

**BIOACCESIBILIDAD EN SUELOS DE HIDROCARBUROS
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS DEPOSITADOS DESDE LA
ATMÓSFERA.**

Memoria que presenta

Rosa Posada Baquero
para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

Sevilla, Abril 2007

Foto portada: Vista exterior de las chimeneas del polígono petroquímico Guadarranque en el Campo de Gibraltar.

Fotos contraportada: Fotografía tomada desde el interior de la refinería CEPSA situada en el polígono petroquímico Guadarranque en el Campo de Gibraltar.

**BIOACCESIBILIDAD EN SUELOS DE HIDROCARBUROS
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS DEPOSITADOS DESDE LA
ATMÓSFERA.**

Visado en Sevilla, a 13 de Abril de 2007

EL DIRECTOR

Dr. D. José Julio Ortega Calvo
Científico Titular del C.S.I.C

EL TUTOR

Dra. Dña. M^a Isabel Carretero León
Profesora Titular de la Universidad

Memoria que presenta
Dña. Rosa Posada Baquero
para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

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 “*Bioaccesibilidad en suelos de hidrocarburos aromáticos policíclicos depositados desde la atmósfera*”, presentada por Dña. Rosa Posada Baquero 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.

En Sevilla, a 13 de Abril de 2007

Fdo: D. Luis Clemente Salas

AGRADECIMIENTOS

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

En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. D. José Julio Ortega Calvo, director de este trabajo de investigación, por confiar desde un primer momento en mí y por su labor de dirección.

También quisiera agradecer de forma especial a la prof. Dra. Dña. M^a Isabel Carretero León por haber aceptado la Tutoría de esta tesis.

Al proyecto de la Junta de Andalucía “Evaluación de la Situación Ambiental del Campo de Gibraltar”.

A mis compañeros de almuerzo diario Fátima, Trini, Jaime, José María, Sete, Javi y Alegría por hacer mucho más amena nuestras horas en el instituto. Todos conseguiréis lo que os propongais.

A todas mis amigas de la facultad y muy especialmente a Agüi, por ser más que una compañera, amiga aún en la distancia, y por estar ahí siempre que la necesito.

A mis compañeros de laboratorio: Myriam, José Luis, Alfonso y Marisa por ser algo más que compañeros y por tenderme sus manos siempre que lo necesite. Siempre tendreis en mí a una amiga. Y por último a Patricia, gracias por saber escucharme, comprenderme, apoyarme y acompañarme en todos los momentos en los que lo necesité y gracias por tu aportación en la realización de este trabajo. Nunca olvidéis a vuestra amiga de Los Palacios.

Al resto de mis familiares, tíos, primos y muy especialmente a mi ABUELA, porque sólo ella y yo sabemos que hay algo especial entre nosotras. Siempre te llevaré conmigo.

A mi segunda familia, cuñados, sobrinos y muy especialmente a mis suegros Miguel y María por acogerme y tratarme como una más de los suyos.

A mis dos hermanos, Conchi y Antonio. ¡Qué haríamos sin esas risas que nos echamos de vez en cuando! Formamos entre los tres un perfecto conjunto. Espero que siempre nos sigamos apoyando mutuamente.

A mis padres, Antonio y Concha, por haber hecho el esfuerzo diario para poder ofrecerme mi carrera, por darlo todo por vuestros tres hijos, por estar de acuerdo conmigo en todas las decisiones que tomo y por todo lo que en la vida me seguís ofreciendo. Muchísimas gracias, os quiero.

A Miguel Angel, por compartir conmigo día a día la ilusión de la finalización de este trabajo, por todo lo que hemos vivido y nos queda por vivir. Siempre te apoyaré en todo lo que necesites y sobre todo gracias por apoyarme en el proyecto que acabamos de comenzar y que pronto dará su “FRUTO”. T.Q.

ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN	VII
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
I.1 INTRODUCCIÓN.	3
I.1.1 El suelo.	3
I.2 BIODEGRADACIÓN.....	5
I.2.1 Factores que afectan a la biodegradación.	7
I.3 BIODISPONIBILIDAD Y BIOACCESIBILIDAD.....	10
I.3.1 Definición de biodisponibilidad y bioaccesibilidad.....	12
I.4 MATERIA ORGÁNICA, ADSORCIÓN Y ENVEJECIMIENTO DE LOS CONTAMINANTES ORGÁNICOS HIDROFÓBICOS.	14
I.4.1 Adsorción. Papel de la materia orgánica.	14
I.4.2 Envejecimiento.	16
I.5 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.	17
I.5.1 Estructura de los HAPs.	17
I.5.2 Fuentes de HAPs en el medio ambiente.	19
I.5.3 Propiedades físicas y químicas de los HAPs.	21
I.5.4 Propiedades tóxicas de los HAPs. Vías de exposición y efectos sobre la salud.	22
I.5.5 HAPs en el medio ambiente. Deposición atmosférica.....	24
I.5.5.1 Fenómenos de deposición atmosférica de los COSV hacia los suelos.	26
I.5.6 Legislación ambiental sobre suelos contaminados por HAPs.	31
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	37
II.1 OBJETIVOS.	39
CAPÍTULO III: MATERIALES Y METODOLOGÍA	41
III.1 REACTIVOS.	43
III.2 SUELOS.....	43
III.2.1 Identificación de emplazamientos y muestreo.	44
III.2.2 Características de los suelos seleccionados para los ensayos de bioaccesibilidad.	48

III.3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL SUELO.....	54
III.3.1 Determinación del carbono orgánico.....	54
III.3.2 Determinación de la textura.....	55
III.3.3 Determinación del pH.....	56
III.4 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS HAPs DEL SUELO.....	56
III.5 ANÁLISIS DE HAPs DEL SUELO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC). VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA.....	58
III.5.1 Análisis de HAPs del suelo.....	58
III.5.2 Validación de la técnica analítica.....	62
III.6 BACTERIA, MEDIOS, CONDICIONES DE CULTIVO Y PREPARACIÓN DE INÓCULOS.....	64
III.7 ENSAYOS DE MINERALIZACIÓN Y BIODEGRADACIÓN.....	66
III.7.1 Ensayos de persistencia de HAPs.....	66
III.7.2 Cuantificación de la población microbiana degradadora autóctona de HAPs en los suelos estudiados.....	67
III.7.3 Ensayos de bioaccesibilidad.....	68
III.8 ENSAYOS DE ENVEJECIMIENTO.....	69
III.9 ENSAYOS DE ADSORCIÓN.....	70
III.9.1 Adsorción de pireno a los suelos.....	70
III.9.2 Experimentos de mineralización tras los ensayos de adsorción..	70
III.9.3 Experimentos de mineralización tras adsorción-envejecimiento.	71
III.9.4 Experimentos para comparar la mineralización en varios de los suelos seleccionados.....	71
III.10 ENSAYOS PARA LA SIMULACIÓN EN LOS SUELOS DE CONTAMINACIÓN POR HAPs DEBIDA A DEPOSICIÓN ATMOSFÉRICA DE PARTÍCULAS DE HOLLÍN.....	72
CAPÍTULO IV: RESULTADOS.....	75
IV.1 CONTENIDO EN HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN LOS SUELOS ESTUDIADOS.....	77
IV.2 SELECCIÓN DE LOS SUELOS PARA LOS ESTUDIOS DE BIOACCESIBILIDAD.....	82
IV.2.1 Determinación del contenido en materia orgánica de los suelos.	82
IV.2.2 Caracterización de la contaminación por HAPs.....	84

IV.2.3 Estimación de la persistencia de HAPs: Mineralización y volatilización.	86
IV.3 ESTIMACIÓN DE LA BIOACCESIBILIDAD DE HAPs EN LOS SUELOS SELECCIONADOS.....	90
IV.3.1 Estimación de la bioaccesibilidad de HAPs diana, mediante ensayos de biodegradación acelerada.	95
IV.4 ESTUDIO DE LOS POSIBLES FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN LA BIOACCESIBILIDAD DE HAPs EN LOS SUELOS.....	99
IV.4.1 Influencia de la materia orgánica en la bioaccesibilidad.....	99
IV.4.2 Influencia de la cantidad de microorganismos degradadores en la bioaccesibilidad.	101
IV.4.3 Influencia de la cantidad de HAPs inicial en el suelo, sobre la bioaccesibilidad.	105
IV.4.4 ADSORCIÓN DE LOS HAPs A LOS SUELOS.	109
IV.4.4.1 <i>Determinación de los coeficientes de distribución para los suelos seleccionados.</i>	109
IV.4.4.2 <i>Mineralización comparativa en varios suelos. Efecto de la capacidad de adsorción sobre la bioaccesibilidad.</i>	112
IV.4.4.3 <i>Adsorción de HAPs simulando en un suelo contaminación por deposición atmosférica.</i>	114
IV.4.5 Efecto del envejecimiento sobre la bioaccesibilidad de HAPs...	121
IV.4.5.1 <i>Influencia del envejecimiento en la adsorción.</i>	123
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	127
V.1 CONTENIDO EN HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN LOS SUELOS ESTUDIADOS.	129
V.2 ENSAYOS DE PERSISTENCIA DE HAPs.	130
V.3 ESTIMACIÓN DE LA BIOACCESIBILIDAD DE HAPs EN LOS SUELOS SELECCIONADOS.....	132
V.4 ESTUDIO DE LOS POSIBLES FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN LA BIOACCESIBILIDAD DE HAPs EN LOS SUELOS.....	133
V.4.1 Influencia de la cantidad de microorganismos degradadores en la bioaccesibilidad.	133
V.4.2 Influencia de la cantidad de HAPs inicial en el suelo.....	134
V.4.3 Adsorción de pireno a los suelos.....	136
V.4.3.1 <i>Coeficientes de distribución.</i>	136
V.4.3.2 <i>Mineralización comparativa.</i>	137

V.4.3.3 <i>Ensayo de simulación de deposición atmosférica</i>	139
V.4.4 EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE HAPs.....	140
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	143
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA	147
CAPÍTULO VIII: ANEXO	159

ABREVIATURAS

AEMA	Agencia Europea de Medio Ambiente
Ant	Antraceno
B(a)Ant	Benzo(a)Antraceno
B(a)pir	Benzo(a)pireno
B(b)Fln	Benzo(b)Fluoranteno
B(k)Fln	Benzo(k)Fluoranteno
B(ghi)p	Benzo(ghi)perileno
CE	Comisión Europea
UFC	Unidades formadoras de colonias
CG	Campo de Gibraltar
CO	Carbono orgánico
COPs	Compuestos orgánicos persistentes
COSV	Compuestos orgánicos semivolátiles
Cris	Criseno
CRM	Material certificado de referencia
C _s	Concentración de compuesto adsorbido
C _w	Concentración de compuesto en la fase acuosa
D(ah)Ant	Dibenzo(ah)Antraceno
DimeFen	Dimetilfenantreno
D.O	Densidad Óptica
EPA	Agencia de Protección Medioambiental
Fen	Fenantreno
Fln	Fluoranteno
Fno	Fluoreno
f _{oc}	Fracción de carbono orgánico
F _s	Fracción del compuesto adsorbido en el suelo
F _w	Fracción de compuesto disuelto en el agua en el equilibrio
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
I(cd)pir	Indeno(cd)pireno
K _d	Coefficiente de distribución sólido-agua
K _{oc}	Coefficiente de reparto normalizado con el carbono orgánico
K _{ow}	Coefficiente octanol-agua

LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
MeFen	Metilfenantreno
MeFln	Metilfluoranteno
MM	Medio de mineralización
MO	Materia orgánica
NAPLs	Líquidos en fase no acuosa
NGR	Nivel genérico de referencia
Pir	Pireno
RD	Real Decreto
r_{sw}	Relación sólido-agua
SPE	Extracción en fase sólida
SW	Medio Suiza
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
TSA	Agar Soja Triptona

RESUMEN

En esta tesis doctoral se ha investigado la bioaccesibilidad en suelos de hidrocarburos aromáticos policíclicos depositados desde la atmósfera. Este trabajo ha sido llevado a cabo gracias a nuestra participación dentro del proyecto “Diagnóstico de la Situación Ambiental del Campo de Gibraltar”, por ello la mayor parte de las muestras utilizadas en este estudio pertenecen a esta zona. Así el primer paso importante de este trabajo fue seleccionar y muestrear los puntos de esta zona que fuesen de interés para el desarrollo de esta tesis doctoral, teniendo en cuenta que las actividades industriales y urbanas del Campo de Gibraltar suponen una fuente potencial de contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) a la atmósfera, que pueden al menos en parte, ser transferidos a los suelos de la zona.

Inicialmente fue necesario poner a punto los métodos analíticos necesarios para poder llegar a determinar en los suelos las concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos que correspondían a niveles de fondo. Para ello se utilizaron muestras ambientales de referencia certificadas.

Una vez que estaba a punto la metodología analítica, se cuantificó el contenido en HAPs de todas las muestras de suelo. La metodología empleada para ello fue la recomendada por la EPA (US-EPA SW-846, 1995). Los valores correspondientes a las muestras del Campo de Gibraltar dieron una media, que puede considerarse como una contaminación de fondo, probablemente debido a deposición atmosférica en la mayoría de los casos. Este valor está muy próximo al contenido medio observado en suelos rurales ingleses, y se encuentra por debajo del valor de fondo considerado en otros países europeos. Tras conocer el contenido en HAPs de las muestras de suelo, se procedió a determinar la bioaccesibilidad de estos compuestos mediante el estudio de las cinéticas de biodegradación. Estas experiencias revelaron que los HAPs eran bastante persistentes en estos suelos. Posteriormente se procedió al estudio de las posibles factores que podían estar causando este efecto. Dentro de estos factores se estudiaron la influencia sobre la bioaccesibilidad de la cantidad de microorganismos degradadores, la cantidad de HAPs inicial y el efecto de la adsorción de los HAPs en el suelo. Además para poder explicar mejor el fenómeno de adsorción en nuestros suelos, se estudió la influencia de la materia orgánica, la presencia de carbono negro y el envejecimiento de los HAPs en los suelos estudiados.

Los datos obtenidos sobre la bioaccesibilidad de los HAPs sugirieron que la exposición crónica de los suelos a flujos, aunque bajos, de deposición de HAPs de la atmósfera daría lugar a la formación de fracciones muy resistentes a la biodegradación, lo que puede ser la causa de un aumento progresivo en la concentración de estos contaminantes. Este aumento ya se ha detectado en otros países con más larga tradición industrial, como por ejemplo el Reino Unido.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN



I.1 INTRODUCCIÓN.

Nuestra actividad, incluso la más normal y cotidiana, origina contaminación. Cuando usamos electricidad, medios de transporte, metales, plásticos o pinturas; cuando se consumen alimentos, medicinas o productos de limpieza; cuando se enciende la calefacción o se calienta la comida o el agua, etc. se producen, directa o indirectamente, sustancias contaminantes. Así, el aumento de la industrialización combinada con el crecimiento de la población en los países desarrollados desde los años 50 hasta la fecha, ha contribuido a un incremento significativo de la cantidad de compuestos antropogénicos en el medio ambiente.

Se podría definir la **contaminación** como la alteración del estado óptimo del ambiente como consecuencia de la adición de sustancias que en condiciones normales no se encuentran presentes o que si lo están, han aumentado o disminuido su cantidad normal.

I.1.1 EL SUELO.

El suelo es la parte superficial de la corteza terrestre que constituye un sistema complejo órgano-mineral, no renovable a corto plazo, capaz de permitir la vida y la existencia de todos los ecosistemas terrestres y de las actividades asociadas; el suelo es uno de los agentes de producción más importantes de las actividades humanas, y es el medio receptor y de soporte físico de la mayor parte de las sustancias (entre ellas los contaminantes) en la superficie de la Tierra.

El suelo está formado de un sustrato mineral, que se origina al irse fragmentando las rocas que constituyen la corteza terrestre; este rompimiento provocado por diversos factores físicos, químicos y biológicos da como resultado partículas cada vez más pequeñas que, de acuerdo a su tamaño, se clasifican en categorías como *grava*, *arena gruesa*, *arena fina*, *limo* o *arcilla*. Los diversos tipos de suelo y sus propiedades particulares dependerán de las distintas proporciones de estos diferentes tipos de partículas (textura), así como de la cantidad de agua y de aire que contenga este sustrato mineral. Ésta, a su vez, dependerá de la estructura del suelo, es decir, de los tipos de agregados a los que tienden a aglutinarse los componentes del suelo, que formarán las cavidades y grietas donde se alojan el aire y el agua.

A todos estos componentes abióticos del suelo hay que añadir otro componente sumamente importante y de una complejidad extraordinaria, como lo es la *materia orgánica*. Toda la materia de la que están formados los seres vivos se incorpora al suelo cuando éstos mueren. Esto ocurre mediante procesos muy complejos en los cuales participan una gran cantidad de microorganismos (bacterias y hongos) y otros grupos de organismos mayores que se agrupan bajo el término de edáficos (del suelo), los cuales descomponen los restos vegetales y animales hasta convertirlos en una

materia orgánica amorfa, en la cual no se distingue ninguna estructura definida, conocida como *humus*. Estos organismos vivos también forman parte del suelo y viven entre los intersticios, poros y cavidades del mismo. El agua contenida en los poros del suelo contiene sales minerales y nutrientes y es el medio en el cual se puede desarrollar la actividad metabólica de los microorganismos que lo colonizan. El contenido en agua de un suelo puede oscilar, afectando así a dicha actividad.

El conjunto de las propiedades físicas, químicas y biológicas hacen del suelo un sistema clave en el control de los ciclos biogeoquímicos superficiales para lo cual actúa como un reactor complejo, capaz de realizar funciones de filtración, descomposición, neutralización o inactivación, almacenamiento y regulación de la concentración en disolución y de la movilidad de un gran número de sustancias. Con ello sirve como una barrera protectora de otros medios más sensibles, como los hidrológicos y los biológicos. Es necesario tener en cuenta que esta capacidad tiene un límite diferente para cada tipo de suelo y condiciones, cuando se alcanza ese límite puede funcionar como una “fuente” de sustancias peligrosas para los organismos o para otros medios relacionados con él y que pueden afectar al hombre y a los demás seres vivos.

El suelo constituye una interfase entre la atmósfera y las aguas subterráneas, con lo que cualquier tipo de impacto que incida en él, tendrá repercusiones a corto o medio plazo en los otros dos medios. La industrialización, los procesos de depuración industriales, las prácticas agrícolas en ocasiones inadecuadas, han supuesto en las últimas décadas una importante fuente de contaminación del medio edáfico. Con una protección integrada de los suelos pueden obtenerse importantes beneficios en el aire, el agua, la lucha contra el cambio climático y la diversidad biológica.

La **contaminación del suelo** podría definirse como la existencia de un agente o conjunto de agentes que provocan una perturbación en el medio, o como el proceso o conjunto de procesos que disminuyen la capacidad potencial del suelo para producir bienes.

Actualmente, la contaminación de los suelos se encuentra cada vez más en el punto de mira de la gestión medioambiental, debido principalmente al riesgo que un suelo contaminado puede suponer para la salud humana y para el correcto funcionamiento de los ecosistemas.

En la mayoría de las ocasiones, la contaminación del suelo es producida de una manera artificial por la actividad humana, pero también puede ser ocasionada de una forma natural, aunque ésta no sea la más común. Las actividades potencialmente contaminantes de suelos son muy variadas: acumulación de residuos sólidos o líquidos en balsas más o menos preparadas sobre el terreno, emisiones a la atmósfera, escombreras ilegales, usos fitosanitarios desmedidos o incontrolados, etc.

En general, los contaminantes que se encuentran en el suelo son: metales pesados, contaminantes orgánicos y exceso de sales. Las actividades que pueden dar origen a la contaminación pueden ser debidas a focos puntuales

(la mayor parte de éstas derivan de la industria y sus actividades asociadas) o focos difusos (como por ejemplo las actividades del sector agrícola o ganadero).

Los contaminantes orgánicos se pueden encontrar en el suelo en forma líquida, solubles en el agua del suelo, adsorbidos por el suelo y en la atmósfera edáfica.

Una vez liberados a los suelos, una compleja serie de procesos de transformación interviene en el destino de estos contaminantes orgánicos. Las modificaciones pueden ser abióticas y biológicas. Las primeras incluyen reacciones fotoquímicas (en zonas expuestas) y químicas, y, aunque pueden destruir o alterar significativamente al compuesto, nunca lo convierten en productos inorgánicos. Muchas de estas reacciones sólo dan lugar a ligeras modificaciones del compuesto, siendo el producto muy similar al precursor en estructura y toxicidad. Las modificaciones biológicas consisten en reacciones enzimáticas que frecuentemente dan lugar a una transformación profunda del contaminante. A estas reacciones se les denomina biodegradaciones.

I.2 BIODEGRADACIÓN.

La biodegradación es un término genérico que se ha acuñado para referirse a la actividad metabólica que llevan a cabo todos los seres vivos (microorganismos, plantas y animales) para asimilar o modificar todo tipo de sustancias presentes en el medio ambiente. Aunque generalmente se aplica a compuestos de naturaleza orgánica, también puede referirse a sustancias inorgánicas. Los procesos biodegradativos más frecuentes se llevan a cabo en presencia de oxígeno (biodegradación aeróbica), pero algunos microorganismos también son capaces de degradar compuestos en ausencia de oxígeno (biodegradación anaeróbica). Se denomina mineralización a la biodegradación de una sustancia orgánica para dar compuestos de naturaleza inorgánica (agua, óxidos, sales, etc.). A veces los compuestos no se mineralizan, sino que se transforman en otros diferentes (biotransformación) que pueden ser incorporados por el propio organismo que los transforma o secretados al medio ambiente. En ocasiones los compuestos contaminantes no se degradan, pero se acumulan en una forma inerte en el interior del organismo (bioacumulación), disminuyendo su toxicidad. Es el caso de muchos metales pesados que los microorganismos pueden inmovilizar mediante precipitación o formación de complejos insolubles.

La mayoría de los compuestos orgánicos naturales (aquellos que no derivan de la actividad industrial del hombre) pueden ser mineralizados rápidamente por diversos seres vivos. Estos compuestos llevan presentes en la naturaleza cientos de millones de años, que es un tiempo suficientemente largo como para que muchos organismos hayan podido desarrollar la capacidad de utilizarlos como fuente de carbono y energía. Sin embargo, existen varios

compuestos naturales que poseen una estructura química muy estable y que, por tanto, son muy difíciles de biodegradar. Su degradación completa suele requerir largos periodos de tiempo. Un ejemplo de este tipo de compuestos es la lignina, un polímero de moléculas con estructura aromática que confiere la rigidez a las plantas, y que por tanto es muy abundante en la naturaleza.

Las rutas de biodegradación de los contaminantes varían en función de la estructura química del compuesto y de las especies microbianas degradadoras. Estas rutas incluyen reacciones de oxido-reducción, procesos de sorción e intercambio iónico, e incluso reacciones de acomplejamiento y quelación que resultan en la inmovilización de metales (Eweis et al., 1998).

Degradación biológica de compuestos orgánicos: los procesos de biodegradación más importantes conllevan la oxidación biológica de los contaminantes orgánicos (figura I.1).

Los compuestos biodegradables se encuentran inicialmente vinculados a enzimas extracelulares y son transportados a través de la membrana celular. Entonces, se producen una serie de reacciones de transformación en las cuales se separan los electrones del compuesto y se oxida la estructura de carbono. La energía desprendida en las reacciones se emplea para la síntesis de nuevo material celular, para la reparación del material dañado, el transporte de compuestos al interior de la célula y, en algunos casos, para el movimiento. Una vez los contaminantes orgánicos han sido convertidos en CO_2 y H_2O , se dice que se ha producido **la mineralización**. Nunca se produce mineralización completa, debido a que una parte del material orgánico se transforma en células y una parte importante de la masa celular es, en efecto, no biodegradable. Sin embargo, la transformación de materiales tóxicos y peligrosos en una combinación de CO_2 , H_2O y nuevas células, elimina la mayor parte de los problemas que requieren recuperación.

La biodegradación no siempre acaba en mineralización. El cambio en la estructura molecular de un contaminante durante la biodegradación puede llevar a la obtención de productos diferentes al compuesto reactivo, pero tóxicos o peligrosos. Los productos no mineralizados están, por lo general, más oxidados y son menos volátiles que el compuesto original.

Sin embargo, los productos suelen difundirse hacia el terreno en mayor medida que el compuesto original, haciendo que su recuperación sea más difícil de llevar a cabo.

