Mechanism of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. In Young LY, Cerniglia C.E, eds, *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. Wiley-Liss, New York, NY, USA. 269 - 300.
117. **Swisher, R. D.** 1987. Surfactant biodegradation. Surfactant Science Series 18, Marcel Dekker: New York.
118. **Szolar, O. H. J., Rost, H., Braun, R., and Loibner, A. P.** 2002. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil: minimizing sample pretreatment using automated soxhlet with ethyl acetate as extraction solvent. *Analytical Chemistry*. **74**: 2379 - 2385.
119. **Thibault, S. L., Anderson, M., and Frankenberger, W. T.** 1996. Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**: 283 - 287.
120. **Tiehm, A.** 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**: 258 - 263.
121. **Tiehm, A., Stieber, M., Werner, P., and Frimmel, F. H.** 1997. Surfactant-enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil. *Environmental Science and Technology*. **31**: 2570 - 2576.
122. **Urbieto-Garagorri, M. T., Egiarte-Intxaurza, I., and Uria-Navaridas, E.** 1999. Optimization of the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in road asphalts by HPLC with fluorimetric detection. *Química Analítica*. **18**: 197 - 202.
123. **Van Hamme, J. D., Singh, A., and Ward, O. P.** 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **67**: 503 - 549.
124. **van Herwijnen, R.** 2003. Metabolic and cometabolic biodegradation of PAHs. PhD.Thesis.University of Amsterdam.Netherlands.

125. **Volkering, F., Breure, A., Andel, J., and Rulkens, W.** 1995. Influence of non-ionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**: 1699 - 1705.
126. **Volkering, F., Breure, A. M., and Rulkens, W.** 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*. **8**: 401 - 417.
127. **Weiss, T. H., Mills, A. L., Horngerger, G. M., and Herman, J. S.** 1995. Effect of bacterial-cell shape on transport of bacteria in porous-media. *Environmental Science & Technology*. **29**: 1737 - 1740.
128. **Werf, M. J. v. d., Hartmans, S., and Tweel, W. v. d.** 1995. Permeabilization and lysis of *Pseudomonas Pseudoalcaligenes* cells by Triton X-100 for efficient production of D-malate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **43**: 590 - 594.
129. **West, C. C. and Harwell, J. H.** 1992. Surfactants and subsurface remediation. *Environmental Science and Technology*. **26**: 2324 - 2330.
130. **White, J. C. and Alexander, M.** 1996. Reduced biodegradability of desorption-resistant fractions of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and aquifer solids. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **15**: 1973 - 1978.
131. **Wick, L. Y., Springael, D., and Harm, H.** 2001. Bacterial strategies to improve the bioavailability of hydrophobic organic pollutants. In R.Stegmann, G.Brunner, W.Calmano, and G.Math (ed.), *Treatment of Contaminated Soil*, Springer-Verlag, Berlin. **1**: 203 - 217.
132. **Wick, L. Y., Wattiau, P., and Harm, H.** 2002. Influence of the growth substrate on the micolic acid profiles on *Mycobacterium*. *Environmental Microbiology*. **4(10)**: 612 - 612.
133. **Willumsen, P. A. and Arvin, E.** 1999. Kinetics of degradation of surfactant-solubilized Fluoranthene by a *Sphingomonas paucimobilis*. *Environmental Science and Technology*. **33**: 2571 - 2578.
134. **Willumsen, P. A., Karlson, U., and Pritchard, P. D.** 1998. Response of fluoranthene-degrading bacteria to surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **50**: 475 - 483.
135. **Womack, M. D., Kendall, D. A., and McDonald, R. C.** 1983. Detergent effects on enzyme activity and solubilization of lipid bilayer membranes. *Biochim.Biophys.Acta*. **733**: 210 - 215.
136. **Yeom, I. T., Ghosh, M. M., and Cox, C. D.** 1996. Kinetics aspects of surfactant solubilization of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology*. **30**: 1589 - 1595.
137. **Zang, Y., Walter, J., and Miller, R. M.** 1997. Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. *Environmental Science & Technology*. **31**: 2211 - 2217.
138. **Zhang, Y. and Miller, R.** 1992. Enhance octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology*. **58**: 3276 - 3282.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Física

Ing. María Luisa Buena Monte

Investigación de nuevas tecnologías de influencia  
de los agentes temporales en la productividad  
microbiológica de hidrocarburos aromáticos policíclicos

SOBRESACIENTE "cum laude"

Por una unidad

5

de Julio

2005

~~Signature~~

El Presidente,

~~Signature~~

N. Illiananti

El Secretario

~~Signature~~

~~Signature~~

~~Signature~~