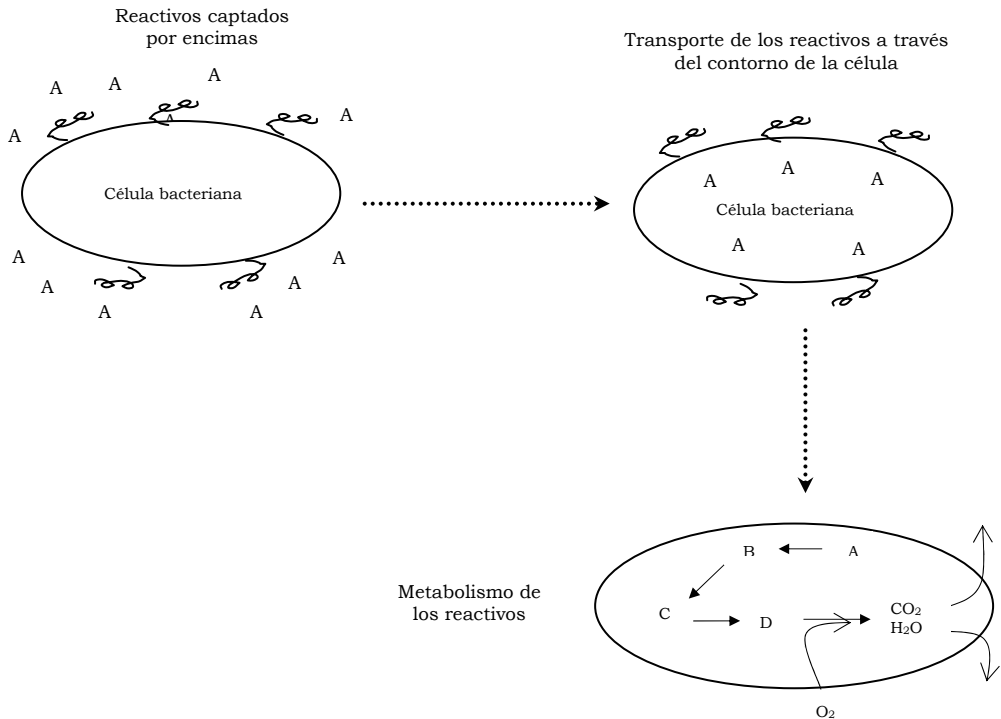


Figura I.1. Esquema de un proceso de biodegradación. Un reactivo orgánico A se encuentra vinculado a una enzima extracelular y como consecuencia de ello, es transportado al interior de la célula. El proceso de oxidación biológica conlleva una serie de reacciones en las cuales se separan los electrones del compuesto y la energía desprendida se emplea en la síntesis de nuevo materia celular (crecimiento), reparación del material dañado (mantenimiento) y transporte de nutrientes en sentido opuesto al gradiente de concentraciones, a través del contorno de la célula (Eweis et al., 1998).

I.2.1 FACTORES QUE AFECTAN A LA BIODEGRADACIÓN.

La biodegradación de los hidrocarburos presentes en un suelo contaminado depende de varios factores, los cuales pueden clasificarse en tres grandes grupos: medioambientales, físicos y químicos.

a) Factores medioambientales

Los factores medioambientales son aquellos necesarios a la hora de proporcionar las condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos que llevan a cabo la biodegradación.

Los microorganismos son muy sensibles a los cambios de temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, oxígeno y humedad. No existen unas condiciones preestablecidas que sean óptimas en todos los casos, pero en

términos generales puede decirse que los rangos óptimos para la biodegradación son: pH entre 6 y 8 y temperaturas entre 20 y 30°C (Alexander, 1999).

En los sistemas no biológicos, las velocidades de reacción generalmente aumentan con la temperatura. Sin embargo, los microorganismos tienen regiones de temperaturas óptimas y temperaturas por encima de las cuales la actividad microbiana se detiene.

La temperatura es uno de los factores mediambientales más importantes que afecta a la actividad metabólica de los microorganismos y a la tasa de biodegradación. Las bacterias de un terreno actúan habitualmente en el intervalo de 5 a 40°C, aunque la temperatura óptima dentro de dicho rango depende de cada especie.

La variación del pH del suelo afecta a la actividad microbiana y también a la adsorción-desorción de los contaminantes. Con frecuencia, los mohos y levaduras realizan mejor su cometido a valores de pH bajos que a pH neutros o básicos. De forma similar, las bacterias del género *Thiobacillus* oxidan los sulfuros a sulfatos y a menudo se desarrollan perfectamente a valores de pH tan bajos como pH 1, deteniendo su crecimiento a valores de pH superiores a 6. 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 pH 7 y 8 (Dibble y Bartha, 1979).

Los nutrientes son aquellos compuestos químicos necesarios para el crecimiento microbiano que no proporcionan energía o carbono a los organismos. Los nutrientes que se precisan con mayor frecuencia son el nitrógeno y el fósforo, cuyas cantidades son normalmente insuficientes en el suelo, mientras que otros nutrientes esenciales como Ca^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} y SO_4^{2-} sí están presentes en cantidades suficientes en el suelo (Menn et al., 2000). La adición de fuentes de N y P inorgánicas, generalmente tiene un efecto positivo incrementando las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados (Chaineau et al., 2003).

La humedad constituye un factor importante en la biodegradación, de forma que puede limitar a ésta en cierta medida, debido a que los microorganismos obtienen todos los nutrientes necesarios para su crecimiento de soluciones. Desafortunadamente, la solubilidad del oxígeno en agua es muy baja (9 mgL⁻¹ a 20°C) y contenidos altos de humedad se traducen en una baja disponibilidad del oxígeno, ya que el exceso de agua en un suelo desplaza el aire residente en los poros del suelo, generándose con mayor facilidad condiciones anaeróbicas, al agotarse el oxígeno disuelto en el agua (Alexander, 1999).

b) Factores físicos

Los factores físicos de mayor importancia en la biodegradación son la disponibilidad del contaminante para los microorganismos (biodisponibilidad), la presencia de agua y la provisión de un aceptor de electrones adecuado como, por ejemplo, el oxígeno.

La **disponibilidad** constituye un concepto complejo, relacionado con la afinidad de los contaminantes por las fases sólida y gaseosa, la estructura intersticial de las fases sólidas y la presencia de las comunidades microbianas adecuadas. Todos los contaminantes tienen cierta afinidad hacia ambas fases. Muchos de los contaminantes más habituales poseen una baja solubilidad en agua y son absorbidos con gran intensidad por partículas sólidas. Por ejemplo, los hidrocarburos derivados del petróleo son, en general, apolares y, de entre todas las fases, tienden a distribuirse en la fase sólida principalmente, lo que resulta en unas concentraciones de contaminante en la fase líquida muy bajas. Los contaminantes pueden acumularse en intersticios microscópicos demasiados pequeños para que las bacterias los colonicen. Debido a que los microorganismos toman los nutrientes de la fase líquida, la tasa de biodegradación puede verse limitada por la velocidad con que se produce la desorción. Asimismo, los hidrocarburos ligeros tienden a distribuirse principalmente en la fase gaseosa y la transferencia gas-líquido puede llegar a convertirse en el proceso limitante de la ya mencionada tasa. En general, los procesos de tipo *in situ* no incrementan la disponibilidad, debido a que los contaminantes pueden quedar retenidos en el interior de los intersticios; los procesos *ex situ* permiten un mayor control. Mediante la excavación y la mezcla que comprenden procesos tales como tratamiento en lechos o sólidos en suspensión, se desmenuzan los agregados y los microorganismos tienen, entonces, una probabilidad mayor de entrar en contacto con los contaminantes. La mezcla en tratamiento de sólidos en suspensión se traduce en una agitación y un lavado superficial, los cuales pueden dar lugar a la emisión de algunos de los contaminantes adsorbidos. En los tratamientos *in situ*, a veces se emplean los surfactantes para desorber y solubilizar los compuestos químicos.

La presencia de agua es necesaria ya que, como se ha visto con anterioridad, los microorganismos toman el carbono orgánico, los nutrientes inorgánicos y los aceptores de electrones, necesarios para el crecimiento microbiano, de la fase líquida. Por lo tanto, el agua debe estar en contacto con los contaminantes y estar presente en cantidades que permitan el desarrollo de las comunidades microbianas. Sin embargo el agua puede llegar a inhibir el flujo de aire y reducir el suministro del oxígeno necesario para la respiración microbiana. Existen valores de humedad óptima para la biodegradación de terrenos no saturados, que habitualmente están entre 150 y 250 gramos de agua por kilogramo de terreno seco.

La presencia de un aceptor de electrones adecuado. El oxígeno es el aceptor final de electrones generalmente empleado en procesos biológicos, ya

que la mayor parte de los hidrocarburos presentes en los productos del petróleo son degradados con mayor extensión y rapidez de forma aeróbica (Hollínger y Zehnder, 1996) y también es necesario en determinados tipos de reacciones de oxidación-reducción catalizadas por enzimas. Los microorganismos, oxidan compuestos orgánicos o inorgánicos, obteniendo así la energía necesaria para su crecimiento. El proceso de oxidación da lugar a electrones que intervienen en una cadena de reacciones en el interior de la célula y, al final, deben ser vertidos en el entorno. El aceptor final de electrones es el receptor de los mismos y, en el caso de un metabolismo aerobio, el oxígeno es el aceptor y el agua es el producto.

c) Factores químicos

El factor químico más importante en biodegradación es la estructura molecular del contaminante, cómo ésta afecta a propiedades químicas y físicas y su capacidad para ser biodegradado. La capacidad para ser biodegradado está relacionada con factores tales como la solubilidad, el grado de ramificación, el grado de saturación y la naturaleza y el efecto de los sustituyentes. La solubilidad constituye una propiedad fundamental, ya que los microorganismos toman nutrientes de una solución acuosa. Una elevada solubilidad se traduce en una gran disponibilidad, en potencia, de un determinado compuesto. Aunque la rotura de los enlaces carbono-carbono saturados no conlleva dificultad, el grado de saturación está relacionado con la volatilidad y la solubilidad. Los microorganismos degradan con dificultad anillos saturados, o los alcanos muy ramificados (Evants y Fuchs, 1998). Se puede comprobar la consecuencia de la ramificación de los isómeros en la capacidad relativa para ser degradados (Gibson, 1984).

La biodegradación conforma un campo multidisciplinario. Combina disciplinas tales como la microbiología, la ciencia y la química del terreno, geología e hidrogeología, así como métodos de ingeniería.

I.3 BIODISPONIBILIDAD Y BIOACCESIBILIDAD.

Uno de los principales factores influyentes en la extensión del proceso de biodegradación en los suelos y sedimentos contaminados, es la biodisponibilidad.

El término biodisponibilidad se refiere al grado de accesibilidad de un compuesto para ser asimilado por los seres vivos (Alexander, 2000). En el caso de una sustancia tóxica, cuanto más biodisponible sea, mayor será su efecto nocivo sobre los seres vivos. La biodisponibilidad está determinada por las propiedades físico-químicas del compuesto, principalmente por su solubilidad en líquidos, o su capacidad para adsorberse a sustancias sólidas o para volatilizarse. Sustancias volátiles o fuertemente adsorbidas a partículas sólidas no van estar al alcance de muchos seres vivos, lo que reduce su potencial de toxicidad. La asociación de una sustancia a

componentes sólidos del suelo como arcilla o materia orgánica, así como su solubilidad en líquidos no acuosos, limita su biodisponibilidad. La biodisponibilidad de una sustancia tóxica en el ambiente suele disminuir con el tiempo, proceso que se ha denominado “envejecimiento”. Una baja biodisponibilidad constituye una de las principales limitaciones de la recuperación de suelos y sedimentos contaminados por hidrocarburos, pesticidas y explosivos, dado que provoca que las tasas de biodegradación sean más lentas de lo deseado, dando así lugar a la persistencia de los compuestos biodegradables. Algunos organismos son capaces de aumentar la biodisponibilidad de un compuesto tóxico, por ejemplo adhiriéndose al mismo, o produciendo agentes tensioactivos-detergentes (biosurfactantes). Por otro lado, dado que una baja biodisponibilidad reduce mucho la toxicidad de un compuesto, en algunas ocasiones se recurre a la disminución de la biodisponibilidad como método para remediar un suelo contaminado. Por ejemplo, puede lucharse contra la contaminación de suelos por metales disminuyendo la acidez del suelo, lo que provoca la precipitación del metal que, de esta forma, deja de estar biodisponible para los seres vivos.

En general, la velocidad con la cual la célula microbiana puede transformar compuestos durante la biodegradación, depende de dos factores: (a) la velocidad de ingerir y metabolizar por los microorganismos (actividad intrínseca de la célula); (b) la velocidad de transformación por las células microbianas (transferencia de masa).

Los procesos implicados en la biodisponibilidad son los siguientes:

a) Adsorción-Desorción. Las superficies de los suelos más activas en términos de adsorción son las de las arcillas y la materia orgánica.

Las arcillas, con carga externa negativa y gran superficie específica, son capaces de adsorber principalmente cationes. Los compuestos orgánicos cargados positivamente pueden por tanto ser adsorbidos fuertemente por las superficies internas y externas de las arcillas.

La fracción orgánica de los suelos es también responsable de la adsorción de muchos compuestos, particularmente de aquellos que son hidrófobos.

Hay que tener en cuenta que cuando la adsorción es fuerte retira el sustrato de la fase acuosa, por lo que se puede decir que la adsorción inhibe la biodegradación; además una vez que los compuestos se adsorben, pueden penetrar en el interior de los agregados del suelo a lo largo del tiempo, y esto es a lo que se le llama envejecimiento, lo cual haría más difícil la biodisponibilidad (Weissenfels et al., 1992).

En resumen, como consecuencia del fenómeno de adsorción, las moléculas de compuestos orgánicos se encuentran retenidas sobre la superficie de los coloides minerales y orgánicos, encontrándose en unas condiciones fisicoquímicas particulares, que son las del estado adsorbido y adquiriendo un comportamiento diferente de las moléculas en solución. Esta adsorción modifica la actividad microbiana, el proceso de degradación y el transporte de estos compuestos en el suelo.

b) Reparto. Este proceso se estudia por lo que se denomina el coeficiente de octanol/agua (K_{ow}) del compuesto en cuestión y que se define como la concentración del compuesto en n-octanol dividida por la correspondiente en agua (se considera que el octanol reproduce con bastante fidelidad las propiedades adsorbentes de la materia orgánica). Con este coeficiente se puede definir la hidrofobicidad de un compuesto.

La adsorción esta relacionada con K_{ow} de tal forma que, compuestos de moléculas pequeñas y polares presentan K_{ow} bajos y tienen poca tendencia a adsorberse en suelos. Compuestos con moléculas grandes y poco polares o apolares presentan K_{ow} elevados y tienen tendencia a adsorberse (éste es el caso de los HAPs).

c) Adhesión. La capacidad que poseen determinadas bacterias para adherirse a los cristales de los contaminantes hidrófobos o a los denominados NAPLs, gracias a las propiedades físico-químicas de la pared bacteriana, es un mecanismo desarrollado por las bacterias que puede aumentar la disponibilidad del contaminante (Junker et al., 1998).

La biodegradación de los contaminantes orgánicos puede mejorarse considerablemente, mejorando la eficacia de adhesión utilizando sustratos adecuados como fuente de carbono y energía.

Para obtener una medida de la biodisponibilidad de los compuestos orgánicos hidrofóbicos en suelos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, existen numerosos métodos: extracción en fase sólida (SPE) (Cornelissen et al., 1998), oxidación con persulfato (Cuypers, 2001), extracción con solvente (Chung y Alexander, 1999), con CO_2 supercrítico, extracción con ciclodextrinas (Reid et al., 2000) y con tensioactivos (Volkering et al., 1998).

1.3.1 DEFINICIÓN DE BIODISPONIBILIDAD Y BIOACCESIBILIDAD.

Según recientes publicaciones, se debería diferenciar entre el término de biodisponibilidad y bioaccesibilidad. Atendiendo a definiciones publicadas recientemente (Semple, 2004), la definición de compuesto biodisponible y compuesto bioaccesible es la siguiente:

Compuesto Biodisponible. Es aquel que está libremente disponible para atravesar la membrana celular de un organismo desde el medio en el que el organismo habita, en un tiempo determinado (Figura I.2). Una vez que la transferencia a través de la membrana ha ocurrido, el almacenamiento, la transformación, la asimilación, o degradación pueden tener lugar dentro del organismo.

Compuesto Bioaccesible. Es aquel que está disponible para atravesar la membrana celular de un organismo desde el medio en el que el organismo habita, siempre y cuando el organismo tenga acceso al compuesto. Sin embargo el compuesto puede estar físicamente lejos del organismo o sólo biodisponible después de un periodo de tiempo. En este contexto, físicamente lejos puede referirse a un compuesto que está ocluido en la materia orgánica del suelo y de ahí que no esté disponible en un determinado tiempo (Figura

I.2). Los contaminantes pueden llegar a ser disponibles dentro de esas localizaciones (de ahí que sean biodisponibles), debido a que el contaminante se libere de su forma lábil o bien que los organismos puedan moverse hacia el contaminante. El que los contaminantes se liberen puede ocurrir en una escala de tiempo muy larga, por eso el compuesto se hace bioaccesible. En resumen, la bioaccesibilidad abarca lo que actualmente está disponible más lo que puede llegar a estarlo en un determinado periodo de tiempo.

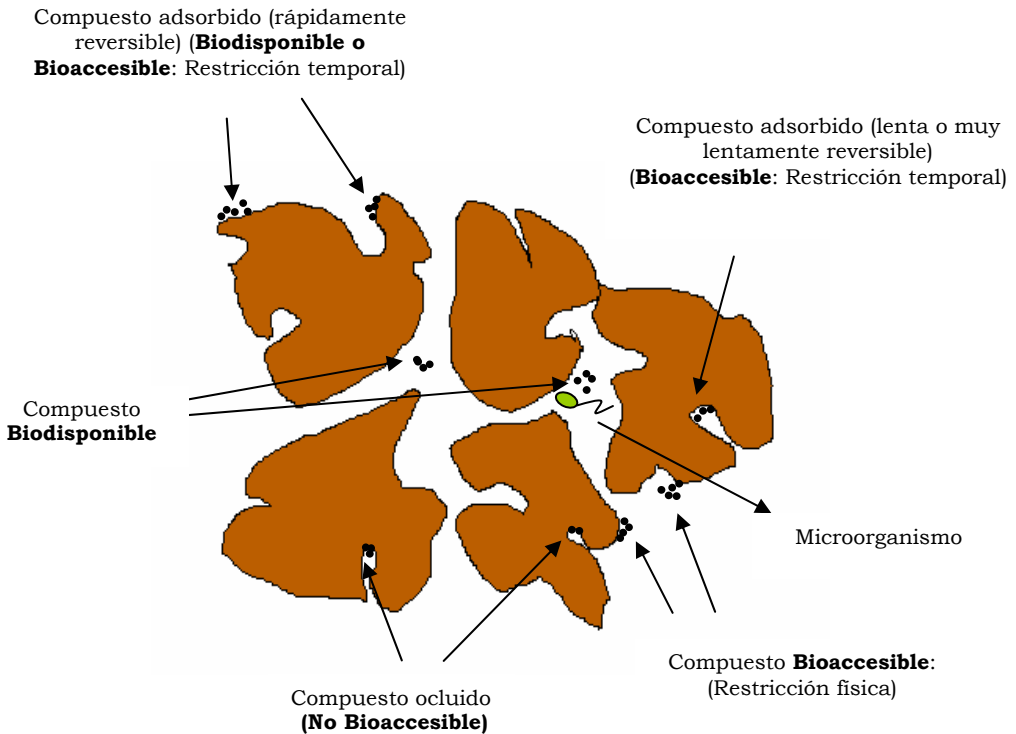


Figura I.2. Diagrama conceptual que ilustra las fracciones biodisponibles y bioaccesibles de un contaminante en un suelo según su localización física. Éste también describe las relaciones de asociación entre las moléculas del contaminante y el suelo, relacionando éstas con la fracción bioaccesible.

I.4 MATERIA ORGÁNICA, ADSORCIÓN Y ENVEJECIMIENTO DE LOS CONTAMINANTES ORGÁNICOS HIDROFÓBICOS.

I.4.1 ADSORCIÓN. PAPEL DE LA MATERIA ORGÁNICA.

La adsorción se define como “procesos en los cuales los compuestos químicos llegan a asociarse con las fases del suelo”. Es un proceso termodinámico que ocurre con una cierta velocidad y que lleva al compuesto químico (adsorbato) hacia el equilibrio entre la fase acuosa y la fase sólida (adsorbente). Un proceso fuerte de adsorción retira al adsorbato de la fase acuosa, por lo que hace a éste menos biodisponible para los microorganismos y en consecuencia hay un declive en el proceso de biodegradación (Weissenfels et al., 1992).

Existen estudios que evidencian que la adsorción ocurre en dos periodos: inicialmente un periodo rápido y reversible, seguido de un periodo lento y largo, que puede durar semanas, meses o quizás años. Es en este segundo periodo en el cual ocurre la difusión del adsorbato hacia los sitios de adsorción del suelo.

En el equilibrio al que se llega en el proceso de adsorción, el flujo neto del compuesto químico entre las dos fases es cero, lo cual significa que en ambas fases la concentración es constante. Este equilibrio es específico para cada adsorbato, así para los compuestos hidrofóbicos este equilibrio depende por un lado de la afinidad de éste por la fase acuosa y por otro del adsorbente en cuestión. Aunque también está relacionado con la temperatura, ya que por ejemplo, la afinidad de la mayoría de los compuestos orgánicos hidrofóbicos incrementa con la temperatura (Ten Hulscher y Cornelissen, 1996), y con otros factores como la salinidad, la cual también juega un papel importante.

Matemáticamente este equilibrio que ocurre entre el suelo y la fase acuosa, se representa mediante esta ecuación (Karickhoff et al., 1979):

$$K_d = C_s / C_w \quad (1)$$

donde: K_d es el coeficiente de distribución sólido-agua y se expresa en L/Kg, C_w es la concentración de adsorbato en el equilibrio y se expresa en $\mu\text{g/L}$ y C_s es la concentración de adsorbato adsorbido, que se expresa en $\mu\text{g/Kg}$.

Estudios realizados desde 1970 indican que la materia orgánica de los suelos y sedimentos es el principal factor que controla la adsorción de los compuestos orgánicos hidrofóbicos no iónicos (Chiou et al., 1979).

La materia orgánica natural del suelo puede así relacionarse con el coeficiente de distribución del equilibrio, mediante esta ecuación (Chiou et al., 1998):

$$K_d = f_{oc} * K_{oc} \quad (2)$$

Donde f_{oc} es la fracción de carbono orgánico, expresada en tanto por uno y K_{oc} es el coeficiente de reparto normalizado con el carbono orgánico, el cual representa la afinidad por la asociación de un contaminante con la materia orgánica del suelo.

Esta K_{oc} es función de la hidrofobicidad del compuesto, que es expresada mediante el coeficiente de reparto octanol-agua, K_{ow} (Dzombak y Luthy, 1984). Las relaciones entre la K_{oc} y la K_{ow} son varias según la publicación, por ejemplo (Karickhoff et al., 1979)

$$\text{Log}K_{oc} = \log K_{ow} - 0.21 \quad (3)$$

Los HAPs están caracterizados por valores de K_{ow} extremadamente altos y las presiones de vapor bajas, así la materia orgánica es un excelente adsorbente de estos compuestos (Chiou et al., 1986).

El transporte y el reparto de los HAPs depende de la interacción de estos compuestos con la materia orgánica natural del suelo. Además la biodisponibilidad de estos compuestos está fuertemente relacionada con la capacidad de adsorción de los suelos y con la materia orgánica, de forma que cuanto mayor es el contenido de materia orgánica, menos biodisponibles son estos contaminantes y en menor medida ocurre el proceso de biodegradación. Alexander comparó las tasas máximas de mineralización de fenantreno en cuatro suelos y encontró una clara reducción en el suelo que tenía un alto contenido en materia orgánica, con respecto a los otros tres suelos con menos contenido (Alexander, 1991).

La materia orgánica natural es un material heterogéneo originado por la alteración microbiana de los biopolímeros que componen el suelo (carbohidratos, lípidos, proteínas, ligninas, taninos, pigmentos, etc.). Estos biopolímeros son degradados y condensados para formar geopolímeros que incluyen ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y huminas. Más tarde estos geopolímeros en los procesos de diagénesis, etc., se transforman a la larga en grafito (Grathwohl, 1990). Además, a la heterogeneidad de la materia orgánica de un suelo hay que añadir la materia orgánica antropogénica, que incluye, por ejemplo, gasóleo, hollín o surfactantes (Luthy et al., 1997).

Debido a la complejidad de la materia orgánica del suelo, su composición estructural se describe en base a la afinidad de ésta por los compuestos orgánicos hidrofóbicos. Se describe entonces un modelo conceptual en el cual esta materia orgánica está compuesta por dos tipos principales de dominios: un dominio dúctil, altamente amorfo y denominado “fase gomosa”, y un dominio condensado, relativamente rígido y denominado “fase cristalina” (Weber et al., 1992; Weber y Huang, 1996; Xing y Pignatello, 1997).

Este “doble modelo” conceptual ha sido utilizado para interpretar la adsorción de los compuestos orgánicos hidrofóbicos, donde por un lado una absorción lineal y una rápida desorción ocurren en el dominio amorfo, y por otro lado,

una alta adsorción no lineal y lenta desorción, ocurre en el dominio cristalino (Xia y Pignatello, 2001). Este fenómeno no lineal (alta adsorción), es particularmente importante y puede tener grandes implicaciones en la disponibilidad y riesgo de los contaminantes. Esta adsorción no lineal en el dominio cristalino generalmente excede al fenómeno de absorción en el dominio amorfo en un factor de 10 a 100 (Cornelissen et al., 2005).

Es en este dominio condensado y cristalino de la materia orgánica del suelo donde se encuentran los materiales carbonáceos formados por combinación del carbón y del carbono negro (**black carbon, BC**). A esta fracción de materia orgánica se le denomina geoadsorbentes carbonáceos y es en éstos donde ocurre la fuerte adsorción de la que se habla en el doble modelo conceptual antes citado (Cornelissen et al., 2005).

La literatura es extensa para el carbono negro, el cual es un término que se usa para describir a los productos de la erosión de las rocas y el grafito, y la incompleta combustión de los combustibles fósiles.

Después de la incompleta combustión de los combustibles fósiles, tiene lugar unas reacciones de recondensación en la fase gas, lo cual da lugar a estructuras globulares aromáticas que se condensan para dar los agregados que forman el denominado “soot”, es decir, hollín (Goldberg, 1985). Este soot contiene altos niveles de compuestos altamente tóxicos como son los HAPs, y además es probablemente la fuente más importante de éstos en el medio ambiente.

Las características del carbono negro son muy variables pero, generalmente, las partículas del BC son de estructura tridimensional compuestas de aromáticos apilados y cuyo tamaño de partículas son del rango de nm- μ m, con una superficie específica espacial muy variable (de 2 a 776 m²/g) y cuya nanoporosidad es del rango de < 10Å³. Del carbono orgánico total, el BC supone el 9% en sedimentos y el 4% en suelos (Goldberg, 1985).

Con todo esto, la presencia de los geoadsorbentes carbonáceos pueden explicar:

- 1º) Que la adsorción en los suelos y sedimentos sea dos órdenes de magnitud más alta que la esperada si sólo hubiese adsorción en la materia orgánica amorfa.
- 2º) Existe una limitación potencial para la degradación por microorganismos.
- 3º) El carbono negro actúa como una fase fuertemente adsorbente de los compuestos orgánicos hidrofóbicos, HAPs (Lohmann et al., 2005).

1.4.2 ENVEJECIMIENTO.

Una vez que los compuestos se adsorben, pueden penetrar en el interior de los agregados del suelo a lo largo del tiempo, y esto es a lo que se le llama **envejecimiento** (Weissenfels et al., 1992).

La incorporación de los compuestos orgánicos a los suelos implica a menudo dos procesos cinéticamente distintos: un proceso inicial rápido y reversible, seguido de un periodo largo y lento que puede ocurrir en unas semanas, meses o quizás años. Es esta lenta adsorción la que conlleva a una fracción de estos compuestos que serán resistentes a la desorción. Es en este caso en el que se habla de compuestos envejecidos.

Han sido varios los mecanismos descritos para el envejecimiento de los compuestos orgánicos en suelos y sedimentos pero, de forma esquematizada, podría decirse que en el envejecimiento están implicados varios procesos: difusión hacia los microporos del suelo, reparto dentro de la materia orgánica del suelo, alta adsorción a la superficie del suelo, o bien una combinación de estos procesos (Steinberg et al., 1987) (Brusseau et al., 1991; Wu y Chschwend, 1986). De esta forma la tasa de biodegradación de los compuestos envejecidos puede estar limitada por la tasa de difusión desde los microporos, la repartición hacia fuera de la materia orgánica, o la desorción desde la superficie (Alexander y Scow, 1989).

Se cree que durante el envejecimiento, las moléculas se mueven lentamente hacia el interior de la matriz del suelo, donde los sitios no son accesibles ni para los microorganismos más pequeños.

Existen numerosos estudios que evidencian que el tiempo de residencia del compuesto en el suelo, tiempo de envejecimiento, afecta notablemente a la biodegradación de éste (Hatzinger y Alexander, 1995). Para un determinado compuesto, cuanto mayor es el tiempo de residencia menor es la tasa máxima de mineralización y menor es el porcentaje final mineralizado (Namhyun y Alexander, 1998). De esta forma cuanto mayor es este tiempo de residencia menos biodisponible es el compuesto para los microorganismos. Por lo que el envejecimiento de los contaminantes orgánicos hidrofóbicos, disminuye la biodisponibilidad de éstos.

I.5 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.

I.5.1 ESTRUCTURA DE LOS HAPs.

La familia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) es un grupo de hidrocarburos que consisten en moléculas que contienen dos o más anillos aromáticos fusionados y como característica común presentan baja solubilidad en agua y elevada solubilidad en disolventes orgánicos. Existen más de 100 clases diferentes de HAPs, pero solo 16 han sido considerados por la US-EPA (Organismo Oficial denominado Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos) como contaminantes prioritarios (figura I.3).

La selección de estos compuestos se ha basado en un número variado de factores como son su toxicidad, la facilidad de obtener información acerca de

ellos, la exposición humana de estos compuestos a lo largo de la historia y su frecuente aparición en lugares contaminados.

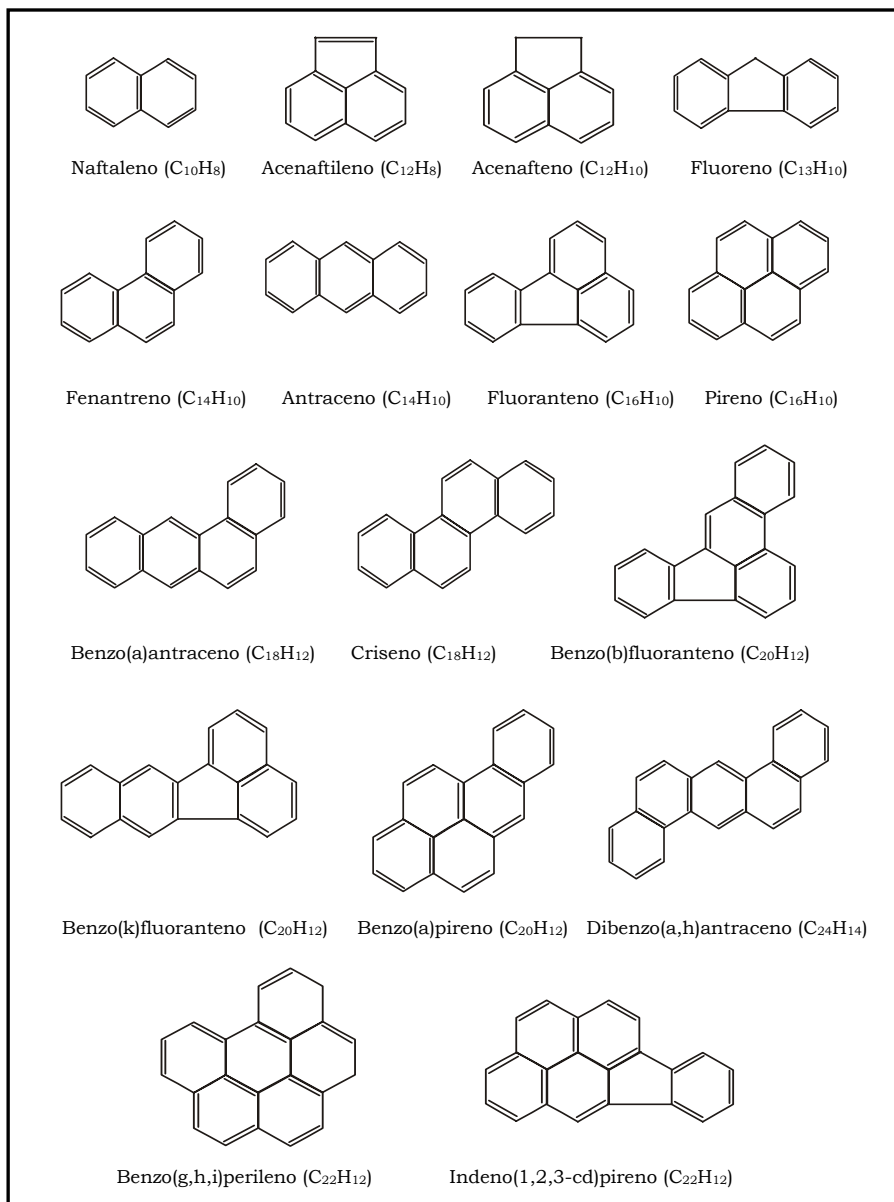


Figura 1.3. Nombre y estructura de los hidrocarburos aromáticos policíclicos clasificados por la US-EPA como contaminantes prioritarios.

I.5.2 FUENTES DE HAPs EN EL MEDIO AMBIENTE.

Los HAPs son compuestos naturales obicuos presentes en el medio ambiente. El crecimiento industrial ha supuesto un aumento de gran número de contaminantes en el entorno natural, entre ellos los HAPs.

Aunque el origen de estos compuestos en el medio ambiente es muy diverso, se pueden diferenciar básicamente tres fuentes:

- Origen pirolítico: la mayoría de los HAPs presentes en el medio ambiente se deben a la combustión incompleta de la materia orgánica a altas temperaturas. Esta combustión puede ser de origen natural (fuegos forestales, erupciones volcánicas, etc.), o antropogénica (utilización de combustibles fósiles, emisiones de los vehículos, humo del tabaco, sistemas de calefacción, craking del petróleo, incineración de residuos, etc.).
- Origen diagenético: la materia orgánica sedimentada puede sufrir una serie de procesos geoquímicos naturales como son la descarboxilación, aromatización, desfuncionalización, etc., para convertirse en HAPs de origen natural. Entre estos se encontrarían por ejemplo ciertos derivados del criseno.
- Origen petrogénico: los vertidos del petróleo y sus derivados son la principal fuente de entrada de los HAPs en el medio ambiente. Estos vertidos se caracterizan por ser mezclas complejas de compuestos orgánicos, siendo los HAPs los más abundantes, tanto en el petróleo crudo como en sus derivados.

Una vez liberados al medio ambiente, los HAPs pueden repartirse entre el aire, el agua, el suelo o los sedimentos y sufrir transformaciones químicas o fotoquímicas que darán lugar a productos más o menos inertes dependiendo de las condiciones.

La mayoría de los HAPs no se presentan en el medio ambiente como compuestos simples, sino que se suelen presentar como mezclas complejas. Para poder identificar cuál es la fuente de HAPs en una muestra determinada, se utiliza las relaciones entre varios de estos compuestos dentro de esta mezcla compleja. Por ejemplo, la mayoría de los HAPs producidos por fuentes antropogénicas son de bajo peso molecular. Cuando los HAPs se deben a una fuente pirogénica abundan los compuestos de 4 y 5 anillos.

En la tabla I.1 se presentan algunas de las relaciones que se usan para diferenciar fuente petrogénica y fuente pirogénica de HAPs (Bucheli et al., 2004).

Tabla I.1. Relaciones de HAPs para diagnosticar las fuentes de estos compuestos (Bucheli et al., 2004).

Relaciones	Valor o rango	Indicativo de ...
Ant/(Ant y Fen)	< 0,1	Petróleo/fuente petrogénica
	> 0,1	Combustión
Fln/(Fln y Pir)	< 0,4	Petróleo/fuente petrogénica
	0,4 – 0,5	Combustión de vehículos diesel y gasolina
	> 0,5	Combustión de pasto, madera y carbón
B(a)Ant/(B(a)Ant y Cri)	< 0,2	Petróleo/fuente petrogénica
	0,2 – 0,35	Petróleo, fuente petrogénica o combustión
	> 0,35	Combustión
I(cd)pir/(I(cd)pir y B(ghi)p)	< 0,2	Petróleo/fuente petrogénica
	0,2 – 0,5	Combustión de combustibles líquidos
	> 0,5	Combustión de pasto, madera y carbón
(MeFen y Ant)/Fen	0,5	Fuente pirogénica
(MeFln y Pir)/Pir	5,0	Fuente petrogénica
	0,3	Fuente pirogénica
	4,0	Fuente petrogénica
	1,7-/(1,7 y 2,6)dimeFen	< 0,45
	0,45 – 0,7	Mezcla de combustiones, combustión de carbón, fuentes petrogénicas
	0,7 – 0,9	Combustión de madera

I.5.3 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS HAPs.

A temperatura ambiente los HAPs se encuentran normalmente en estado sólido. Las características comunes de estas sustancias son puntos de fusión y ebullición elevados, presión de vapor baja y solubilidad en agua muy baja, la cual decrece al aumentar el peso molecular y tamaño de la molécula. Son solubles en disolventes orgánicos y por tanto, hidrofóbicos. La alta hidrofobicidad de la mayoría de los HAPs indica una gran afinidad por la parte lipídica de los organismos y por la materia orgánica natural de los suelos y sedimentos (Karickhoff y Morris, 1985). Así que son potencialmente bioacumulados y concentrados en sedimentos y suelos en función de su persistencia; existen estudios que evidencian que los HAPs pueden permanecer inalterables en el suelo por muchos años (Hatzinger y Alexander, 1995).

Como regla general, la persistencia del compuesto aumenta al aumentar el tamaño de la molécula. Por ejemplo, la relativa baja persistencia del naftaleno y otros compuestos de bajo peso molecular indican su escasa capacidad de bioacumulación. Mientras que los compuestos de mayor peso molecular, como el benzo[a]pireno, son altamente persistentes y por tanto bioacumulables (Heitkamp y Cerniglia, 1987; Kanaly y Harayama, 2000). Así se ha observado que en sistemas acuáticos el benzo[a]pireno presenta una vida media superior a 300 semanas frente a las 5 semanas que presenta el naftaleno.

En la tabla I.2, se recogen algunas propiedades físicas de estos HAPs. Como resumen de este apartado se podría destacar que las propiedades fisicoquímicas de los HAPs a menudo desafían la fisiología de los microorganismos degradadores. La baja solubilidad de estos compuestos, así como su gran afinidad por las superficies sólidas y por fases orgánicas líquidas (“nonaqueous phase liquids” – NAPLs), pueden causar su baja biodisponibilidad para ecosistemas microbianos potencialmente capaces de disipar estos contaminantes en suelos y sedimentos. Así, la biodisponibilidad es un parámetro relevante en la atenuación natural de estos contaminantes.

Tabla I.2. Propiedades fisico-químicas de los HAPs (U.S.Department of Health and Human Services, 1995).

Compuesto	PM ^a	Punto Fusión (°C)	Punto Ebull. (°C)	Solubilidad Agua (mg L ⁻¹)	Presión de vapor ^b	log K _{ow} ^c
Naftaleno	128	80	218	30,0	-	3,37
Acenaftileno	152	92	265	16,1	9 x 10 ⁻¹	4,07
Acenafteno	154	96	279	3,47	3 x 10 ⁻¹	4,33
Fluoreno	166	116	298	1,8	9 x 10 ⁻²	4,18
Fenantreno	178	101	340	1,29	2 x 10 ⁻²	4,50
Antraceno	178	218	342	0,073	1 x 10 ⁻³	4,45
Fluoranteno	202	110	375	0,260	1,2 x 10 ⁻³	5,33
Pireno	202	150	404	0,135	6 x 10 ⁻⁴	5,0
Benzo(a)antraceno	228	159	435	0,014	2,8 x 10 ⁻⁵	5,61
Criseno	228	256	448	0,0006	5,7 x 10 ⁻⁷	5,86
Benzo(b)fluoranteno	252	168	481	0,0012	6,7 x 10 ⁻⁵	6,57
Benzo(k)fluoranteno	252	217	480	0,0005	5,2 x 10 ⁻⁸	6,84
Benzo(a)pireno	252	179	495	0,0038	7 x 10 ⁻⁷	6,0
Dibenzo(a,h)antraceno	278	267	524	0,0005	3,7 x 10 ⁻⁸	6,75
Benzo(g,h,i)perileno	176	278	550	0,00026	-	7,23
Indeno(1,2,3-cd)pireno	276	162	536	0,062	1,3 x 10 ⁻⁸	7,66

^a Peso molecular. ^b 25°C. ^c coeficiente de octanol/agua.

I.5.4 PROPIEDADES TÓXICAS DE LOS HAPs. VÍAS DE EXPOSICIÓN Y EFECTOS SOBRE LA SALUD.

Los HAPs están presentes en todo el medio ambiente y podemos estar expuestos a estas sustancias en el hogar, en el aire libre o en el lugar de trabajo. Es más probable que en el medio ambiente estemos expuestos a los vapores de los HAPs o a los HAPs que están adheridos al polvo y a otras partículas presentes en el aire. Las fuentes de exposición son, entre otras, el humo del cigarrillo, los gases de los tubos de escape de los vehículos, las carreteras de asfalto, el carbón, el alquitrán, los incendios forestales, los incendios agrícolas, la quema de madera en las casas, la incineración de desechos industriales y municipales, y los sitios de desechos peligrosos.

En el hogar, los HAPs están presentes en el humo del tabaco, en el humo producido al quemar madera, en los productos de madera tratados con creosota, en cereales, granos, harina, pan, vegetales, frutas, carne y alimentos procesados o escabechados. Los alimentos cultivados en suelos contaminados o en atmósferas contaminadas también contienen HAPs. Cocinar carne y otros alimentos a altas temperaturas, lo cual ocurre al asar a las brasas o al carbón, aumenta las cantidades de HAPs presentes en los alimentos. Las fuentes principales de exposición a los HAPs para la mayoría de la población de Estados Unidos son la inhalación de compuestos del humo del tabaco y de la madera, el aire ambiente y el consumo de HAPs en los alimentos. En algunas personas, la principal fuente de exposición a los HAPs ocurre en el lugar de trabajo. Se han encontrado HAPs en las plantas de producción de alquitrán, de coque, de betún y asfalto, en los lugares donde se realiza la gasificación del carbón, en ahumadores, en plantas de producción de aluminio, en instalaciones para la aplicación de alquitrán y en incineradores de basuras municipales.

Los trabajadores pueden estar expuestos a los HAPs a través de la inhalación de los gases de los tubos de escape de los motores y por utilizar productos que contienen HAPs provenientes de diferentes industrias como la minería, la refinación del petróleo, la producción de compuestos químicos, el transporte y la industria eléctrica. También se han encontrado HAPs en otras instalaciones donde se utiliza petróleo, productos derivados del petróleo o carbón o donde se incineran madera, celulosa, maíz o aceite. Las personas que viven cerca de sitios de desechos que contienen HAPs pueden estar expuestas a través del contacto con el aire, el agua y el suelo contaminados (Mastrangelo et al., 1996).

Los HAPs pueden entrar al cuerpo a través de los pulmones (generalmente se encuentran adheridos a las partículas o al polvo). Sin embargo, no se sabe cómo de rápido absorben los pulmones a los HAPs. El carácter lipofílico que poseen los HAPs tiene una gran influencia en su mayor afinidad por los tejidos vivos, en especial los ricos en grasa. Tomar agua e ingerir alimentos, tierra o partículas de polvo que contienen HAPs son otras de las rutas por las cuales estas sustancias químicas entran al cuerpo, pero generalmente la absorción es lenta cuando se ingieren los HAPs.

En condiciones normales de exposición ambiental, los HAPs podrían llegar a entrar a través de la piel si estuviésemos en contacto con partículas de suelo que contienen altos niveles de HAPs (esto podría presentarse cerca de sitios de desechos peligrosos) o si entra en contacto con aceite de cárter u otros productos (como creosota) que contienen HAPs. Los tejidos del cuerpo transforman los HAPs en muchas sustancias diferentes. Algunas de estas sustancias son más dañinas y algunas de ellas menos dañinas que los HAPs originales.

En ciertas circunstancias, los HAPs pueden ser dañinos para la salud. Varios HAPs, entre los que se incluyen benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno,

benzo[b]fluoranteno, benzo[j]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-c,d]pireno, han causado tumores en los animales de laboratorio que han respirado estas sustancias en el aire, que las han consumido o que han entrado en contacto con las mismas a través de la piel durante largos períodos de tiempo. Los estudios realizados en los seres humanos demuestran que las personas expuestas a través de la respiración o el contacto de la piel durante largos períodos de tiempo con mezclas que contienen HAPs y otros compuestos, también pueden contraer cáncer.

De entre todos los HAPs existentes, por el momento en una veintena de ellos se ha demostrado una actividad carcinogénica y mutagénica. Entre los más peligrosos destacan los derivados del antraceno a los que se le añade algún anillo bencénico. Entre estos derivados se destacan el benzo(a)pireno y el dibenzo(a,h)antraceno.

En base a la información que se tiene actualmente sobre el benzo[a]pireno, la Unión Europea ha elaborado normas y guías regulatorias para proteger a las personas contra los posibles efectos de salud causados por los HAPs. Así por ejemplo para alimentos que se consumen sin preparación, el límite máximo fijado para el benzo(a)pireno es 0,03 µg/Kg. Algunos países como Francia, Alemania, Suiza y Austria, han establecido para alimentos ahumados 1µg/Kg como máximo tolerable.

La US-EPA ha desarrollado un listado con el poder carcinógeno de algunos HAPs respecto al benzo(a)pireno (tabla I.3).

Tabla I.3. Potencial carcinógeno con respecto al benzo(a)pireno para algunos HAPs.

HAP	Potencial carcinógeno
Benzo(a)pireno	1,0
Benzo(a)antraceno	0,14
Benzo(b)fluoranteno	0,17
Benzo(k)fluranteno	0,02
Criseno	0,004
Dibenzo(a,h)antraceno	1,11

1.5.5 HAPs EN EL MEDIO AMBIENTE. DEPOSICIÓN ATMOSFÉRICA.

La principal causa de contaminación por HAPs del medio ambiente es la deposición atmosférica, aunque solo una fracción de ésta es depositada directamente en el suelo, ya que otra parte es interceptada por las plantas e incorporada a los suelos a través de la vegetación. Como consecuencia de la gran variedad de procesos que dan lugar a HAPs, éstos se han hallado en el

aire de las grandes ciudades en concentraciones elevadas debido a la densidad de automóviles o fuentes directas de combustión existentes, pero también se encuentran en las aguas, los sedimentos, los suelos o incluso en la nieve de lagos de alta montaña (Fernandez et al., 1999). Gracias a su relativa volatilidad o a su capacidad de adsorción a partículas, los HAPs se transportan a través del aire y se pueden encontrar en pequeñas concentraciones en todos los sedimentos y suelos del planeta, y se habla entonces de un nivel de fondo o de una contaminación difusa por HAPs. La contaminación difusa, la cual ha causado un gran interés en los últimos años, se caracteriza por grandes extensiones del terreno, relativamente bajas concentraciones de contaminante y la carencia de la identificación de la fuente puntual de contaminación (sources). Las fuentes de contaminación difusa de HAPs, son principalmente la combustión incompleta de la madera, del carbon, del coke para el uso doméstico, y las emisiones que provienen de la combustión incompleta del fuel en el sector del tráfico. La contaminación difusa no se restringe a los centros de las ciudades sino que suele afectar a áreas suburbanas de pueblos y ciudades. El estudio de los cambios de sus niveles de concentración en zonas remotas permite conocer si la influencia antropogénica ha dado lugar a incrementos significativos de este nivel de fondo.

En el último siglo debido a la gran actividad industrial y debido a la utilización de los productos derivados del petróleo, se ha producido un incremento de HAPs en el medio ambiente. Existen numerosos estudios que evidencian que la concentración de estos hidrocarburos ha aumentado en el suelo en los últimos años, no solo en las zonas industriales, sino también en suelos agrícolas de Europa (Cousins y Jones, 1998; Maliszewska-Mordybach, 2000) y América (Coleman y Mauro, 2002).

El suelo es el principal depósito de compuestos orgánicos semivolátiles (COSV). Los HAPs se consideran compuestos orgánicos persistentes (COPs) y semivolátiles (COSV) por lo que pueden permanecer en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo sin alterar sus propiedades tóxicas. Las propiedades semivolátiles de los HAPs les otorga gran movilidad. El recorrido de los HAPs en el medioambiente depende mucho de la forma y modo en que se incorporan. Pueden ingresar en el suelo a través de la atmósfera y de descargas o vertidos directos. Una vez los HAPs se encuentran en el suelo, las plantas pueden absorberlos a través de las raíces. Los HAPs de menor peso molecular se absorben más rápidamente que los de mayor peso molecular.

La filtración hacia el agua subterránea y la biodegradación pueden ser procesos importantes para eliminar a estos compuestos de los suelos, pero para los HAPs las pérdidas por volatilización son probablemente las que predominan. Por consiguiente los suelos pueden llegar a ser una fuente de algunos COSV a la atmósfera (Jones, 1994).

El intercambio de estos compuestos entre el suelo y el aire es importante porque, aunque el suelo es el principal depósito de los COSV en el medio ambiente, el aire es el principal portador para la exposición humana (Hipplein y McLachlan, 1998). Por lo tanto, el intercambio aire-suelo es crítico en el control del riesgo de los humanos a la exposición de los COSV del medioambiente. En la figura I.4 aparecen esquematizados los procesos involucrados en el intercambio de los COSV a través de la interfase suelo-aire.

Los principales procesos que contribuyen al intercambio aire-suelo son la deposición seca (que puede ser deposición gaseosa o deposición por partículas), la deposición mojada (por la lluvia y la nieve) y la volatilización desde el suelo. La deposición gaseosa hacia el suelo y la reemisión de los vapores desde éste son esencialmente el mismo proceso y son la llave para controlar el intercambio de los COSV. La vuelta de estos compuestos adsorbidos a las partículas del suelo dentro de la atmósfera es una ruta posible adicional de transporte para los COSV a la atmósfera, pero es relativamente insignificante comparado con la emisión gaseosa, incluso para los compuestos menos volátiles. La deposición atmosférica de los COSV ocurre directamente hacia la superficie del suelo o hacia la superficie de la vegetación que está creciendo en el mismo. Los compuestos que son tomados por la vegetación pueden entrar en el suelo cuando la vegetación cae a la superficie de éste y se descompone. Estos compuestos también pueden volatilizarse desde la vegetación y reentrar en la atmósfera.

I.5.5.1 Fenómenos de deposición atmosférica de los COSV hacia los suelos.

Los HAPs liberados a la atmósfera están normalmente presentes en la fase gaseosa o son adsorbidos por las partículas en suspensión, aunque la mayoría de los HAPs carcinogénicos están asociados con la materia particulada. Las concentraciones de HAPs en la atmósfera están altamente relacionados con el tamaño de estas partículas que son transportadas por el aire, y cerca del 90% de los HAPs totales están asociados con un tamaño de partícula menor de $3\mu\text{m}$ de diámetro (Baek et al., 1991).

Durante el tiempo de residencia de los HAPs en la atmósfera (el tiempo de vida media es de unos 30 días) estos compuestos pueden sufrir oxidaciones fotoquímicas. Las reacciones químicas de estos compuestos con contaminantes atmosféricos como el ozono, óxidos de nitrógeno, y dióxido de azufre, puede transformarlos en productos que son carcinógenos.

Además de la deposición atmosférica, otro mecanismo de los HAPs en la atmósfera es el transporte. El mecanismo de transporte más importante es el viento, llegando a encontrar HAPs en Alaska y la Antártida.

Los HAPs se transportan continuamente a través del aire, pudiendo ser depositados en lugares remotos a gran distancia de la fuente emisora, ampliando así la dimensión de un problema local o regional a una escala planetaria.

Los mecanismos de deposición son diferentes para la fase vapor y para los compuestos adsorbidos a la fase particulada, y la repartición entre estas fases controla la relativa importancia de los caminos de deposición atmosférica de los COSV a los suelos (Bidleman, 1998).

La deposición de los COSV a los suelos ocurre por la lluvia y las nevadas de los vapores y las partículas, por la deposición seca de las partículas y por la adsorción vapor a la interfase aire-suelo.

A. Deposición húmeda.

Existen dos procesos para el traslado de los COSV desde la atmósfera por deposición húmeda: a) arrastre de los compuestos que están dentro de las nubes, es decir, lluvia y b) arrastre de los compuestos que están debajo de las nubes, es decir, lavado.

Los compuestos son transferidos desde la atmósfera en episodios por precipitación, tanto en la fase vapor (los cuales están disueltos en las gotas de lluvia) como enlazados a las partículas atmosféricas (los cuales están incorporados en la lluvia dentro o por debajo de las nubes). La deposición húmeda de los gases y partículas pueden ser descritas como un proceso global usando la siguiente ecuación, donde W_T es el arrastre húmedo total:

$$W_T = W_P \phi + W_G (1 - \phi) \quad (4)$$

donde ϕ es la fracción de compuesto en el aire el cual está absorbido en aerosol.

Es asumido generalmente que el equilibrio es alcanzado rápidamente entre la fase vapor y la fase disuelta en una gota de lluvia. Se ha estimado que el equilibrio puede ser establecido mediante la fase vapor durante el tiempo que una gota de lluvia tarda en caer unos pocos metros (Ligocki et al., 1985). De esta forma el lavado del vapor, W_G , ha sido estimado usando el coeficiente de reparto aire-agua en el equilibrio o constante de Henry:

$$W_G = K_{WA} = 1/K_{AW} = C_W/C_A = RT/H \quad (5)$$

donde K_{WA} es el coeficiente de reparto agua-aire (sin dimensión), K_{AW} es el coeficiente de repartición aire-agua (sin dimensión), C_W es la concentración disuelta en el equilibrio en el agua (mol m^{-3}), C_A es la concentración en el equilibrio en el aire (mol m^{-3}), H es la constante de Henry ($\text{Pa m}^3 \text{mol}^{-1}$), R es la constante de los gases ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) y T es la temperatura absoluta.

La concentración en el aire durante la lluvia puede disminuir significativamente o incluso puede reducirse hasta cero debido a que durante el proceso de lluvia las sustancias pueden ser lavadas muy eficientemente.

El arrastre de los compuestos dentro de la fase vapor (W_G) es sólo importante para los COSV con una baja constante de Henry (por ejemplo, los HAPs con bajo peso molecular). Sin embargo, han sido observadas desviaciones del equilibrio de repartición entre el aire y la lluvia. Por ejemplo, en la niebla, las concentraciones de los COSV observadas han sido mayores que las determinadas por la ley de Henry. Se entiende que esto es debido a la presencia de materiales absorbentes dentro de las gotas. Para los HAPs con

alto peso molecular la W_G observada fue menor que la predicha por la ley de Henry (Dickhut y Gustafson, 1995).

El arrastre de las partículas (W_P), no depende de la concentración de los compuestos en las partículas. En la literatura los valores para W_P son variables, entre 100 y 100000 (Ligocki et al., 1985). W_P está relacionado con el tamaño de distribución de las partículas hacia las cuales los COSV son absorbidos. Poster y Baker en 1996 determinaron W_P para los HAP asociados con las partículas submicrométricas, y el resultado fue 10000-100000, mientras que las partículas más largas tenían W_P de un orden de magnitud más grande (100000-1000000) (Poster y Baker, 1996) .

A unas temperaturas bajas de precipitación pueden caer como nieve. Esto aumenta la cuestión de si las partículas o el arrastre del vapor por nieve es más o menos efectivo que por lluvia. Diversos autores estudiaron la deposición húmeda de los COSV por nieve (Wania et al., 1998). El arrastre de las partículas con la nieve puede ser cuantificado por las relaciones del lavado del gas y las partículas. Sin embargo, hay una escasez de datos de W_G y W_P para el arrastre con la nieve en la literatura, ya que es muy difícil distinguir a los compuestos que había inicialmente de los que han sido eliminados por la nieve. Franz y Eisenreich obtuvieron un rango de $10^5 - 5 \cdot 10^7$ para HAP y $5 \cdot 10^4 - 4 \cdot 10^6$ para PCBs, indicando que la nieve puede ser un medio muy eficiente para el arrastre del aerosol (más eficiente que la lluvia). Recientemente ha sido sugerido que estas relaciones de W_P pueden ser un error y que el arrastre de los COSV por la nieve puede ser desestimado (Wania et al., 1999).

B. Deposición seca.

El flujo de deposición seca de los compuestos adsorbidos a las partículas ($N_D(p)$), hacia la superficie del suelo ($\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$) puede ser expresado como el producto de la concentración de partícula C_Q (mol m^{-3}) por la velocidad de deposición seca V_D (m s^{-1}):

$$N_D(p) = V_D * C_Q \quad (6)$$

La velocidad de deposición seca depende de las propiedades de las partículas (como el tamaño y la densidad), de las propiedades de la superficie terrestre, como la textura y las condiciones atmosféricas como son la humedad y la velocidad del viento. Las partículas atmosféricas varían en su tamaño: partículas pequeñas ($< 0,08 \mu\text{m}$ de diámetro) las cuales son conocidas como núcleos Aitkin y aparecen en la conversión de la fase gas a la fase particulada. Estos núcleos Aitkin coagulan rápidamente para formar partículas más largas, que son las de tamaño medio ($> 0,08 \mu\text{m}$, $< 2 \mu\text{m}$). Estas partículas de tamaño medio son también conocidas como el modo de acumulación y la mayoría componen el total de todas las partículas que están en un volumen de aire. Las partículas largas ($> 2 \mu\text{m}$) están formadas principalmente por procesos naturales o actividades humanas. La fracción de carbono orgánico en el total de la materia particulada suspendida ha sido estimado como el 10-20 % (Bidleman, 1998). Las partículas más pequeñas

(< 0,1 μm) se depositan en la superficie principalmente por la difusión Browniana, las partículas medianas (entre 0,1 y 2 μm) por procesos tipo impacto y las partículas largas (> 2 μm) principalmente por fenómeno gravitacional. De esta forma es muy importante conocer cuál es el tamaño de los COSV que están enlazados a las partículas. La mayoría de los trabajos que se han realizado en la distribución del tamaño de partícula de los HAPs, muestran que éstos tienden a asociarse con la fracción aerosol.

También han sido estudiadas la distribución del tamaño de partícula de los HAPs con las variaciones estacionales y se deduce que las partículas más pequeñas llegan a ser más importantes durante el invierno (Gardner et al., 1995).

C. Deposición gaseosa seca.

La deposición gaseosa seca es el proceso mediante el cual los COSV gaseosos son transportados hacia la superficie del suelo y son absorbidos. Éste es un proceso complejo que depende de las propiedades físico-químicas de la sustancia, de las características de la superficie del suelo y de las condiciones medioambientales (especialmente de la velocidad del viento). Las condiciones superficiales estarán fuertemente influenciadas por el tipo de vegetación, si es que hay alguna creciendo en la superficie del suelo. Si la fugacidad de las sustancias en el suelo es mayor que la fugacidad de las sustancias en el aire, resultará un flujo de deposición gaseosa mayor que el flujo neto de volatilización.

El flujo ($N_D(g)$) de deposición de sustancias gaseosas en el aire hacia el suelo ($\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$) puede ser descrito con un modelo de “resistencias” (Hicks et al., 1987):

$$N_D(g) = (C_{ZR} - C_S)/(r_a + r_b + r_s) \quad (7)$$

donde C_{ZR} es la concentración en el aire con una referencia en altura Z_{REF} , C_S es la concentración en la fase gas en la parte del suelo directamente adyacente a la atmósfera, r_a es la resistencia aerodinámica hacia el transporte entre Z_{REF} y la capa límite inferior de la atmósfera turbulenta (s m^{-1}), r_b es la resistencia al transporte a través de la capa límite casi-laminar directamente adyacente a la superficie del suelo (s m^{-1}) y r_s es la resistencia en la superficie del suelo (s m^{-1}). Teniendo en cuenta que el transporte de los compuestos desde el suelo hacia el aire puede ser descrito por la misma ecuación (por ejemplo N_D puede ser negativa o positiva).

Las resistencias (r_a , r_b y r_s) son muy dependientes de la turbulencia atmosférica, de la textura de la superficie y del coeficiente de difusión molecular de la sustancia.

Una vez que los HAPs han sido depositados en el suelo, los mecanismos que pueden ocurrir se detallan a continuación.

La combinación de las características del suelo, de los HAPs y las condiciones climatológicas del sitio, pueden dar lugar a los diferentes procesos de transporte y distribución de estos contaminantes.

Los principales mecanismos de transporte y transformación de estos contaminantes en el suelo son: la advección, dispersión, lixiviación, adsorción y retardo, y la transformación química y biológica. La migración de una fase orgánica líquida inmiscible es gobernada, en gran parte, por su densidad, viscosidad y propiedades de superficie húmeda (Bonazountas y Kallidromitou, 1993).

Las moléculas de un compuesto en solución resultan adsorbidas en la superficie de un sólido por fuerzas físicas, dándose así lo que se llama adsorción física de estos compuestos. Las tasas de adsorción-desorción dependen de la concentración de contaminante en solución. Si la concentración del contaminante disuelto aumenta, la adsorción aumenta. La adsorción 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 (textura, contenido en arcilla y compuestos orgánicos, pH, humedad y temperatura). Por lo general, un aumento de temperatura o de humedad, se traduce en una menor adsorción del contaminante por parte del terreno (Dupont et al., 1998).

Los HAPs adsorbidos a los suelos pueden sufrir transformaciones debido a microorganismos y/u oxidaciones químicas y fotoquímicas. La mayor parte de estas transformaciones están relacionadas con el metabolismo de algunos microorganismos. En el suelo existe una gran variedad de poblaciones microbianas, con capacidades metabólicas distintas, que tienen un papel fundamental en la ausencia y/o permanencia de los HAPs, siendo considerado como una vía de pérdida de estos compuestos volátiles, llamada biodegradación (Alexander, 1999). La biodegradación de los HAPs depende de un número de factores entre los que se encuentra la T^a , el pH del suelo, la concentración de oxígeno en el mismo, la concentración de HAPs existente y la composición del suelo. Las propiedades físicas y químicas de estos HAPs también juegan un papel importante en su biodegradación (de la biodegradación se habla más detalladamente en el apartado I.2 de esta introducción).

La adsorción de los HAPs por las partículas del suelo y por la materia orgánica de éste, hace disminuir la disponibilidad de estos compuestos y por tanto puede limitar la biodegradación (Dabestani y Ivanov, 1999).

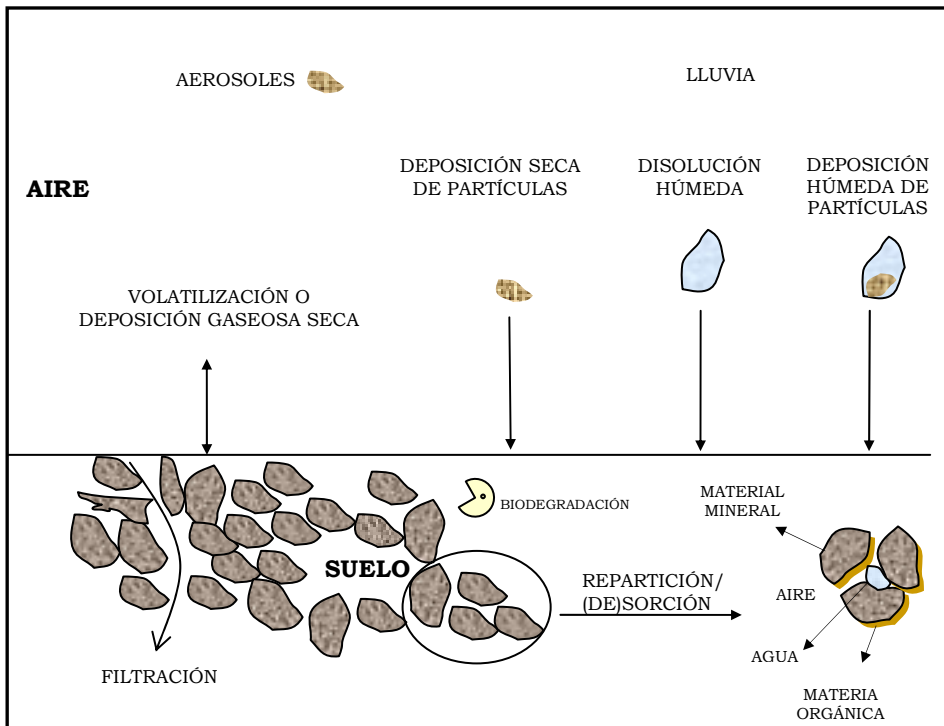


Figura I.4. Procesos involucrados en el intercambio de los COSV a través de la interfase suelo-aire (Cousins et al., 1999).

I.5.6 LEGISLACIÓN AMBIENTAL SOBRE SUELOS CONTAMINADOS POR HAPs.

La Agencia Europea de Medio Ambiente (AEMA) estimó en el año 1999 entre 300.000 y 1.500.000 el número de zonas o áreas contaminadas en Europa occidental. A estas cifras alarmantes demostrativas de la gravedad del problema, hay que añadir la falta de metodologías normalizadas para la identificación y caracterización de los suelos contaminados. La amplia diferencia encontrada en el número de enclaves contaminados descritos se debe a la heterogeneidad en los criterios utilizados para definir el término “suelo contaminado”, para evaluar los riesgos aceptables y a las distintas metodologías de caracterización utilizadas.

Hasta la fecha todavía no existe una normativa de protección del suelo de ámbito europeo. Sin embargo, Dinamarca, Holanda, Reino Unido, Alemania, Suecia, Bélgica y recientemente España han desarrollado de forma específica una ley relacionada con la protección de la contaminación de suelos.

En el año 1995 el gobierno español aprobó el Plan Nacional de recuperación de suelos contaminados (1995-2005). En él se inventariaron un total de 18142 actividades industriales, a partir de las cuales se catalogaron 4532 emplazamientos como potencialmente contaminados. En este plan únicamente se gestionaron las diferentes fuentes de recursos económicos para poder llevar a cabo los objetivos establecidos, basados esencialmente en planes de prevención. En base a estos resultados, se evidenció la necesidad urgente de implantar una legislación relacionada con la contaminación de suelos. Esta nueva legislación no apareció hasta el año 1998, con la ley de Residuos.

En España, hasta la promulgación de la Ley de Residuos (10/1998), no se disponía de ninguna norma legal que permitiera proteger eficazmente los suelos contra la contaminación y, en caso de los que ya estuvieran contaminados, identificarlos y caracterizarlos con una metodología normalizada.

En el artículo 3 de dicha ley, se define el término **suelo contaminado**, como “aquel suelo que contenga componentes químicos de carácter peligroso y de origen humano, que puedan alterar las características tanto químicas como físicas o biológicas del suelo en una concentración tal que comporte un riesgo aceptable para la salud humana o el medio ambiente, y así se haya declarado mediante resolución expresa”.

En los artículos 27 y 28 se regulan aspectos ambientales de los suelos contaminados, y se dispone que el Gobierno, previa consulta a las comunidades autónomas, determinará los criterios y estándares que permitan evaluar los riesgos que pueden afectar a la salud humana y al medio ambiente atendiendo a la naturaleza y a los usos de los suelos.

También se establecen una serie de obligaciones a los titulares de las actividades contaminantes y a los propietarios de las fincas en las que tenga o haya tenido lugar alguna actividad contaminante. Entre ellas está la de ser el responsable de los costes de la remediación del suelo en los plazos y términos que se determinen. Además, los suelos contaminados aparecerán catalogados como “suelo contaminado” en el registro de la propiedad, con todas las consecuencias económicas que ello implica, hasta que la administración no confirme su descontaminación.

Para la aplicación de la Ley de Residuos de 1998, era necesario definir los criterios de “riesgo inaceptable” así como tener un listado de las actividades potencialmente contaminantes del suelo y unos niveles de referencia de los contaminantes, a partir de los cuales se pudieran llevar a cabo los estudios de riesgo, previo a la declaración de un suelo como contaminado.

En el Real Decreto de 14 de enero de 2005 (9/2005) se encuentra una relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo (101 áreas de trabajo, donde quedan englobadas las 18000 actividades industriales inventariadas en el Plan Nacional de recuperación de suelos contaminados

(1995/2005)) y criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.

Para declarar que un suelo está contaminado es necesario demostrar que los compuestos químicos presentes implican un riesgo inaceptable para el uso del suelo (urbano, industrial, agrícola o natural). Se define riesgo como la probabilidad de que un contaminante presente en el suelo entre en contacto con algún receptor con consecuencias adversas para la salud de las personas o para el medio ambiente. Se define riesgo inaceptable como una situación en que la frecuencia esperada de aparición de cáncer en la población expuesta exceda del 1 por 100.000 casos. Para la evaluación de los riesgos ambientales ligados a la existencia de contaminantes en suelos se seguirá la normativa europea (Reglamento (CE) n° 1488/94 de la Comisión Europea, de 28 de Junio de 1994).

Para la descontaminación de un suelo, se debe priorizar la aplicación de las mejores técnicas disponibles en función de las características de cada caso. Las actuaciones de recuperación deben garantizar que materializan soluciones permanentes, prevaleciendo, en la medida de lo posible, las técnicas de tratamiento *in situ* que eviten la generación, traslado del residuo. Siempre que sea posible, la recuperación se orientará a eliminar los focos de contaminación y a reducir la concentración de los contaminantes en el suelo.

En la tabla I.4 se recogen los niveles genéricos de referencia (NGR) para HAPs específicos reflejados en este Real Decreto. Los NGR son aquellas concentraciones a partir de las cuales hay que realizar un estudio de riesgos para determinar si el riesgo es aceptable según el uso del suelo, para la salud humana y para el medio ambiente. Las concentraciones de los NGR son distintas en función de que el suelo sea de uso urbano, industrial, agrícola o para la protección de los ecosistemas. Para el uso urbano del suelo se tiene en cuenta: la inhalación de vapores del suelo y partículas de suelo contaminado, ingestión de suelo y contacto dérmico con el suelo. Para uso industrial no se tiene en cuenta el contacto dérmico, mientras que para otros usos (agrícola) se tiene en cuenta las vías de contacto del uso urbano y además la ingestión de alimentos contaminados.

En este documento se establece que, para que un suelo se considere contaminado, deben sobrepasarse 100 o más veces los niveles establecidos para la protección de la salud humana, de acuerdo a su uso (industrial, urbano o sin restricciones de uso). Alternativamente, pueden también aplicarse los niveles genéricos de referencia para la protección de los ecosistemas, para lo que se ha establecido diferentes niveles para proteger los organismos del suelo, acuáticos y vertebrados terrestres. Según este Real Decreto la aplicación de unos criterios u otros debe ser decidida por el órgano competente de la comunidad autónoma, teniendo en cuenta el uso actual y futuro de los suelos considerados.

El contenido de HAPs en los suelos también suele expresarse como suma total de los 16 HAP considerados por la EPA de EE.UU. No obstante, este Real

Decreto no considera este valor en los niveles genéricos de referencia, sino que considera cada compuesto individualmente. A efectos comparativos, se pueden considerar para HAPs totales los niveles de contaminación aplicados en distintos países de Europa (tabla I.5). Se puede observar en la tabla, que no es exhaustiva, la existencia de una gran diversidad en cuanto a los niveles aplicados. En EE.UU. no suelen aplicarse niveles genéricos de contaminación, estando el abordaje más encaminado a la evaluación del riesgo en cada emplazamiento contaminado (Dzombak et al., 1993).

Tabla I.4. Listado de contaminantes y Niveles genéricos de referencia (mg/Kg suelo) para la protección de la salud humana y de los ecosistemas en España, en función del uso del suelo.

HAP	PROTECCIÓN DE LA SALUD HUMANA			PROTECCIÓN DE LOS ECOSISTEMAS		
	Uso Industrial	Uso Urbano	Sin restricciones de uso	Organ. del suelo ^a	Organ. Acuát. ^b	Verte. Terr. ^c
Acenafteno	100	60	6		0,02	4,85
Antraceno	100	100	45		0,01*	22
Benzo(b)fluoranteno	20	2	0,2			
Benzo(k)fluoranteno	100	20	2			
Benzo(a)antraceno	20	2	0,2	3,8	0,01	
Benzo(a)pireno	2	0,2	0,02	0,15	0,01*	
Criseno	100	100	20			
Dibenzo(a,h)antraceno	3	0,3	0,03			
Fluoranteno	100	80	8	1	0,03	1,96
Fluoreno	100	50	5	0,022	0,02	2,84
Indeno(1,2,3-cd)pireno	30	3	0,3			
Naftaleno	10	8	1	0,1	0,05	0,06
Pireno	100	60	6		0,01*	1,2

*Límite inferior de detección. ^a organismos del suelo. ^b organismos acuáticos. ^cvertebrados terrestres

Tabla I.5. Criterios de evaluación aplicados en Europa en la contaminación de suelos por HAPs.

Nivel	Valor límite Σ HAP ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	País	Recomendación	Referencia
I	1 000	Suiza	Valor guía (< 15 % MO)	(SAEFL y Swiss Agency for the environment, 2001)
		Holanda	Valor diana (10 % MO)	(Beck et al., 1995)
		Dinamarca	Criterio de calidad ecotoxicológica del suelo	(Jensen y Folker-Hansen, 1995)
II	10 000	Alemania	Nivel de protección para plantas (uso agrícola)	(Trenck et al., 1994)
		Suiza	Uso con posible toma directa	(SAEFL y Swiss Agency for the environment, 2001)
III	20 000	Suiza	Producción vegetal para consumo humano	(SAEFL y Swiss Agency for the environment, 2001)
IV	40 000	Holanda	Valor de intervención (10 % MO)	(Beck et al., 1995)
V	50 000	Reino Unido	Nivel umbral para jardines domésticos, area de recreo, etc.	(Jones et al., 1996)
VI	500 000	Reino Unido	Valor crítico para recuperación	(Jones et al., 1996)

CAPÍTULO II

OBJETIVOS



II.1 OBJETIVOS.

La presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de la bioaccesibilidad en suelos de hidrocarburos aromáticos policíclicos depositados desde la atmósfera.

Nos hemos propuesto realizar una primera aproximación al concepto de fracción bioaccesible de HAP sobre la contaminación de fondo existente en suelos seleccionados. Para nuestro conocimiento, no existen estudios en suelos sobre la bioaccesibilidad de HAPs depositados desde la atmósfera.

Los objetivos principales de este trabajo fueron:

1. **Puesta a punto de la metodología analítica**, validando la misma con muestras ambientales certificadas para su contenido en hidrocarburos aromáticos policíclicos.

2. **Identificación de emplazamientos prioritarios y muestreo** de los mismos.

3. **Análisis de las muestras** para determinar el contenido total de HAPs y poder valorar el nivel de contaminación de los suelos.

4. **Estimar la bioaccesibilidad** para los microorganismos autóctonos y por poblaciones microbianas precondicionadas, de los HAPs en los suelos seleccionados.

5. **Estudiar los posibles factores que pueden afectar a la bioaccesibilidad** de HAPs en los suelos. Dentro de estos factores se han estudiado la influencia sobre la bioaccesibilidad de: la cantidad de microorganismos degradadores en el suelo, la cantidad de HAPs inicial en el suelo, el efecto de la adsorción de los HAPs en el suelo y por último, el envejecimiento de estos compuestos en los suelos.

CAPÍTULO III MATERIALES Y METODOLOGÍA



III.1 REACTIVOS.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos utilizados en este estudio han sido los siguientes: 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}C empleados en los ensayos de mineralización fueron los siguientes: [9- ^{14}C] fenantreno (actividad específica, 13,1 mCi/mmol), [1,2,3,4,4a,9a- ^{14}C] y [4,5,9,10- ^{14}C] pireno (actividad específica, 58,7 mCi/mmol), ambos con una pureza radioquímica mayor del 98%. Fueron suministrados por Sigma Chemical Co (St Louis, MO).

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). También se usaron dos materiales de referencia, con niveles de HAPs certificados: suelo industrial (CRM, Certified Reference Material 524, Community Bureau of Reference, Bruselas, Bélgica) y partículas de hollín de diesel (Diesel Particulate Matter 2975, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, EE.UU. de America).

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 Teknokroma.

El resto de reactivos empleados, de pureza analítica, fueron suministrados por PANREAC.

III.2 SUELOS.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron una relación de muestras de suelos pertenecientes, la mayoría de éstas, al Campo de Gibraltar. Este trabajo ha sido llevado a cabo gracias al proyecto “Diagnóstico de la Situación Ambiental del Campo de Gibraltar”, en el cual nuestro grupo concretamente ha trabajado en la parte denominada “Evaluación de la contaminación de suelos por hidrocarburos aromáticos policíclicos y otros contaminantes de interés”.

En el Campo de Gibraltar se muestrearon un total de 40 puntos. Se tomaron muestras simples en la capa superficial (de 0 a 25 cm, capa arable) y, cuando fue posible, de 25 a 50 cm. Las muestras se homogeneizaron, y posteriormente fueron tamizadas a través de un tamiz de 2 mm de luz de malla. Se conservaron hasta su análisis a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en envases de vidrio sellados.

III.2.1 IDENTIFICACIÓN DE EMPLAZAMIENTOS Y MUESTREO.

La relación de muestras utilizadas en este trabajo aparecen reflejadas en la tabla III.1. Estas muestras se eligieron en base a cómo estos suelos pudiesen de alguna forma contener niveles de HAPs debido a contaminación por vía atmosférica, ya fuese por encontrarse cerca de una industria, por estar adyacentes a vertederos, etc.

Inicialmente, en el año 2003 se muestrearon puntos que pertenecían a zonas tanto interiores como exteriores a industrias, como por ejemplo son las muestras pertenecientes al polígono petroquímico de San Roque, en el Campo de Gibraltar. También se muestrearon zonas adyacentes a vertederos, las que presentarían un cierto desarrollo de perfil de suelo.

En marzo del año 2004, el muestreo se centró en emplazamientos correspondientes a zonas forestales. El estudio de estos suelos tiene interés porque se trata de suelo forestal, con un alto contenido en materia orgánica, por lo que el suelo tiene una mayor afinidad por contaminantes hidrófobos tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Estas muestras forestales fueron tomadas del Monte Alcornocal, perteneciente al Campo de Gibraltar, concretamente del Monte de la Teja y del Monte Almoraima, distantes 4-5 Km uno de otro. En octubre de este mismo año, se tomaron muestras que se encontraban adyacentes a unidades móviles de captación atmosférica. Estos puntos se estudiaron en coordinación con los Dres. Pilar Fernández y Joan Grimalt, del Departamento de Química Ambiental del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales del CSIC en Barcelona, responsables en el Plan de CG del estudio de contaminación atmosférica. Estos puntos son los números 38, 39 y 40 que se encontraban respectivamente a 50, 150 y 500 metros de la unidad móvil, localizada frente a chimeneas de la central térmica de la Bahía de Algeciras, en la cual hace unos cinco años aproximadamente quemaban fuel residual y hoy en día se quema gas. El punto 40 se encontraba además a unos 20 metros de una autovía.

Además de todas estas muestras pertenecientes al Campo de Gibraltar, en este estudio se han utilizado otras tres, las cuales pertenecen a sitios de alta montaña. Estas muestras fueron cedidas por el grupo de los Dres. Pilar Fernández y Joan Grimalt anteriormente citados. Las muestras concretamente pertenecen a: Pirineo Aragonés, la cual fue tomada en una zona boscosa situada en el valle del río Cregüeña y a 1526 m de altitud sobre el nivel del mar, Montes Montseny, la cual fue tomada en una zona boscosa cerca de la carretera que va a Santa Fe del Montseny y situada a 731 m de altitud sobre el nivel del mar, y por último la muestra de la montaña Tatra, situada en el centro de Europa y a unos 1500 m de altitud sobre el nivel del mar. El muestreo de estas tres muestras se realizó en junio y julio de 2004 con la ayuda de un cilindro de acero inoxidable de 7 cm de diámetro y 20 cm de largo.

Tabla III.1. Puntos de muestreo para la determinación de la contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos.

Muestra	Cod.	Descripción	Coordenadas	
			X	Y
Suelo interior y exterior a industrias				
Petroquímica I	3	Exterior a la petroquímica de Guadarranque, junto a aparcamientos	285430	4007496
Petroquímica II	4	Exterior a la petroquímica de Guadarranque, zona de eucaliptos	285383	4007458
Petroquímica III	5	Exterior a la petroquímica de Guadarranque, prado a 40 m autovía	286072	4009784
CEPSA I	6	Interior a la refinería CEPSA, vertedero regenerado	282980	4008215
CEPSA II	7	Interior a la refinería CEPSA, adyacente a vertedero	284333	4008290
Sedimento I	10	Sedimento del arroyo Madre vieja	272778	4007467
Sedimento II	12,13	Sedimento de la salida de alcantarillado exterior a la empresa Interquisa	282997	4009349
Interquisa I	14	Interior de la empresa Interquisa	283212	4008977
Interquisa II	15	Exterior de la empresa Interquisa	282997	4009283
CEPSA III	33	Interior a CEPSA (Sobre el antiguo vertedero)	284224	4008015
CEPSA IV	34	Exterior a CEPSA (Intermedia a muestras 33 y 35)	284224	4008015
CEPSA V	35	Exterior a CEPSA, Prado Vazquez de la Chica (a 40 m de la autovía)	286000	4009694
Suelo adyacente a vertederos				
Coalsa	1 y 2	Suelo adyacente a vertedero de la cantera Coalsa, en Algeciras	279015	3999803
Vertedero "Cobre"	8	Suelo adyacente al vertedero del Cobre, en Los Barrios	276275	4001495
Barranco "Bochorno"	9	Suelo adyacente al vertedero del Barranco Bochorno, en Los Barrios	277162	4009704
Majadal de Bustos	11	Suelo adyacente al vertedero Majadal de Bustos, en Los Barrios	276897	4012013
Antiguos Enterramientos	16	Zona de antiguos enterramientos de la empresa Interquisa	289950	4007697
Vertedero "Zabal"	17	Suelo adyacente al vertedero El Zabal en la Línea de la Concepción	288316	4006597
Paraje "Albutreras"	18	Prado, confluyendo vientos de poniente y levante en los Barrios	278451	4006860
Cantera Coalsa II	36	Suelo adyacente a vertedero de la cantera Coalsa, en Algeciras	278804	3999617
Vertedero "La Doctora"	37	Adyacente a un vertedero de escorias de la empresa Acerinox	277637	4013065

Tabla III.1. (Continuación) Puntos de muestreo para la determinación de la contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos.

Muestra	Cod.	Descripción	Coordenadas	
			X	Y
Suelo forestal				
Pirineos	41	Zona boscosa del Pirineo Aragonés	X= 3014839292 Y= 47254872931	
Montseny	42	A 100 m de la carretera hacia Santa Fe del Montseny, en Barcelona	X= 4546833859 Y= 46211004455	
Tatra	43	Recogida a 1700 m sobre el nivel del mar, en las motañas Tatra, en Slovakia	No determinadas	
Tiradero I	19	Tiradero Alto		
Tiradero II	20	Tiradero Bajo		
Monte la Teja I	21	Arroyo Hondo	268204	4018355
Monte la Teja II	22	Hierro viejo	268584	4018400
Monte la Teja III	23	Suelo de alcornocales en deterioro	268533	4017952
Monte la Teja IV	24	Mogeda de las estacas	269030	4017315
Monte la Teja V	25	Punto de control	268772	4017378
Monte Almoraima I	26	Dehesa Cotillas	280588	4017129
Monte Almoraima II	27	Navahermosa	275391	4018653
Monte Almoraima III	28	Juan de Sevilla	274705	4020476
Monte Almoraima IV	29	Nava Matrera	276213	4022139
Monte Almoraima V	30	Holluelo (muestra control)	271243	4025226
Suelo adyacente a unidades móviles de captación atmosférica				
Los Barrios	31,32	Adyacente a la estación de control de calidad del aire de los Barrios	277003 277007	4006466 4006448
Puente Mayorga I	38	A 50 m. de la unidad móvil, en San Roque	No determinada	
Puente Mayorga II	39	A 150 m. de la unidad móvil, en San Roque	No determinada	
Puente Mayorga III	40	A 500 m. de la unidad móvil, en San Roque	No determinada	

En la figura III.1 se refleja el mapa indicativo de la localización de los puntos de muestreo de los suelos pertenecientes al Campo de Gibraltar.

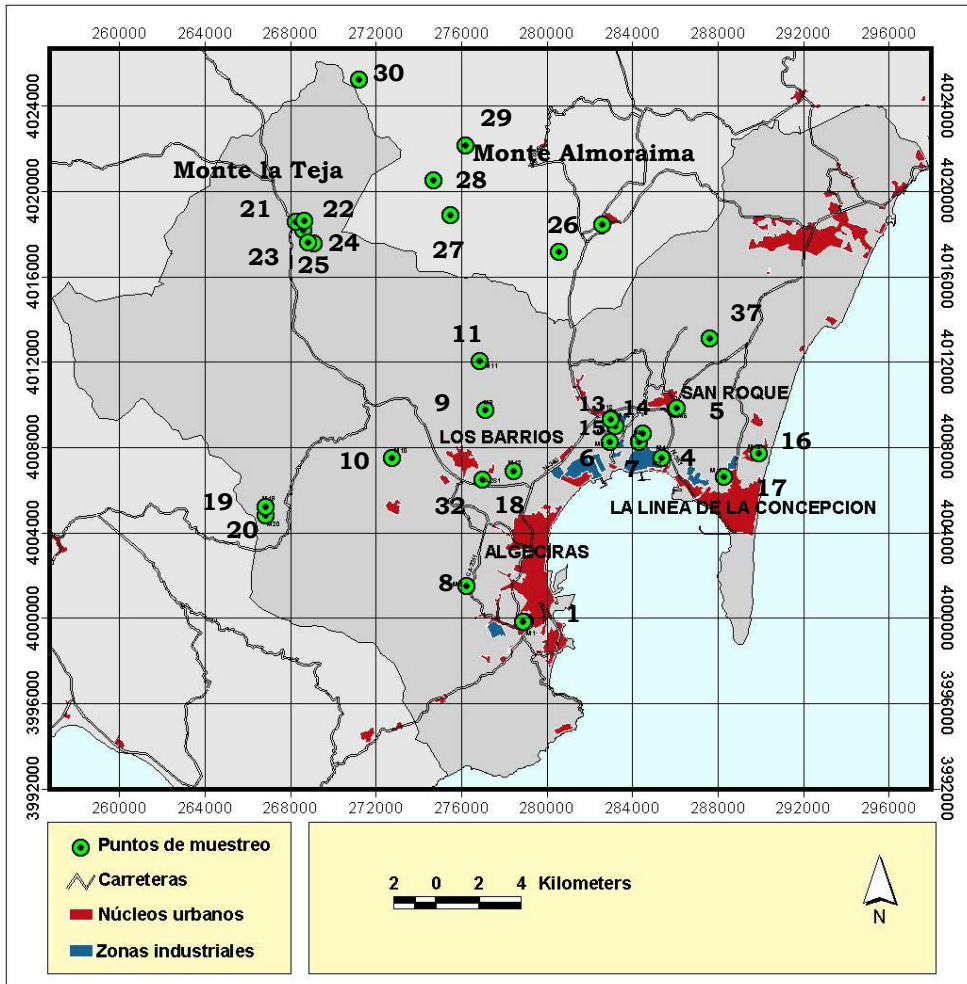


Figura III.1. Mapa indicativo de localización de los puntos de muestreo de suelos, para la determinación de HAPs en el Campo de Gibraltar, cedido por el Grupo de Evaluación de Suelos del Instituto IRNASE, CSIC. El número identificativo de las muestras se corresponde con los de la tabla III.1.

III.2.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS SUELOS SELECCIONADOS PARA LOS ENSAYOS DE BIOACCESIBILIDAD.

Para el estudio del contenido en HAPs se muestrearon un total de 43 puntos. De estas muestras se seleccionaron una serie de ellas a la hora de estudiar los procesos que determinan la bioaccesibilidad de los HAPs, que es el principal objetivo de este trabajo.

De entre las muestras recogidas en el Campo de Gibraltar, se seleccionaron aquellas que perteneciesen a suelos industriales y que estuviesen próximas al polígono petroquímico, para poder estudiar la influencia de la gran actividad industrial que existe en esta zona. Así pues, se seleccionaron también muestras pertenecientes a suelos forestales del Monte Alcornocal, debido a que éstas poseen un alto contenido en materia orgánica, y por ello estos suelos tienen una mayor afinidad por los contaminantes hidrófobos como son los HAPs.

A continuación se detallan, agrupados por su uso, las características principales de los suelos seleccionados:

- **Suelos industriales:** dentro de este grupo incluiremos a la muestra nº6, denominada Cepsa I, la cual pertenece concretamente a un vertedero regenerado de esta empresa en el cual, anteriormente a su regeneración, se vertían residuos pretratados de la obtención del crudo.
- **Suelos agrícolas:** muestras nº5, 34 y 35. Estas tres muestras estaban situadas dentro del polígono petroquímico pero alejadas cada una de ellas una determinada distancia de la empresa Cepsa. La vegetación del emplazamiento era pasto y grama.
- **Suelos urbanos:** muestras nº32 y 40. La muestra 32, se tomó a unos 9 metros de la estación de control de calidad del aire situada en el municipio de Los Barrios y concretamente en un punto de influencia del viento de levante. En este caso la vegetación que existía en este punto de muestreo era pastos y leguminosas. En el caso de la muestra 40, ésta pertenecía a una barriada del municipio de San Roque denominada Puente Mayorga y estaba situada a unos 20 metros de una autovía. Esta muestra ha sido seleccionada porque se encontraba a unos 500 metros de distancia de unas chimeneas pertenecientes a la central térmica de la Bahía de Algeciras. En este caso el tipo de vegetación era eucaliptos.
- **Suelos forestales:** muestras nº21, 22, 26, 41, 42 y 43. Las muestras 21, 22 y 26 pertenecen al monte alcornocal del Campo de Gibraltar. Las muestras 21 y 22 pertenecen concretamente al monte de la Teja; la vegetación era de pinos. La diferencia entre la muestra 21 y 22 es que la primera se trata de un suelo arcilloso y la segunda de un suelo arenoso (perteneciente a la llamada arenisca del Aljibe). La muestra 26

pertenece a otro paraje del monte alcornocal, denominado monte Almoraima donde la vegetación era de alcornoque. Por otro lado, las muestras 41, 42 y 43 son también muestras forestales pero pertenecen a suelos adyacentes a lagos situados en zonas de alta montaña. La 41 pertenece al pirineo Aragonés, la 42 pertenece concretamente a los montes Montseny y la 43 a las montañas Tatra.

Estas tres últimas muestras se seleccionaron porque al tratarse de muestras correspondientes a suelos de alta montaña, están situadas por encima de la línea de vegetación arbolada y sólo reciben aportaciones hídricas atmosféricas. Estos suelos por tanto sólo reciben aportes contaminantes transportados por vía atmosférica. Además estas muestras poseen interés porque existen publicaciones recientes sobre concentraciones de HAPs en sedimentos de lagos situados en estas mismas montañas (Fernandez et al., 1999; Fernandez et al., 2000; Grimalt, 2004).

En la tabla III.2 aparecen reflejadas las propiedades de los suelos seleccionados para los ensayos de bioaccesibilidad. En esta tabla no se han incluido, de los suelos seleccionados para el estudio de la bioaccesibilidad, a las muestras nº 6, 40, 42 ni 43, ya que en el momento de hacer las determinaciones de pH y clase textural no se disponía de la cantidad de muestra necesaria.

Estos suelos fueron clasificados por el grupo de evaluación de suelos dirigido por el Dr. Diego de la Rosa, perteneciente al departamento de Sostenibilidad del sistema suelo, planta y atmósfera del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS, CSIC). En general nos hemos encontrado en estos suelos con dos unidades edafológicas distintas. Por un lado los de tierra parda sobre arenisca y sobre arcillas y margas (Lithic Xerocept, Humic Nitisol). Los suelos de tierra parda forestal están caracterizados por su textura arenosa por disgregación de la roca madre areniscosa, lo que les confiere un carácter ácido y cierta soltura y permeabilidad. Son suelos de tonalidad amarillenta similar al de la roca madre. En este caso la topografía es ondulada, la geomorfología es montaña, el drenaje es moderadamente bueno y la inundación nula.

Por otro lado tenemos los suelos Lehm margoso sobre arcillas rojas y verdes (Aquic Chromoxerert, Vertisol). En estos suelos el material original son arcillas rojas y calcarenitas del Oligoceno. Tienen color pardo amarillento y actualmente se encuentran profundamente erosionados, con frecuentes afloramientos rocosos. En este caso la topografía es colinada, la geomorfología es colina, el drenaje es moderadamente bueno y la inundación nula.

En las figuras III.2, III.3 y III.4 aparecen fotografías del muestreo de algunos de estos suelos.

Tabla III.2. Propiedades de los suelos seleccionados para los ensayos de bioaccesibilidad.

Muestra	M.O (%)	Arena Gruesa (%)	Arena Fina (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Clase Textural	pH (KCl)	pH (H₂O)	Clasificación USDA 87^{a,c}	Clasificación FAO 90^{b,c}
Suelo forestal, Teja I (21)	1,7	19,0	16,0	16,9	48,0	Arcillosa	3,2	3,5	Lithic Xerocept	Humic Nitisol
Exterior a Cepsa (34)	2,0	20,1	12,0	35,1	32,8	Franco Arcillosa	6,6	7,2	Aquic Chromoxerert	Vertisol
Adyacente a la estación de control de los Barrios (32)	4,5	38,7	15,4	23,4	22,4	Franco Arcillo Arenosa	6,7	7,3	Aquic Chromoxerert	Vertisol
Suelo agrícola, Petroquímica III (5)	4,5	25,0	16,5	24,0	32,0	Franco Arcillo Arenosa	6,5	7,1	Aquic Chromoxerert	Vertisol
Exterior a Cepsa, Prado Vazquez de la Chica (35)	4,5	26,9	15,3	26,0	31,7	Franco Arcillosa	6,1	6,9	Aquic Chromoxerert	Vertisol
Suelo forestal, Teja II (22)	6,1	61,9	21,4	11,2	5,5	Arenosa Franca	3,8	4,2	Lithic Xerocept	Humic Nitisol
Suelo forestal, Almoraima I (26)	10,0	54,1	21,1	18,5	6,2	Arenosa Franca	3,9	4,4	N.D ^d	N.D ^d
Suelo forestal, Pirineos (41)	42,8	5,3	4,4	8,2	82,1	Arcillosa	3,2	3,7	N.D ^d	N.D ^d

^a Clasificación según las normas metodológicas de Soil Survey Staff. ^b Clasificación según las normas metodológicas de Food and Agriculture Organization 1990. ^c datos cedidos por el grupo de Evaluación de Suelos del IRNASE, CSIC. ^d no determinado.

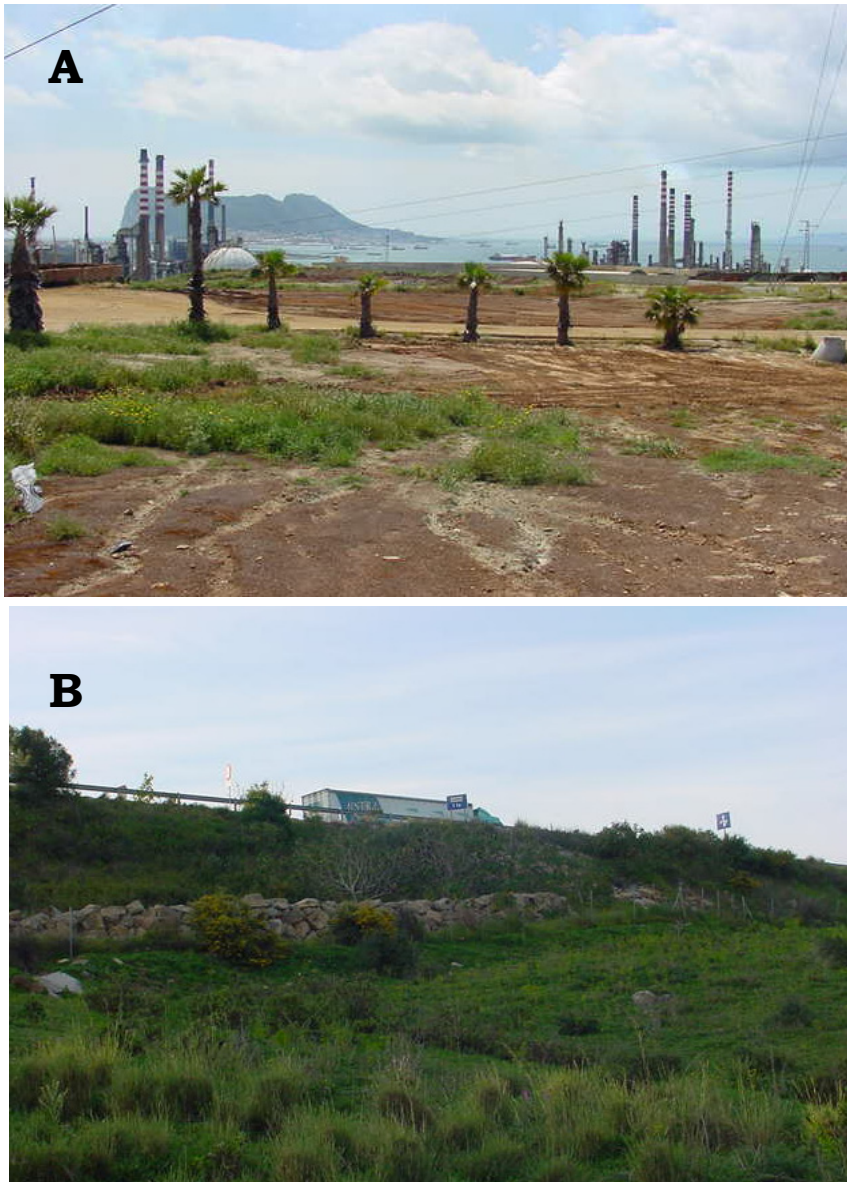


Figura III.2. Fotografías correspondientes al muestreo realizado en el Campo de Gibraltar, concretamente en el municipio de San Roque, en abril de 2003. A) Muestra n° 6 correspondiente al Polígono Petroquímico Guadarranque, concretamente en la refinería CEPSA. B) Muestra n° 5 correspondiente a un prado situado a unos 40 metros de una autovía y exterior a este mismo polígono.

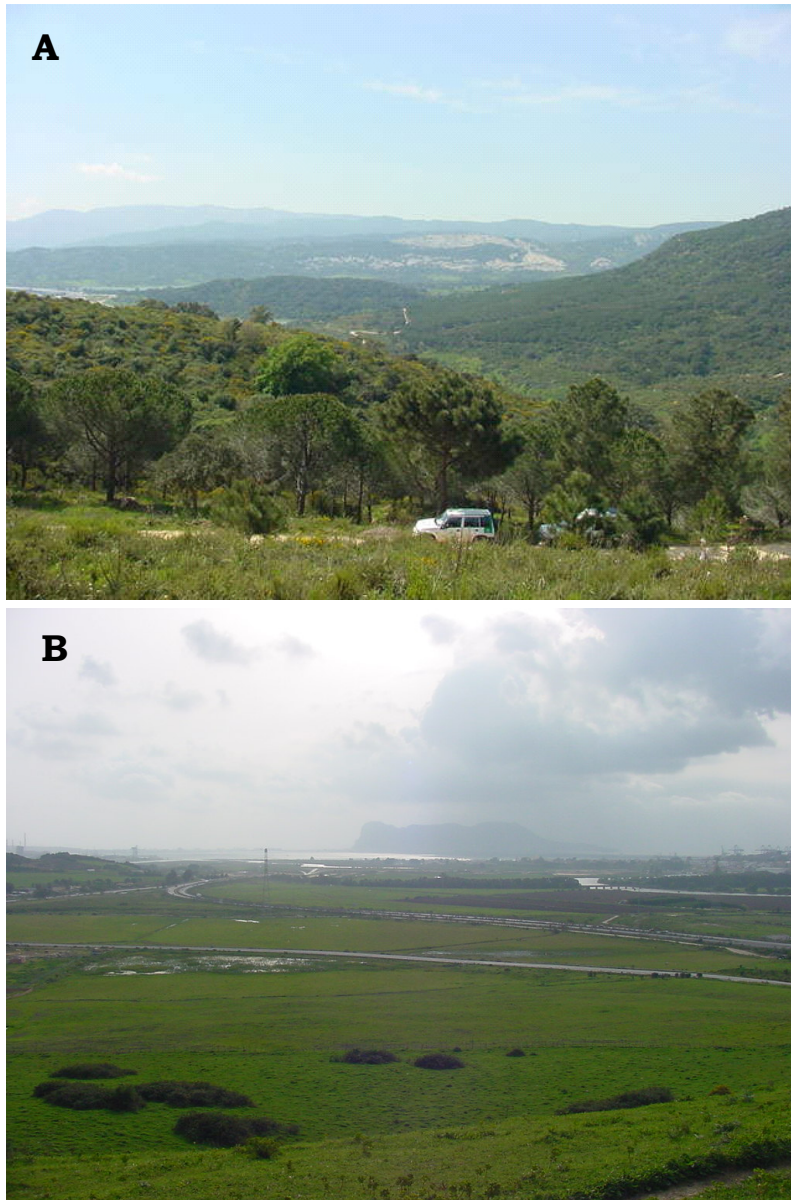


Figura III.3. Fotografías correspondientes al muestreo realizado en el Campo de Gibraltar, concretamente en el municipio de Los Barrios, en marzo de 2004. A) Muestra n° 21 correspondiente al Monte de la Teja. B) Muestra n° 32 correspondiente al emplazamiento de Radio Televisión Los Barrios.



Figura III.4. Fotografías correspondientes al muestreo realizado en los montes Pirineos, en junio de 2004, cedidas por el departamento de química ambiental del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales del CSIC en Barcelona. En la fotografía A) puede observarse el milicorer utilizado para el muestreo de HAPs (izquierda) y el corer utilizado para el muestreo de metales (derecha). En la B) puede observarse la profundidad de 25 cm a la que se realizó el muestreo.

III.3 DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL SUELO.

III.3.1 DETERMINACIÓN DEL CARBONO ORGÁNICO.

El contenido en carbono orgánico de los suelos fue determinado siguiendo un protocolo basado en la oxidación del carbono orgánico, con dicromato en medio sulfúrico y valoración con sal ferrosa, método de Walkley y Black (Métodos oficiales de análisis, 1986). El procedimiento seguido fue el siguiente: se pesó alrededor de 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 (H_2SO_4) concentrado, dejándolo reposar durante 30 minutos. Una vez que el Erlenmeyer estuvo frío, se pasó 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 (FNa) 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 dio 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 cual 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 precipitados. 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:

$$f = \frac{\text{gramos de dicromato} * 1000}{\text{ml de sal gastados} * \text{normalidad de la sal} * \text{PM dicromato} / 6} \quad (8)$$

Tanto el cálculo de la factoración como las determinaciones de la materia orgánica de las muestras, fueron realizados 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.

$$1 \text{ ml de sal de Mohr} \rightarrow 0,615 \text{ mg de C.O.}$$

$$V_b - V_m \rightarrow X \text{ mg de C.O.}$$

Como las valoraciones se realizaron con 20 ml tomados del matraz de 100 ml, los mg de C.O. fueron calculados 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 fue calculado como:

$$5X \text{ mg de C.O.} \rightarrow \text{en los g de suelo pesados}$$

$$Y \text{ mg de C.O.} \rightarrow \text{en 100 g de suelo}$$

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 fue expresado en tanto por ciento.

La materia orgánica (M.O.) de los suelos fue determinada 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.

$$\text{M.O.(\%)} = \text{C.O.(\%)} * 1.724 \quad (9)$$

III.3.2 DETERMINACIÓN DE LA TEXTURA.

Este parámetro (determinado sólo para las muestras en las que fue posible) fue determinado por el servicio de análisis del IRNAS, y se determinó por dispersión del suelo por agitación con hexametafosfato sódico; separación por tamizado de la arena gruesa (2-0,25 mm); determinación de las fracciones limo (0,05-0,002 mm) y arcilla (menor de 0,002 mm) por medio de densímetro de Bouyoucos; separación de la arena fina (0,2-0,05 mm) por lavados sucesivos. Los resultados se expresan como porcentaje de cada fracción sobre

suelo seco menor de 2 mm (Gee y Baueder, 1986; Métodos oficiales de análisis, 1986).

III.3.3 DETERMINACIÓN DEL pH.

El pH del suelo se determinó siguiendo los métodos oficiales de análisis del Ministerio de Agricultura y Pesca (Métodos oficiales de análisis, 1986).

- pH (KCl): a 10 g de suelo seco y tamizado se le añaden 25 mL de una disolución 1 M de KCl en un tubo de centrifuga de 50 mL.
- pH (H₂O destilada): a 10 g de suelo seco y tamizado se le añaden 25 mL de agua destilada en un tubo de centrifuga de 50 mL.

Se ponen a agitar los tubos de centrifuga durante una hora, al cabo de ese tiempo se centrifugan los tubos durante 10 minutos a 5000 rpm y en el sobrenadante se mide el pH. Esta determinación se hace por duplicado tanto para las mediciones del pH del suelo en KCl como en H₂O.

III.4 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS HAPs DEL SUELO.

Tanto para el análisis del contenido en HAPs de los suelos a tiempo inicial, como para las muestras a tiempos intermedios y a tiempo final de las cinéticas de biodegradación, el procedimiento de extracción y limpieza que se siguió es el que a continuación se detalla (figura III.5).

Para la extracción de los HAPs del suelo se utilizó un extractor Soxhlet (método EPA 3540C) de 250 ml. El extractante utilizado fue acetona/diclorometano (1:1), 180 ml. La muestra de suelo se secó con un peso equivalente de Na₂SO₄ (40 g aproximadamente), se introdujo en un cartucho de celulosa (33 x 100 mm) y se sometió a extracción continua durante 8 horas. El extracto recogido se llevó al rotavapor hasta reducir el volumen a unas gotas, tras lo cual se añadieron 5 ml de diclorometano. Posteriormente este extracto se pasó por un cartucho de limpieza de florisil, Sep-Pak cartridges WATERS (EPA 3620B) previamente acondicionado con 9,6 ml de diclorometano con ayuda de una jeringa Hamilton. Aunque la EPA recomienda para suelos contaminados por HAPs la purificación mediante alúmina (EPA 3611) o sílica gel (EPA 3630), se consideró tras varias pruebas realizadas, más conveniente en este estudio utilizar purificación con florisil, método utilizado en diversos trabajos publicados sobre contaminación difusa por HAPs en suelos (Cousins y Jones, 1998; Maliszewska-Mordybach, 2000).

Tras pasar el extracto a través del cartucho, se pasaron 2 ml de diclorometano, para arrastrar los posibles HAPs que hayan podido quedar retenidos. El extracto limpio se llevó a una corriente de nitrógeno hasta sequedad. Posteriormente se resuspendió en un volumen perfectamente conocido de acetonitrilo (fase móvil del método cromatográfico utilizado) y se

llevó al sonicador. El extracto fue microfiltrado, antes de ser analizado por cromatografía, a través de filtro de NYLON 0,45 μm , para eliminar posibles partículas de sólido que puedan interferir en la columna del cromatógrafo.

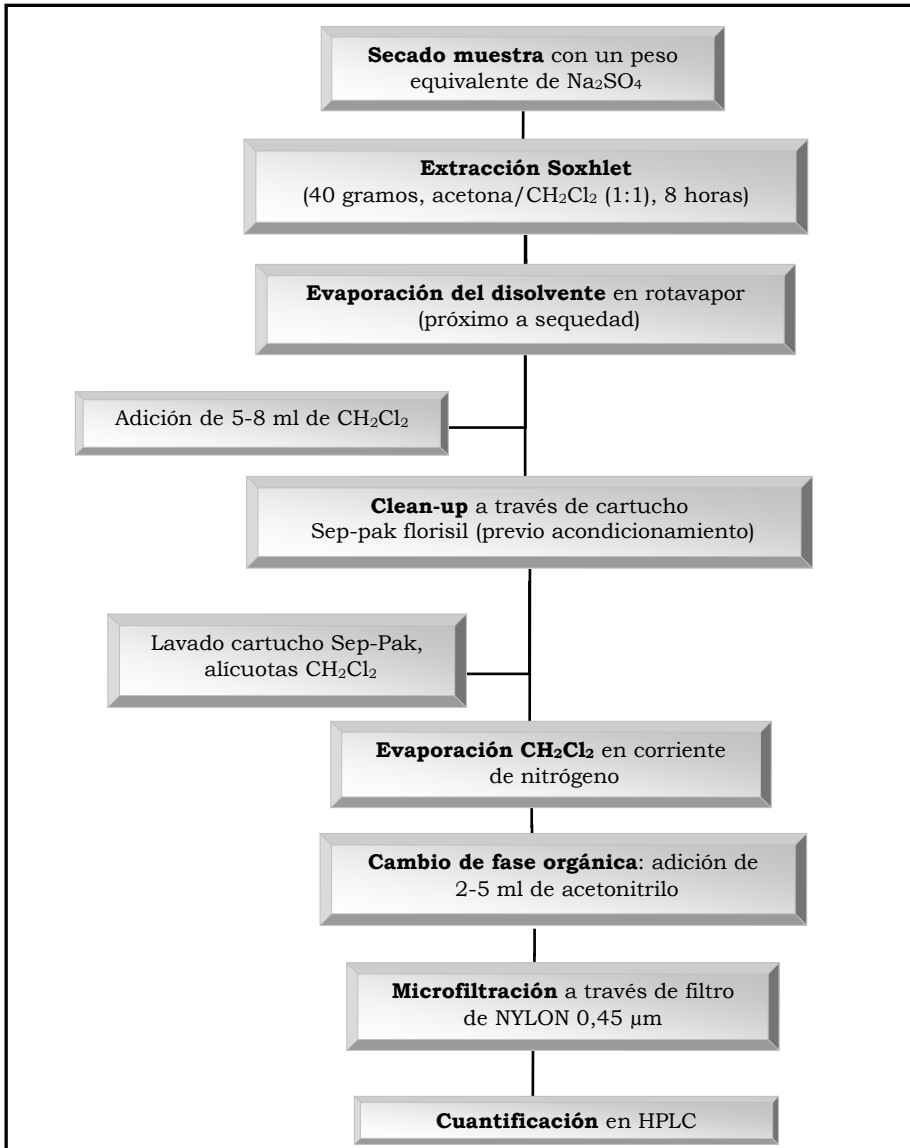


Figura III.5. Esquema del proceso para la extracción y cuantificación de HAPs en suelos.

III.5 ANÁLISIS DE HAPs DEL SUELO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC). VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA.

III.5.1 ANÁLISIS DE HAPs DEL SUELO.

Tanto para el análisis del contenido en HAPs de los suelos, como para las muestras a tiempos intermedios y a tiempo final de las cinéticas de biodegradación, las condiciones cromatográficas fueron las mismas.

Los análisis se llevaron a cabo con un cromatógrafo líquido de alta resolución Waters 2690 Separations Module (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) equipado con dos detectores: un detector de UV-VIS (Waters 996 Photodiode Array Detector) y otro de fluorescencia (Waters 474 Scanning Fluorescence Detector). La columna empleada era especial para análisis de HAPs (Waters PAH Columns, C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm). Como fases móviles se utilizaron acetonitrilo de calidad HPLC y agua milliQ. Ambas fases se filtraron previamente a su uso, utilizando para ello filtros de Nylon de 45 micras de poro.

Las condiciones cromatográficas que se utilizaron fueron las siguientes:

- Flujo: 1 ml / min.
- Temperatura del horno: 30 °C.
- Tiempo de análisis: 50 min.
- Volumen de inyección: 20 μl .

Se utilizó gradiente de fase móvil (tabla III.3) y la programación usada para el detector de fluorescencia aparece en la tabla III.4 (Urbieta-Garagorri et al., 1999).

La cuantificación se realizó mediante calibración externa utilizando un patrón de HAPs (Supelco Calibration Mix 5, 2000 mg/ml de cada HAP, en diclorometano). El método permite separar adecuadamente (Figura III.6) y cuantificar los siguientes 16 compuestos, recogidos por la US-EPA como HAPs prioritarios: Naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno e indeno(1,2,3-c,d)pireno.

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

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

Tabla III.4. Programación detector de fluorescencia, HPLC.

PROGRAMACIÓN DETECTOR DE FLUORESCENCIA		
TIEMPO (min)	λ excitación	λ emisión
0,0	270	331
0,1	AUTOCERO	
17,5	250	385
20,7	288	462
21,6	335	383
26,5	254	370
28,0	268	397
32,4	260	414
34,8	293	498
36,5	270	331

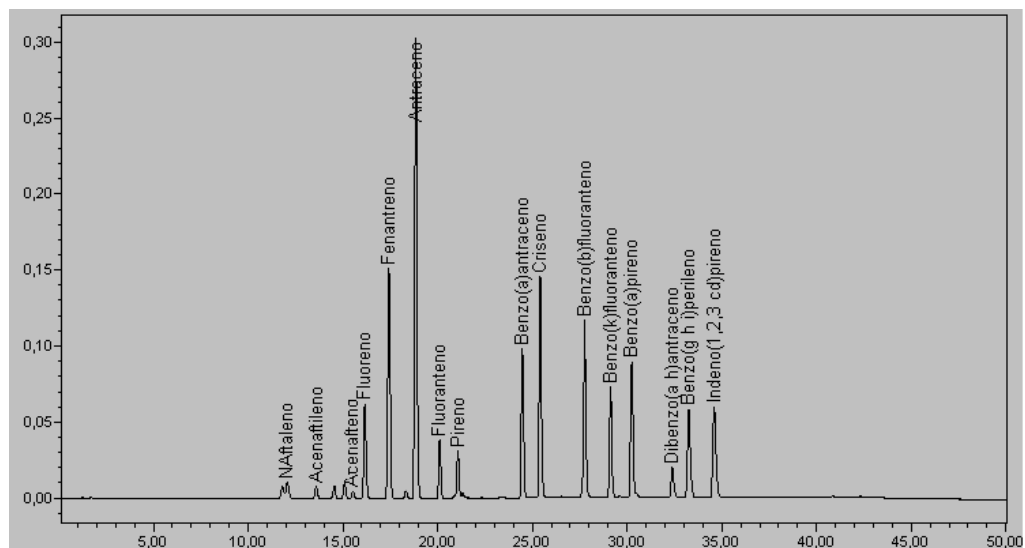


Figura III.6. Cromatograma obtenido para el patrón con los 16 HAPs.

La recta de calibrado empleada en el análisis de las muestras fue del orden de $\mu\text{g/ml}$, 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 tomando diez veces la desviación estándar relativa de la ordenada en el origen de dicha recta. Estos valores se recogen en la tabla III.5.

Tabla III.5. Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) para los dos detectores usados en el método cromatográfico y para los 16 HAPs estudiados.

HAPs	Fotodiodo Array		Fluorescencia	
	LD ($\mu\text{g/ml}$)	LC ($\mu\text{g/ml}$)	LD ($\mu\text{g/ml}$)	LC ($\mu\text{g/ml}$)
Naftaleno	0,22	0,73	0,14	0,47
Acenaftileno	0,07	0,23	-	-
Acenafteno	0,03	0,09	0,94	3,20
Fluoreno	0,02	0,31	0,90	2,00
Fenantreno	0,09	0,29	0,65	2,16
Antraceno	0,01	0,10	0,87	2,90
Fluoranteno	0,04	0,25	-	-
Pireno	0,01	0,04	0,35	1,18
Benzo(a)antraceno	0,01	0,03	0,18	0,87
Criseno	0,01	0,03	0,19	0,96
Benzo(b)fluoranteno	0,01	0,34	0,02	0,15
Benzo(k)fluoranteno	0,01	0,36	0,02	0,17
Benzo(a)pireno	0,02	0,02	0,03	0,27
Dibenzo(ah)antraceno	0,01	0,32	0,04	0,13
Benzo(ghi)perileno	0,01	0,28	0,02	0,19
Indeno(1,2,3cd)pireno	0,01	0,27	-	-

III.5.2 VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA ANALÍTICA.

Para la validación de una metodología analítica, se comprueba que al aplicar ésta de manera completa no se producen pérdidas de analito y que la concentración que se determina corresponde de manera cuantitativa a la cantidad presente en las muestras.

Para llevar a cabo la validación de una técnica suelen usarse muestras con concentración de analito conocida, para luego evaluar la recuperación. Para ello se intenta usar una matriz similar o igual a la de las muestras reales sobre las que luego se aplicará el método. En nuestro caso se han usado dos materiales de referencia, con niveles de HAPs certificados: suelo industrial (CRM, Certified Reference Material 524, Community Bureau of Reference, Bruselas, Bélgica) y partículas de hollín de diesel (Diesel Particulate Matter 2975, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, EE.UU. de America). El método permitió separar y cuantificar adecuadamente los HAPs presentes en estas muestras de referencia (Figura III.7), observándose una buena correspondencia entre los valores experimentales y los esperados (Tabla III.6).

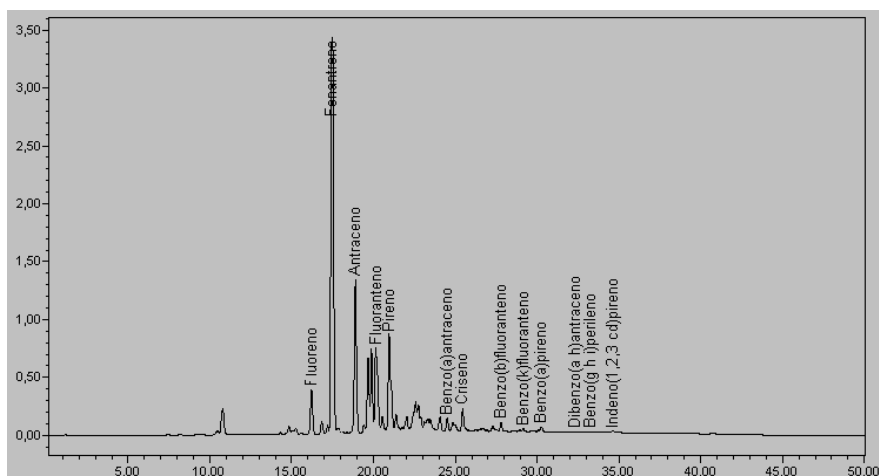


Figura III.7. Cromatograma representativo obtenido de la muestra de suelo de referencia CRM 524.

Tabla III.6. Contenido en HAPs (mg/Kg) de muestras ambientales de referencia^a

Compuesto	CRM 524	NIST 2975
Naftaleno	ND ^b	ND ^b
Acenaftileno	ND ^b	ND ^b
Acenafteno	ND ^b	ND ^b
Fluoreno	95,54	ND ^b
Fenantreno	690,0	10,76 (17)
Antraceno	83,25	0,14 (0,038)
Fluoranteno	419,0	21,74 (26,6)
Pireno	177,22 (173,0)	0,96 (0,90)
Benzo(a)antraceno	18,02 (22,5)	0,87 (0,317)
Criseno	32,52	4,23 (4,56)
Benzo(b)fluoranteno	16,5 (13,5)	NC ^c
Benzo(k)fluoranteno	8,5 (6,2)	0,92 (0,678)
Benzo(a)pireno	10,8 (8,6)	0,027 (0,052)
Dibenzo(ah)antraceno	29,2	0,75 (0,52)
Benzo(ghi)perileno	14,3	0,47 (0,498)
Indeno(1,2,3cd)pireno	5,7 (5,1)	0,76 (1,4)

^aLos datos entre paréntesis indican los valores certificados. ^bND, no detectado. ^cNC, no cuantificado.

III.6 BACTERIA, MEDIOS, CONDICIONES DE CULTIVO Y PREPARACIÓN DE INÓCULOS.

La bacteria utilizada en este estudio (*Mycobacterium gilvum* VM552) tiene como origen un suelo contaminado con HAPs y es capaz de crecer con fenantreno, fluoranteno y pireno como única fuente de carbono y de energía (Van Herwijnen, 2003; Wick et al., 2001; Wick et al., 2002). Esta estirpe 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 (Bastiaens et al., 2001). Esta bacteria fue cedida por el Dr. Dirk Springael (Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek, VITO, Mol, Bélgica). La estirpe forma colonias de color anaranjado y de aspecto opaco y mucoso. 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 % (P/V) del HAP respectivo como única fuente de carbono (el HAP fue esterilizado previamente mediante lavado con diclorometano).

Para cultivar esta estirpe se utilizó un medio fosfato tamponado, al que se denominó medio Suiza (SW). Durante el periodo de crecimiento de esta bacteria se hizo un seguimiento de la densidad óptica del cultivo a lo largo del tiempo (la cual fue medida a 600 nm en un espectofotómetro UV-Visible, Genesys 10 vis, Spectronic Unicam). Se tomaron los cultivos para los experimentos de biodegradación al final de la fase exponencial de crecimiento.

Para la preparación de los inóculos de esta bacteria se siguió el siguiente procedimiento. El cultivo se filtró a través de una placa porosa de 40 µm de tamaño de poro, para eliminar los cristales de pireno. A continuación se lavó tres veces con un medio de cultivo estéril, llamado medio de mineralización (MM), 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 (UFC) después de sucesivas diluciones del pellet con medio de cultivo y siembra en placas de TSA (Tryptone Soy Agar,), preparadas en un medio denominado MSB (Minimal salts medium). Una vez preparado el inóculo se midió también la densidad óptica de éste.

La composición de los medios SW, MM y MSB mencionados anteriormente, aparece en la tabla III.7, en la cual los reactivos señalados en verde deben autoclavarse separados de los señalados en rojo, y mezclarse una vez enfriados para evitar que precipiten los fosfatos. Los reactivos señalados en azul se filtran a través de filtro Millipore de 0,2 micras de tamaño de poro.

Tabla III.7. Composición por litro de los medios usados en este trabajo.

	SW	MM	MSB	Tampón Fosfato
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	3,52 g	-	670 mg	-
KH ₂ PO ₄	0,2 g	900 mg	340 mg	0,2 g
K ₂ HPO ₄	-	100 mg	-	0,8 g
Tris	-	-	-	-
NaCl	-	-	-	-
KCl	-	-	-	-
Na ₂ SO ₄	-	-	-	-
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,1 g	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,05 g	-	-	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	-	-	-
CaCl ₂	-	80 mg	14 mg	-
NH ₄ Cl	-	-	500 mg	-
NH ₄ NO ₃	-	100 mg	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	100 mg	112 mg	-
NaNO ₃	-	-	-	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	-	-
Fe(III)NH ₄ citrato	-	-	-	-
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,5 µg	-	5 mg	-
ZnCl ₂	5 µg	-	-	-
MnCl ₂ ·4H ₂ O	30 µg	-	-	-
H ₃ BO ₃	5,5 µg	-	-	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	19,5 µg	-	-	-
Cl ₂ Cu·2H ₂ O	1,7 µg	-	-	-
NiCl ₂ ·6H ₂ O	2,3 µg	-	-	-
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	-	2 µg	-	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	-	2 µg	-	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	2 µg	-	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	10 µg	1,4 µg	2,5 mg	-
ZnSO ₄ ·H ₂ O	-	2 µg	-	-
CuSO ₄	2,5 µg	-	-	-
Na ₂ EDTA	2 mg	-	-	-
FeCl ₂	0,75 mg	-	-	-
LiCl	1,25 µg	-	-	-
SnCl ₂	1,25 µg	-	-	-
KBr	5 µg	-	-	-
KI	5 µg	-	-	-
BaCl ₂	1,25 µg	-	-	-
FeCl ₃ ·6 H ₂ O	-	10 mg	0,22 mg	-
pH	7	5,7	7	7,29

III.7 ENSAYOS DE MINERALIZACIÓN Y BIODEGRADACIÓN.

III.7.1 ENSAYOS DE PERSISTENCIA DE HAPs.

Los experimentos se llevaron a cabo en fase sólida, debido a que se intentó en todo momento simular, en lo máximo posible, las condiciones naturales en las que puede encontrarse un suelo.

Para medir la **mineralización** se utilizaron matraces biométricos de 250 ml de capacidad, constituidos por un cuerpo principal, donde se colocó la muestra de suelo (40 gramos), y un brazo lateral que contiene la trampa de álcali, en el cual se añade 1 ml de NaOH 0,5 M, donde se recoge la producción de $^{14}\text{CO}_2$ (figura III.8). Se añadieron entre 80000 y 100000 dpm de fenantreno [$9\text{-}^{14}\text{C}$] o pireno [$4,5,9,10\text{-}^{14}\text{C}$] en su caso. Los sustratos marcados se añadieron en solución acuosa para facilitar su absorción en el suelo. Una vez homogeneizada la mezcla entre el suelo y los sustratos marcados (con ayuda de una varilla de vidrio), los matraces se cerraron con un tapón envuelto en cinta de teflón, para impedir la absorción de los HAPs a la goma y además evitar que las muestras se sequen durante el ensayo. Se mantuvieron a temperatura del laboratorio (23 ± 2 °C) durante todo el tiempo. Periódicamente, la solución alcalina se retiró y se reemplazó con sosa nueva. La solución de NaOH se mezcló con 5 ml de líquido de centelleo (Ready Safe, Beckman Instrument, Fullerton, CA, USA), 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 LS5000TD.

Para el estudio de la desaparición de HAPs, en sistemas con suelo en fase sólida, complementario a la mineralización, se prepararon matraces en las mismas condiciones que para el estudio de la mineralización, con la diferencia de que no se añadió sustrato marcado y que en este caso se utilizaron matraces Erlenmeyer y no biométricos (figura III.8). A determinados tiempos intermedios y a tiempo final del experimento, se congelaron matraces por duplicado, a -80 °C para detener la actividad microbiana. Posteriormente se analizaron las cantidades residuales de los HAPs mediante HPLC, previa extracción Soxhlet del contaminante.

Tanto los ensayos de mineralización como los de desaparición de HAPs se realizaron siempre por duplicado.

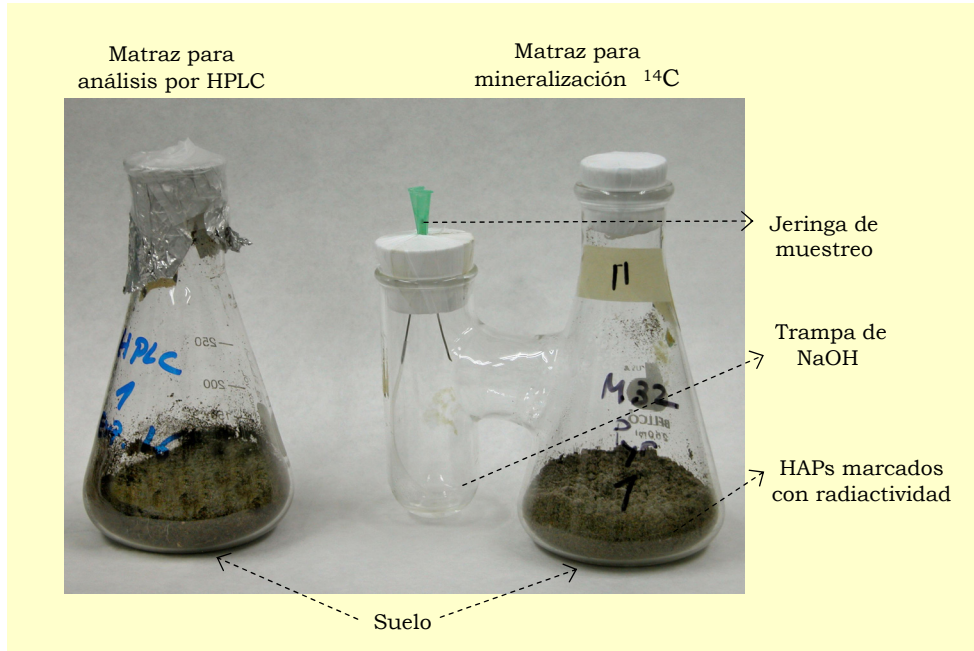


Figura III.8. Matraz Erlenmeyer para el análisis por HPLC y matraz biométrico para los ensayos de persistencia de los HAPs en el suelo en fase sólida.

III.7.2 CUANTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN MICROBIANA DEGRADADORA AUTÓCTONA DE HAPs EN LOS SUELOS ESTUDIADOS.

Para determinar en un suelo el número de células viables degradadoras de fenantreno, se procedió de la siguiente forma: se prepararon una serie de diluciones del suelo con tampón fosfato (previamente autoclavado). La cantidad en el primer tubo de ensayo será de 0,8 a 1,0 gramos del suelo y 10 ml del tampón fosfato.

Hay que tener en cuenta que las muestras de suelo dedicadas para estas determinaciones, no fueron congeladas sino que solo se han mantenido en refrigeración.

Una vez preparadas las diluciones, se agitaron cada una de ellas en el vortex y se procedió a sembrar dos placas de cada dilución. Estas placas se prepararon en medio SW, en el cual se añadió agar a una concentración de 16 g/L y fenantreno disuelto en acetona (por cada litro de medio suiza 3 ml de acetona y por cada 3 ml de acetona 0,1 g del HAP). Por último se

sembraron las placas, se mantuvieron en estufa a 40°C, y después de unos diez días se procedió al conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC).

III.7.3 ENSAYOS DE BIOACCESIBILIDAD.

Para medir la **mineralización** se utilizaron matraces biométricos de 250 ml de capacidad, constituidos por un cuerpo principal, donde se colocó la muestra de suelo (40 gramos), y un brazo lateral que contiene la trampa de álcali, en el cual se añade 1 ml de NaOH 0,5 M, donde se recoge la producción de $^{14}\text{CO}_2$ (figura III.8). Se añadieron entre 80000 y 100000 dpm de fenantreno [$9\text{-}^{14}\text{C}$] o pireno [$4,5,9,10\text{-}^{14}\text{C}$] en su caso. Los sustratos marcados se añadieron en solución acuosa para facilitar su absorción en el suelo. Una vez homogeneizada la mezcla entre el suelo y los sustratos marcados (con ayuda de una varilla de vidrio), los matraces fueron inoculados con una suspensión de *Mycobacterium gilvum* VM552 (cultivada en pireno) que contenía $10^6 - 10^9$ UFC/ml (figura III.9). El inóculo se preparó siguiendo el protocolo expuesto en el apartado III.6.

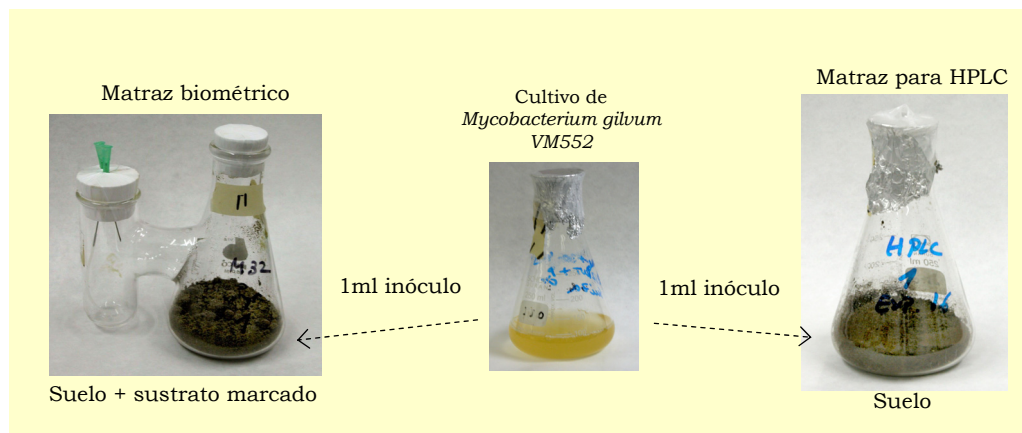


Figura III.9. Matraz Erlenmeyer para el análisis por HPLC y matraz Biométrico para los ensayos de bioaccesibilidad.

Los matraces se cerraron con un tapón envuelto en cinta de teflón, para impedir la absorción de los HAPs a la goma y además evitar que las muestras se sequen durante el ensayo. Se mantuvieron a temperatura del laboratorio (23 ± 2 °C) durante todo el tiempo.

La producción de $^{14}\text{CO}_2$ se midió como se ha descrito en el apartado III.7.1

Para el estudio de la **biodegradación**, en sistemas con suelo en fase sólida e inoculados complementario a la mineralización, se prepararon matraces en

las mismas condiciones que para el estudio de la mineralización, con la diferencia de que no se añadió sustrato marcado y que en este caso se utilizaron matraces Erlenmeyer y no Biométricos. A tiempo final del experimento se procede de igual forma a la indicada en el apartado III.7.1.

En las cinéticas de biodegradación los resultados experimentales se ajustaron matemáticamente a un modelo bifásico mediante la siguiente ecuación:

$$S_t / S_0 = F_{\text{ráp}} \cdot \exp(-k_{\text{ráp}} \cdot t) + F_{\text{len}} \cdot \exp(-k_{\text{len}} \cdot t) \quad (10)$$

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

Las fracciones de biodegradación rápida y lenta ($F_{\text{ráp}}$ y F_{len}), así como las constantes de biodegradación rápida y lenta ($K_{\text{ráp}}$ y K_{len}) se determinaron por mínimos cuadrados (Excel solver) de las fracciones residuales acumulativas entre los valores experimentales y los calculados de S_t/S_0 .

III.8 ENSAYOS DE ENVEJECIMIENTO.

Para estudiar el envejecimiento de HAPs en suelos, se prepararon por duplicado muestras de 40 gramos de suelo en matraces biométricos de 250 ml de capacidad. Se añadieron entre 80000 y 100000 dpm de pireno [$4,5,9,10\text{-}^{14}\text{C}$] el cual fue disuelto en agua previamente. Una vez homogeneizada la mezcla entre el suelo y el sustrato marcado (con ayuda de una varilla de vidrio), los matraces se cerraron con un tapón envuelto en cinta de teflón, y en la trampa se añadió 1 ml de NaOH 0,5 M. Los matraces se mantuvieron a temperatura ambiente durante todo el proceso de envejecimiento, que en nuestro caso fueron dos meses, y durante este tiempo se tomaron sucesivas muestras retirando la sosa y reemplazándola por sosa nueva. La radiactividad de estas muestras se midió como se indica en el apartado III.7.1. El motivo de hacer el seguimiento de la mineralización durante el tiempo de envejecimiento es para asegurarnos de que no ha existido mineralización del pireno por las bacterias autóctonas del suelo.

Pasado el tiempo de envejecimiento, se repitió el mismo trabajo preparando las mismas muestras en las mismas condiciones que las anteriores descritas. Una vez preparadas estas muestras, se inoculan todos los matraces (los envejecidos y los recientemente preparados) con una suspensión de *Mycobacterium gilvum* VM552 (cultivada en pireno) que contenía $10^6 - 10^9$ UFC/ml. El inóculo se preparó siguiendo el protocolo expuesto en el apartado III.6. La mineralización se siguió como se mencionó en apartados anteriores.

III.9 ENSAYOS DE ADSORCIÓN.

III.9.1 ADSORCIÓN DE PIRENO A LOS SUELOS.

La adsorción de pireno marcado con ^{14}C se llevó a cabo usando el método batch. Unos 40 mg de las muestras de suelo por duplicado, se introdujeron en botes de vidrio de 100 ml, se añadió 90 ml de agua destilada la cual contenía disuelto 8,4 ng/ml de pireno marcado (5000 dpm/ml). El compuesto radiactivo se añadió a la solución acuosa disuelto en acetona (0,1 ml de acetona por litro de agua). Los botes se cerraron con tapones de vidrio esmerilados y se pusieron en agitación (agitador orbital a 150 rpm). La posible pérdida de pireno disuelto se determinó en muestras control las cuales no contenían suelo.

Para el seguimiento de la cinética de adsorción del pireno marcado, 2 ml de cada bote se centrifugaron en tubos de vidrio a 8000 rpm durante una hora. Después de la centrifugación 1 ml del sobrenadante se mezcló con 5 ml de líquido de centelleo y la radioactividad se midió mediante contador de centelleo líquido modelo Beckman LS5000TD.

El coeficiente de distribución sólido-agua, K_d (en L/Kg), se calcula mediante la siguiente ecuación (Accardi-Dey y Gschwend, 2002):

$$k_d = \frac{(1 - f_w)}{f_w * r_{sw}} \quad (11)$$

donde f_w es la fracción de pireno disuelto en el agua en el equilibrio, y r_{sw} es la relación sólido-agua (kg/L). El coeficiente de reparto normalizado con el carbono orgánico, K_{oc} se calculó mediante la división entre el coeficiente de distribución y la fracción de carbono orgánico, f_{oc} (ecuación 2).

III.9.2 EXPERIMENTOS DE MINERALIZACIÓN TRAS LOS ENSAYOS DE ADSORCIÓN.

Para estudiar la mineralización una vez llevado a cabo el ensayo de adsorción, se preparan muestras en botes de vidrio de 100 ml, exactamente iguales que los que se usan para determinar la cinética de adsorción (descritas en el apartado anterior) pero las cuales se mantienen intactas a temperatura ambiente. Una vez finalizado el proceso de adsorción, se transfiere todo el contenido de estos botes a matraces erlenmeyer de 250 ml de capacidad, y se inoculan con una suspensión de *Mycobacterium gilvum* VM552 (cultivada en pireno) que contenía $10^6 - 10^9$ UFC/ml. Se cierran estos matraces con tapones que llevan la trampa de sosa incorporados, se añade 1 ml de la solución alcalina 0,5 M y se ponen en agitación orbital a 150 rpm. Se sigue la mineralización tomando sucesivas muestras a determinadas tiempos y midiendo la radiactividad como ya se ha descrito en apartados anteriores.

III.9.3 EXPERIMENTOS DE MINERALIZACIÓN TRAS ADSORCIÓN-ENVEJECIMIENTO.

Para la realización de estos ensayos se prepararon muestras por duplicado en los botes de vidrio de 100 ml con las mismas condiciones que se explicó en el apartado III.9.1. En estas muestras seguiremos la cinética de adsorción durante un periodo de unos dos meses, que servirá como periodo de envejecimiento. Una semana antes más o menos de que termine el periodo de envejecimiento se prepararon las mismas muestras en las mismas condiciones que las anteriores descritas y se les seguirá la cinética de adsorción durante una semana, de forma que esta cinética termine al mismo tiempo que la de las muestras envejecidas. Una vez finalizada la cinética de adsorción de las muestras envejecidas y las no envejecidas, se lleva a cabo la mineralización de estos dos tipos de muestras. Para llevar a cabo esta mineralización se sigue las mismas pautas que se explicó en el apartado III.9.2.

El objetivo de este tipo de ensayos es comparar la mineralización en dos tipos de muestras: a las que se les ha realizado previamente la adsorción y a las que se les ha realizado la adsorción pero durante un periodo mucho más largo, considerado como periodo de envejecimiento.

III.9.4 EXPERIMENTOS PARA COMPARAR LA MINERALIZACIÓN EN VARIOS DE LOS SUELOS SELECCIONADOS.

En este tipo de ensayos lo que se pretende es comparar la mineralización de pireno marcado, en distintos suelos. Para poder estudiar esta comparación lo que se hizo previamente a la mineralización fue ajustar las condiciones del experimento de manera que todos los suelos estudiados tuviesen inicialmente la misma cantidad de pireno marcado adsorbido.

Los ensayos de adsorción previos a la mineralización se llevaron a cabo tal como se explica en el apartado III.9.1. Para conseguir que en todos los suelos estudiados hubiese la misma cantidad de pireno marcado adsorbido, lo que se hizo fue, atendiendo a las K_d determinadas para estos suelos cuando se hizo la cinética de adsorción de cada uno, ajustar la cantidad de suelo y la cantidad de fase acuosa necesaria para que la fracción de sustrato adsorbido en el suelo (f_s) sea la misma. Utilizando la siguiente ecuación:

$$f_w = \frac{1}{1 + (r_{sw} * K_d)} \quad (12)$$

y teniendo en cuenta que $f_s = 1 - f_w$, si despejamos de aquí r_{sw} , tenemos esta otra ecuación:

$$r_{sw} = \frac{f_s}{K_d(1 - f_s)} \quad (13)$$

en la cual sabemos el valor de K_d para cada suelo, y el valor de f_s lo fijamos, porque es lo que queremos que sea igual en todos los suelos. Así obtendremos un valor de r_{sw} para cada suelo, que será la relación sólido-agua que tendremos que poner en el experimento de adsorción en cada suelo en concreto.

Una vez que hacemos la adsorción del pireno marcado en los suelos, lo que se hizo fue retirar todo el líquido de los botes, centrifugando durante una hora a 8000 rpm. A continuación recuperamos el suelo de los tubos de centrifuga, lo pasamos a un matraz erlenmeyer de 250 ml, añadimos 90 ml de medio de mineralización, e inoculamos con 1 ml del inóculo preparado de *Mycobacterium gilvum* VM552 (cultivada en pireno) que contenía $10^6 - 10^9$ UFC/ml. El inóculo se preparó siguiendo el protocolo expuesto en el apartado III.6. La mineralización se siguió como se mencionó en apartados anteriores.

III.10 ENSAYOS PARA LA SIMULACIÓN EN LOS SUELOS DE CONTAMINACIÓN POR HAPs DEBIDA A DEPOSICIÓN ATMOSFÉRICA DE PARTÍCULAS DE HOLLÍN.

Para la realización de estos ensayos se utilizó una muestra que fue recopilada de unos 10 tubos de escape de vehículos diesel de un garaje local y a la cual denominamos hollín diesel. Esta muestra fue purificada siguiendo el siguiente protocolo: se pasó por tamiz de 63 μm . A continuación se lavó durante 4 horas en agitación orbital a 150 rpm, con 100 ml de una solución de cloruro de calcio 0,01M. Esta solución fue preparada con agua Milli-Q previamente filtrada con filtro de 45 μm . Después se centrifugó en tubos de metal 20 minutos a 4670 rpm y el pellet obtenido se volvió a lavar como se hizo inicialmente pero ahora durante 19 horas. Después se volvió a centrifugar, se eliminó el sobrenadante del centrifugado y el pellet obtenido se secó en estufa a 80°C durante 48 horas. Una vez seco, se le pasó por encima un imán, para eliminar los posibles restos de metales y después se pasó de nuevo por un tamiz de 63 μm . De esta forma ya tenemos purificada la muestra de hollín diesel (Jonker y Kolemans, 2002).

En los ensayos pertenecientes a este apartado, lo que se usaron fueron muestras de suelos las cuales fueron previamente mezcladas con 1% (p/p) del hollín diesel y homogeneizando la mezcla en mortero de agata.

La determinación del contenido total de HAPs tanto del hollín diesel como de la mezcla de muestra de suelo más el 1% de éste, se hizo siguiendo el protocolo de extracción y clean-up explicado en el apartado III.4 y el análisis por HPLC explicado en el apartado III.5.1. Para la extracción del hollín diesel se utilizó una submuestra de 0,5 gramos y se extrajo con 100 ml de la mezcla acetona/diclorometano (1:1), usando para el soxhlet un cartucho de celulosa de medidas 19*90 mm.

Con las muestras de suelo enriquecidas con 1% del hollín diesel se realizaron tres tipos de experimentos: determinación de la fracción resistente a tiempo final del experimento de biodegradación con *Mycobacterium gilvum* VM552 y cinética de adsorción con posterior mineralización.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS



IV.1 CONTENIDO EN HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN LOS SUELOS ESTUDIADOS.

Para la identificación y cuantificación de los HAPs presentes en los suelos, en primer lugar se procedió a la extracción de estos compuestos siguiendo el protocolo descrito en la sección III.4, y después se procedió al análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Este análisis se realizó siguiendo el protocolo descrito en el sección III.5.

De la relación de muestras que aparece reflejada en la tabla III.1, se analizaron el máximo número de muestras posibles. En cada suelo se cuantificaron los siguientes 16 compuestos (en los casos que fue posible), recogidos por la US-EPA como HAPs prioritarios: Naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(ghi)perileno e indeno(1,2,3-c,d)pireno. Los resultados de estos análisis están reflejados en las tablas VIII.1 del anexo. En estas tablas la numeración de las muestras se corresponde con la tabla III.1, (a) y (b) corresponden, respectivamente, a los niveles superficial (0-25 cm) y profundo (25-50 cm) en el punto de muestreo. Cuando no se indica, los valores corresponden a la capa superficial. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación típica entre determinaciones por duplicado. Cuando no se indica, el compuesto sólo se pudo cuantificar en uno de los duplicados.

En las tablas VIII.1 del anexo, puede observarse que los compuestos naftaleno, acenaftileno y acenafteno no se detectaron en ninguna de las muestras. Los compuestos que se detectaron en todas las muestras fueron fenantreno y pireno, y en la mayoría de los casos, salvo en algunas excepciones, son los que aparecen en mayor concentración. Por ello son estos dos los que se utilizaron como compuestos diana a la hora de estudiar la bioaccesibilidad de los HAPs en los suelos.

De todas las muestras analizadas en el Campo de Gibraltar, la que posee un mayor contenido en HAPs totales es la nº 1 (1366,0 µg/Kg). Esta muestra corresponde a la zona de la Cantera Coalsa, la cual está relativamente próxima a un vertedero de residuos de la empresa Interquisa. Esta muestra fue tomada cerca de una mancha generada por el vertido anómalo de residuos de petróleo, por lo que este alto nivel en HAPs era el esperado por tratarse de un emplazamiento con una contaminación de tipo local.

La muestra nº 6 también posee un alto contenido en HAPs totales, si la comparamos con el resto. Esto se debe a que esta muestra pertenece a un suelo industrial, ya que fue tomada en el interior de la refinería CEPESA.

Las muestras 3, 4 y 7 (correspondientes al interior de la refinería y adyacentes a ésta) presentaron valores de HAPs totales menores a los de la muestra 5 (muestreada a un punto más alejado del polígono petroquímico),

por lo que no se observó una clara influencia de la proximidad al polígono petroquímico sobre el contenido en HAPs de los suelos analizados en ese emplazamiento. Esto sugiere que la contaminación difusa de esos suelos, causada probablemente por deposición atmosférica, puede ocurrir a una mayor escala espacial. Al contenido de HAPs totales en la muestra 5, puede también contribuir, por una parte, la cercanía en ese punto a una autovía, lo que puede causar contaminación de HAPs por emisiones del tráfico rodado. El valor correspondiente a la muestra 7, puede explicarse porque las actividades de regeneración del vertedero, tanto en el mismo punto como en zonas adyacentes, pueden haber causado una reducción en los niveles de HAPs en ese punto.

El análisis de HAPs a dos niveles en el suelo (de 0-25 cm y de 25-50 cm) se realizó en los puntos 4 (exterior en una vaguada con eucaliptos), 7 (suelo adyacente al antiguo vertedero de CEPESA), 9 (suelo adyacente al vertedero Barranco Bochorno) y 16 (zona de antiguo enterramiento de Interquisa) obteniéndose diferentes resultados. En la zona de eucaliptos se observó una gran diferencia en el contenido de HAPs entre los dos niveles, ocurriendo una mayor concentración de HAPs en la capa más profunda. En cambio, en el suelo adyacente al vertedero la concentración fue muy parecida en ambos niveles. Es difícil estimar la causa de esta heterogeneidad.

El contenido en HAPs totales (suma de HAP detectados) de los suelos analizados en el polígono petroquímico osciló entre 55,3 y 1250,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, con una media de 306,6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (muestras 3, 4a-b, 5, 6 y 7a-b). La muestra de sedimento analizada (arroyo Madre Vieja- muestra 10) y de suelo en el exterior a la empresa Interquisa (muestra 15) presentaron valores de HAPs totales dentro de ese rango.

En las muestras correspondientes a suelos forestales (muestras 19, 20, 21, 22, 26, 28 y 29) se observó que, a pesar de la distancia con respecto a los principales núcleos urbanos e industriales, se podían detectar claramente los HAPs. De hecho, la concentración detectada de HAPs totales fue superior a gran parte de los puntos muestreados en el polígono petroquímico. La incorporación de estos contaminantes al suelo puede deberse a la deposición atmosférica desde los núcleos urbanos distantes, próximos a Algeciras, y/o desde zonas más próximas, debido a la quema, intencionada o no, de material vegetal. El posible papel de la materia orgánica de los suelos sobre estos niveles será tratado más adelante.

En el análisis de HAPs totales de las muestras correspondientes a Puente Mayorga, se observó que en la muestra n° 38 (situada a 50 m de la unidad móvil de captación atmosférica), no fue muy diferente al nivel de fondo determinado en muestras anteriores. Sin embargo, en la muestra n° 40 (situada a 500 m de la unidad móvil de captación atmosférica), el contenido detectado (695,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) fue uno de los valores más altos de los niveles observados en el CG, con la excepción de un suelo industrial y de otro afectado por un vertido de hidrocarburos (muestras 6 y 1, con 1250,0 y

1366,0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, respectivamente). La razón de este alto contenido en HAPs puede deberse a fenómenos de deposición tanto desde la central térmica como desde la autovía situada a unos 20 m del punto de muestreo.

En cuanto a las muestras correspondientes a suelos de alta montaña (nº41, 42 y 43) podríamos destacar que la muestra 41, que corresponde al pirineo aragonés, posee un alto contenido en HAPs, mientras que las otras dos poseen un contenido total en HAPs que se encuentra dentro del mismo rango en el que estaban la mayoría de las muestras del Campo de Gibraltar. En estas tres muestras el HAP que aparece en mayor proporción es el fenantreno, seguido del pireno. De los HAPs de más alto peso molecular, hay que destacar que en la muestra de los Pirineos (41) aparece en una gran proporción el benzo(b)fluoranteno y el benzo(ghi)perileno.

Los resultados obtenidos para la concentración de HAPs totales en la capa superficial de suelo (0-25 cm) en los puntos analizados, aparecen reflejados en la figura IV.1. De esta figura se han excluido dos muestras, en concreto la muestra nº 6, obtenida del interior de la refinería CEPSA, con un contenido de HAPs totales de 1250,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y la muestra nº 1, procedente de un vertido anómalo de hidrocarburos en la cantera coalsa, con un contenido de HAPs totales de 1366,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Ambas muestras se han excluido de la evaluación por ser suelo industrial (muestra 6) y por representar un emplazamiento de contaminación de tipo local (muestra 1).

Los valores correspondientes a las muestras del Campo de Gibraltar dan una media de 282,7 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, que puede considerarse como una contaminación de fondo, probablemente debido a deposición atmosférica en la mayoría de los casos. Este valor está muy próximo al contenido medio observado en suelos rurales ingleses, 187,2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Wild y Jones, 1995) y se encuentra por debajo del valor de fondo considerado en otros países europeos (Nivel I en tabla I.5).

En cuanto a las concentraciones de HAP individuales, con la excepción de benzo(a)pireno, en ningún caso se sobrepasaron los niveles genéricos de referencia para protección de la salud humana contemplados en el Real Decreto de 2005 (RD) para suelos sin restricciones de uso. En la figura IV.2, aparecen las concentraciones de benzo(a)pireno, que alcanzaron un valor medio en el Campo de Gibraltar de 13,9 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, por debajo del NGR correspondiente (20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Sólo en las muestras 17 (vertedero Zabal), 26 (monte de la Almoraima, dehesa Cotillas) y 39 (Puente Mayorga 2ª muestra) se sobrepasó este nivel, pero en ningún caso se sobrepasó las 100 veces que contempla el RD para considerarlos suelos contaminados.

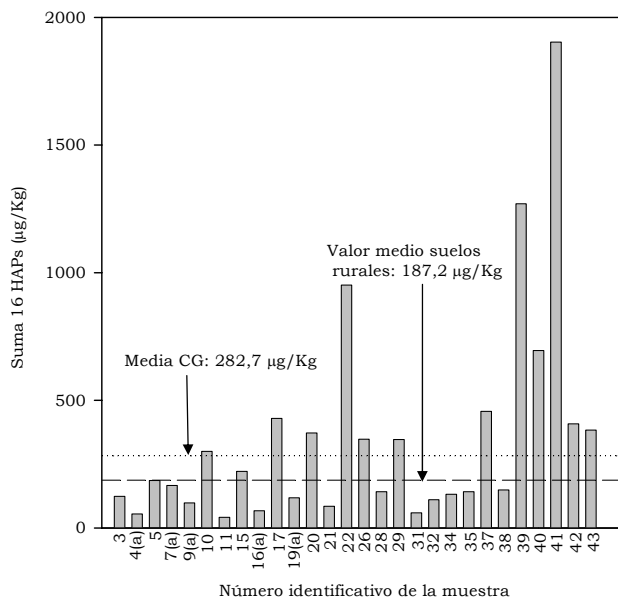


Figura IV.1. Contenido en HAPs totales en la capa superficial de suelo (0-25 cm) en los puntos analizados, y comparación con el contenido medio de suelos rurales en el Reino Unido. Los números identificativos de las muestras se corresponden con los de la tabla III.1 (Wild y Jones, 1995).

En relación a los NGR propuestos para la protección de los ecosistemas, en ningún caso se sobrepasaron, en las muestras estudiadas, los niveles propuestos en el RD para la protección de los organismos del suelo y vertebrados terrestres. Sin embargo, los niveles para la protección de organismos acuáticos se sobrepasaron en algunos puntos y HAPs específicos. Este hecho se ejemplifica en la figura IV.2.A, donde puede observarse que el NGR de benzo(a)pireno para la protección de los organismos acuáticos, se sobrepasó en 6 de las muestras estudiadas, pero de igual forma en ningún caso se sobrepasó las 100 veces que contempla el RD.

De la misma forma en la figura IV.2.B, puede observarse que las concentraciones de pireno alcanzaron un valor medio en el Campo de Gibraltar de 38,7 µg/Kg, muy por encima del NGR para la protección de los organismos acuáticos (10 µg/Kg), que se sobrepasó en 9 de las 25 muestras estudiadas, pero de igual forma en ningún caso se sobrepasó las 100 veces que contempla el RD.

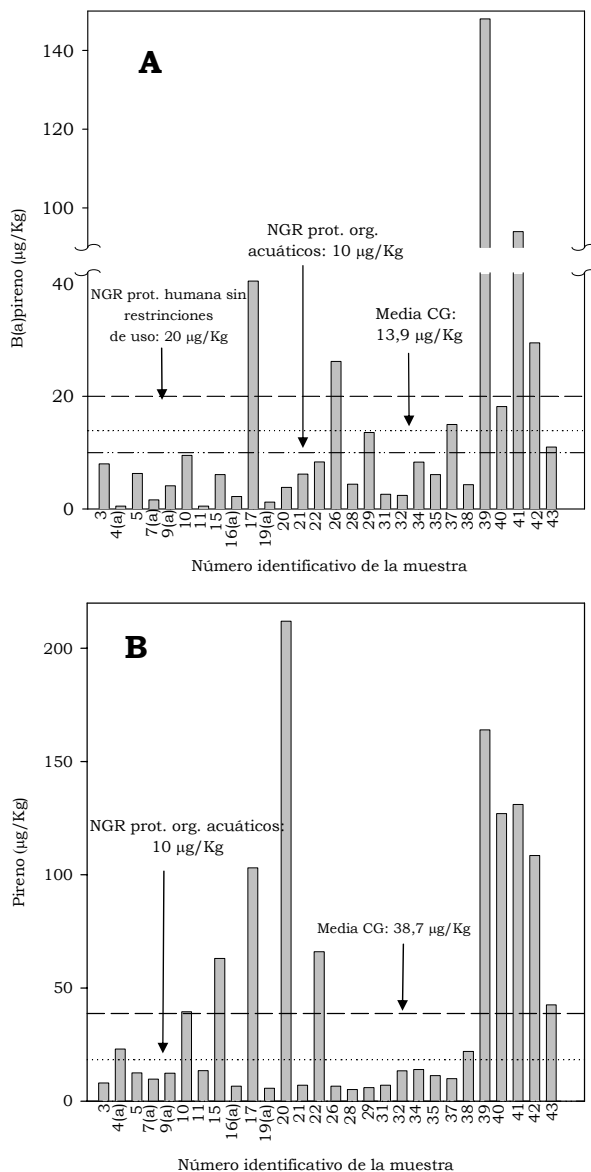


Figura IV.2. Contenido en benzo(a)pireno (A) y en pireno (B) en la capa superficial de los suelos analizados. Los números identificativos de las muestras se corresponden con los de la tabla III.1.

A efectos comparativos, en la figura IV.1 y IV.2 se han incluido, además de las muestras pertenecientes al Campo de Gibraltar, las tres muestras correspondientes a los suelos de altas montañas. Las muestras 42 y 43 no sobrepasan para ninguno de los HAPs los NGR, pero la muestra 41, correspondiente a los pirineos, sobrepasa los NGR para la protección de los organismos acuáticos, en el caso del antraceno, fluoranteno, pireno y benzo(a)antraceno, y sobrepasa el NGR para la protección de la salud humana para suelos sin restricciones de uso en el caso del dibenzo(ah)antraceno. Pero en ninguno de estos casos se sobrepasa las 100 veces que contempla el RD para considerarlos suelos contaminados.

Como conclusión a este apartado podemos decir que la evaluación de los datos obtenidos con respecto a los niveles genéricos de referencia (NGR) recogidos en el “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”, da como resultado la ausencia de problemas significativos de contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos en los suelos estudiados.

IV.2 SELECCIÓN DE LOS SUELOS PARA LOS ESTUDIOS DE BIOACCESIBILIDAD.

IV.2.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN MATERIA ORGÁNICA DE LOS SUELOS.

En las tablas VIII.1 que aparecen en el anexo de este trabajo, se ha incluido el contenido en materia orgánica de todos los suelos, el cual se estimó a partir de su contenido en carbono orgánico, que fue determinado siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.3.1.

En la figura IV.3 se representa para cada punto analizado, la concentración de fenantreno nativo (A) y pireno nativo (B) frente a materia orgánica del suelo. Aunque es difícil establecer una clara relación debido a los complejos factores que controlan el destino de HAPs en los suelos, se puede observar una cierta tendencia en los suelos analizados a acumular más cantidad de compuesto a una mayor proporción de materia orgánica. En esta figura se ha querido destacar la diferencia entre las muestras del Campo de Gibraltar y las de las altas montañas, de forma que puede observarse cómo en las altas montañas (muestra nº 43), al ser suelos con muy alto contenido en materia orgánica, el contenido de fenantreno acumulado es mayor.

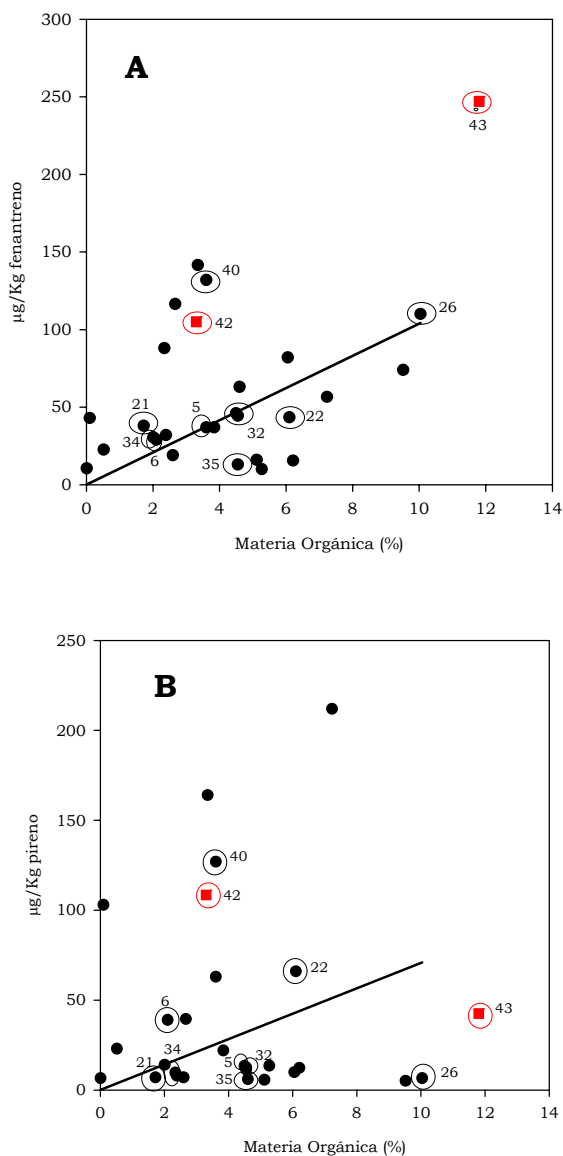


Figura IV.3. Contenido en fenantreno (A) y pireno (B) en los suelos analizados pertenecientes al Campo de Gibraltar (puntos) y pertenecientes a las altas montañas (cuadrados), frente a su contenido en materia orgánica. Se representa en la gráfica la regresión lineal de sólo los suelos del Campo de Gibraltar. Se señalan con círculos los suelos seleccionados para los ensayos de bioaccesibilidad.

Para el estudio de bioaccesibilidad se seleccionaron, a partir de todas las muestras analizadas, una relación de suelos que diferían tanto en la concentración de fenantreno (13 - 1055,0 µg/kg) y pireno (6,6 - 131 µg/kg) nativo y en la cantidad de materia orgánica (1,72 - 42,8 %). Estos puntos aparecen rodeados con un círculo en la figura IV.3: suelo industrial, muestra n° 6 (Cepsa I), tres suelos agrícolas (muestra n° 5, 34 y 35), suelos urbanos (muestra n°32 y 40) y seis suelos forestales de los cuales tres pertenecen al monte Alcornocal del Campo de Gibraltar (muestra n° 21, 22 y 26) y los otros tres pertenecen a suelos de altas montañas (muestra n° 41, 42 y 43).

IV.2.2 CARACTERIZACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR HAPs.

Para poder identificar cual es el origen de la contaminación por HAPs en las muestras, se utilizaron las relaciones diagnósticas entre varios de estos compuestos, como se explicó en el apartado I.5.2. Las relaciones usadas en estas muestras son concretamente: antraceno/(antraceno + fenantreno), fluoranteno/(fluoranteno + pireno), benzo(a)pireno/(benzo(a)pireno + criseno), 1,7-dimetilfenantreno/(1,7- + 2,6-dimetilfenantreno). Los valores de estos índices de origen para las muestras de suelos seleccionadas aparecen reflejados en la figura IV.4.

En esta figura puede observarse que en la mayoría de las muestras, tanto en las pertenecientes al Campo de Gibraltar como en las de las altas montañas, el índice de origen indica la combustión como la causa de la contaminación por HAPs en los suelos seleccionados.

En esta sección se determinó también el número de microorganismos autóctonos degradadores de fenantreno (UFC) de los suelos. Para ello se siguió el protocolo descrito en la sección III.7.2. Este resultado aparece reflejado en la tabla IV.1.

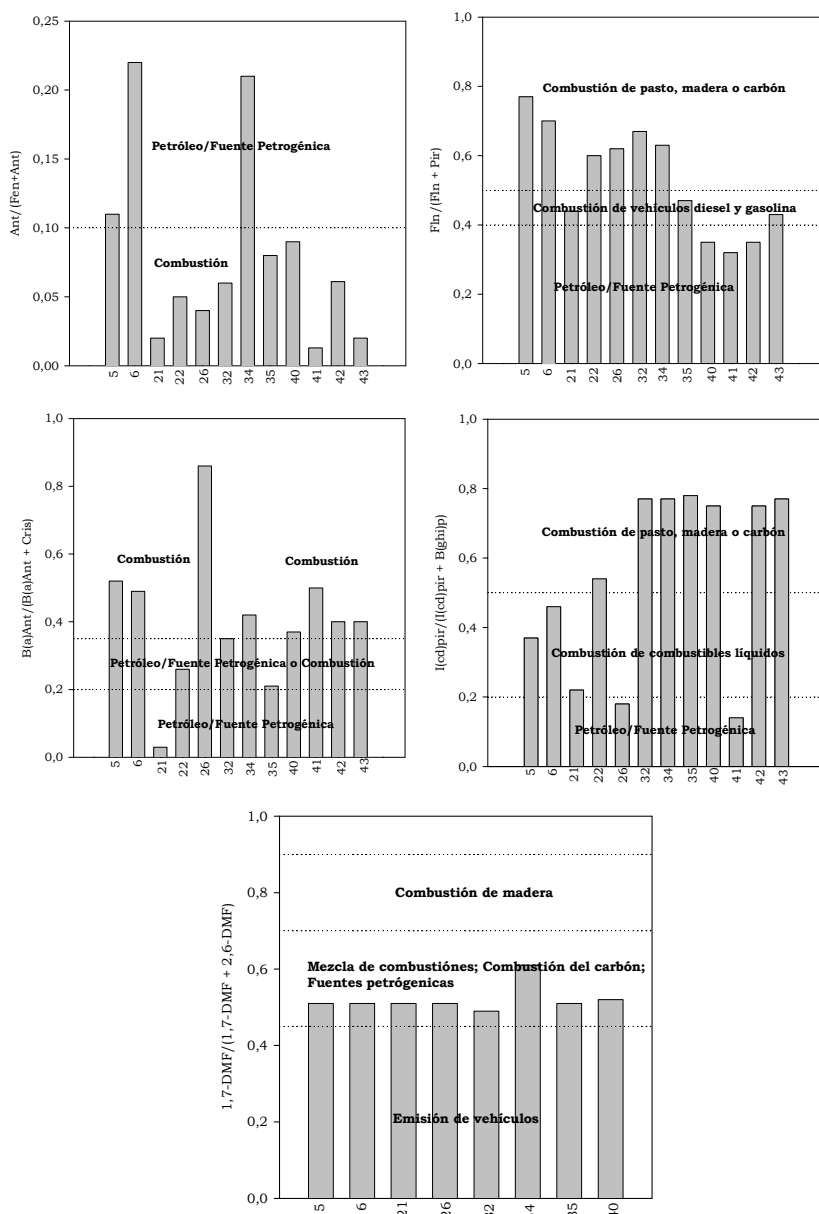


Figura IV.4. Valores para los suelos seleccionados de los índices de origen por HAPs, considerados para determinar la fuente de contaminación por estos compuestos. El número que aparece en el eje x de esta figura es el n° identificativo de la muestra, el cual se corresponde con el de la tabla III.1.

Tabla IV.1 Contenido en HAPs y cantidad de UFC de fen de las muestras de suelo.

Muestra	HAPs totales ($\mu\text{g/Kg}$)	Fen ($\mu\text{g/Kg}$)	Pir ($\mu\text{g/Kg}$)	UFC g⁻¹ de suelo de Fen
Suelo forestal, Teja I (21)	85,1	38,0	7,0	1,02 *10 ⁸
Exterior a la refinería Cepsa (34)	132,0	30,5	14,0	4,70 *10 ⁶
Suelo industrial, Cepsa I (6)	1250,0	29,0	39,0	N.D ^a
Suelo Forestal Montseny (42)	407,7	105,0	108,5	N.D ^a
Suelo urbano Puente Mayorga III (40)	695,0	132,0	127,0	5,25 *10 ⁷
Adyacente a la estación de control de los Barrios (32)	111,0	46,0	13,4	2,60 *10 ⁸
Suelo Agrícola, Petroquímica III (5)	186,0	44,5	12,5	N.D ^a
Exterior a la refinería Cepsa, Prado Vazquez de la Chica (35)	142,0	13,0	11,3	1,13 *10 ⁸
Suelo forestal, Teja II (22)	951,6	43,5	66,0	8,50*10 ⁴
Suelo forestal , Almoraima I (26)	347,6	110,0	6,6	9,40 *10 ⁷
Suelo forestal, Tatra (43)	384,0	247,1	42,5	N.D ^a
Suelo forestal, Pirineos (41)	1903,4	1055,0	131,0	N.D ^a

^aNo determinado

IV.2.3 ESTIMACIÓN DE LA PERSISTENCIA DE HAPs: MINERALIZACIÓN Y VOLATILIZACIÓN.

Una vez que tenemos constancia de la existencia de microorganismos autóctonos degradadores de fenantreno en el suelo, se procedió al estudio de la persistencia de los HAPs en los suelos seleccionados, la cual se llevó a cabo tal y como se explica en la sección III.7.1. En la figura IV.5 se reflejan las curvas de mineralización obtenidas. En esta figura puede observarse la existencia de poblaciones microbianas en los suelos con el potencial de mineralizar HAPs, aunque lentamente (especialmente en el caso de pireno).

En la tabla IV.2 se representan los datos obtenidos en estos ensayos. Aquí puede observarse que las tasas máximas y los porcentajes finales son mayores en el caso del fenantreno.

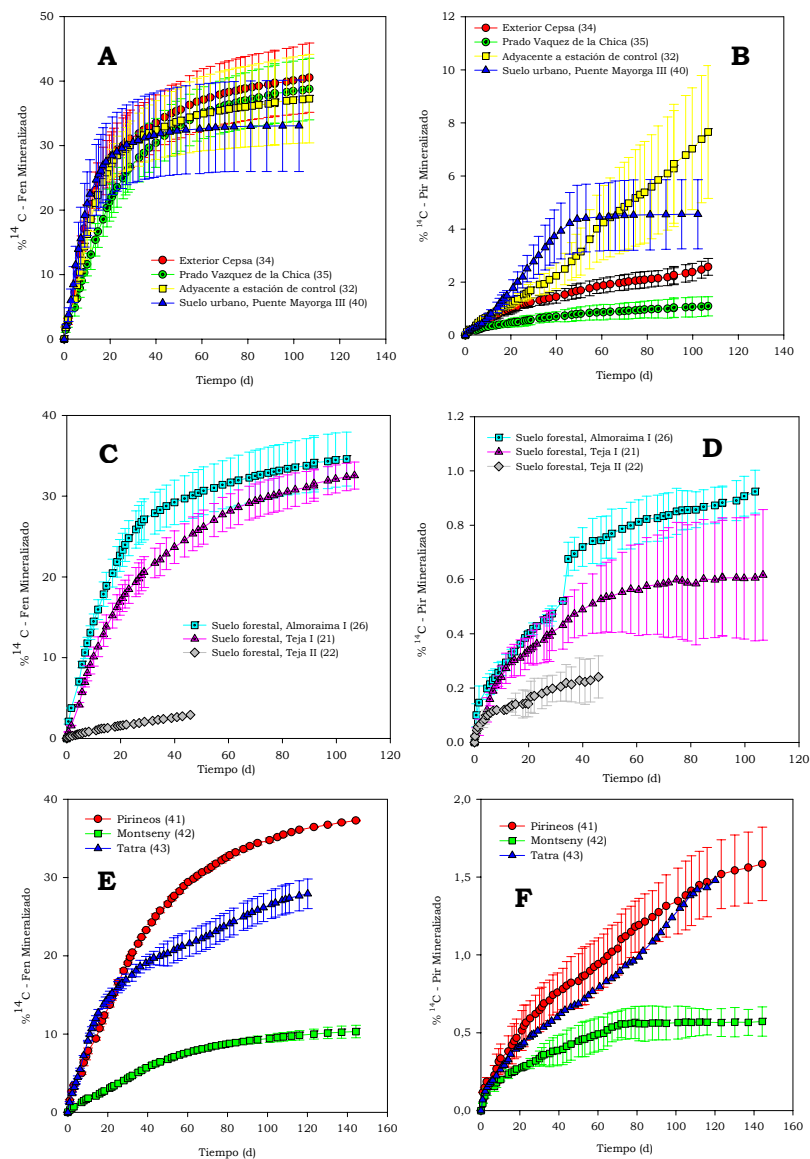


Figura IV.5. Mineralización de ^{14}C - fenantreno (A, C y E) y ^{14}C -pireno (B, D y F) durante los ensayos de persistencia. Las gráficas A, B, C y D corresponden a muestras pertenecientes al Campo de Gibraltar y las gráficas E y F corresponden a las muestras forestales de alta montaña, Pirineos, Montseny y Tatra.

Tabla IV.2. Resultados de los datos obtenidos en la mineralización de ^{14}C - fenantreno y ^{14}C -pireno durante los ensayos de persistencia.

Muestra de suelo	Tasa Máxima (% día⁻¹)	Porcentaje final
FENANTRENO		
Suelo forestal, Teja I (21)	1,1 ± 0,1	32,4 ± 1,7
Suelo forestal, Teja II (22)	0,1 ± 7*10 ⁻⁴	2,9 ± 2*10 ⁻³
Suelo forestal, Almoraima I (26)	1,7 ± 0,6	34,6 ± 3,3
Adyacente a la estación de control de los Barrios (32)	2,0 ± 0,5	37,2 ± 6,8
Exterior a la refinería Cepsa (34)	2,4 ± 0,7	40,3 ± 5,4
Prado Vaquez de la Chica, CEPSA V (35)	1,4 ± 0,1	38,6 ± 4,8
Suelo urbano, Puente Mayorga III (40)	1,6 ± 0,1	33,1 ± 7,1
Suelo forestal, Montes Pirineos (41)	1,2 ± 0,1	37,3 ± 0,1
Suelo forestal, Montes Montseny (42)	0,2 ± 0,1	10,3 ± 0,8
Suelo forestal, Montañas Tatra (43)	0,9 ± 0,1	27,9 ± 1,9
PIRENO		
Suelo forestal, Teja I (21)	0,1 ± 1*10 ⁻³	0,6 ± 0,2
Suelo forestal, Teja II (22)	N.D ^a	N.D ^a
Suelo forestal, Almoraima I (26)	0,1 ± 0,03	0,9 ± 0,1
Adyacente a la estación de control de los Barrios (32)	0,1 ± 0,03	7,4 ± 2,4
Exterior a la refinería Cepsa (34)	5*10 ⁻² ± 1*10 ⁻²	2,5 ± 0,3
Prado Vaquez de la Chica, CEPSA V (35)	4*10 ⁻² ± 7*10 ⁻³	1,1 ± 0,4
Suelo urbano, Puente Mayorga III (40)	0,1 ± 1*10 ⁻²	4,56 ± 1,3
Suelo forestal, Montes Pirineos (41)	0,1 ± 0,1	1,6 ± 0,2
Suelo forestal, Montes Montseny (42)	5*10 ⁻² ± 1*10 ⁻²	0,6 ± 0,1
Suelo forestal, Montañas Tatra (43)	0,1 ± 1*10 ⁻²	1,6 ± 0,2

^aNo determinado

En la figura IV.6 se representa la persistencia de los HAPs diana en los suelos estudiados. Se observó una gran persistencia de los compuestos nativos al final de los 100 días de ensayo, a pesar de detectarse un porcentaje significativo de mineralización (30-40% en el caso de fenantreno).

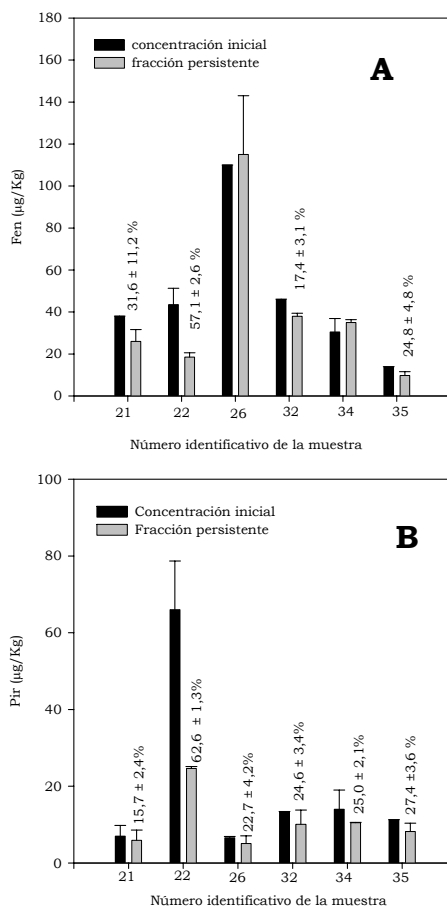


Figura IV.6. Persistencia de fenantreno (A) y pireno (B) nativo. Los números indican la diferencia (en porcentaje) entre concentraciones iniciales y finales. Las muestras seleccionadas para este estudio fueron: la n° 21 (Suelo forestal, Teja I), n° 22 (Suelo forestal, Teja II), n° 26 (Suelo forestal, Almoraima I), n° 32 (Adyacente a estación de control), n° 34 (Exterior Cepsa) y n° 35 (Prado Vazquez de la Chica).

IV.3 ESTIMACIÓN DE LA BIOACCESIBILIDAD DE HAPs EN LOS SUELOS SELECCIONADOS.

Una vez que se determinó el contenido en HAPs de los suelos y su persistencia, se intentó tener conocimiento de cómo son las cinéticas de desaparición de los compuestos diana en los suelos que se han seleccionado, en presencia de una activa capacidad biodegradadora. Para ello se utilizó un microorganismo degradador de HAPs (*Mycobacterium gilvum* VM552), representativo de la flora microbiana del suelo. El principal objetivo de este abordaje era potenciar al máximo la actividad biológica, y determinar hasta qué punto la persistencia observada con anterioridad era atribuible a factores biológicos o físico-químicos. El estudio se centró en los 5 HAPs biodegradados por esta estirpe (fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno y benzo(a)pireno) aunque también se realizó un seguimiento de otros HAPs, principalmente como control del proceso.

En la figura IV.7 se han representado para el fenantreno y para el pireno, las curvas de mineralización junto con las cinéticas de desaparición. En estas cinéticas de desaparición las líneas discontinuas representan el ajuste de los datos experimentales al modelo bifásico. En estas curvas de mineralización la tasa máxima obtenida (en % día⁻¹) para el fenantreno y pireno fueron respectivamente $44,02 \pm 0,03$ y $80,07 \pm 1,2$. El porcentaje final de mineralización obtenido para fenantreno y pireno fueron respectivamente $37,41 \pm 6,2$ y $47,5 \pm 6,6$.

A efectos comparativos de este ensayo, se realizó otro en el cual a la misma muestra de suelo se le añadió, previamente a los ensayos de mineralización y biodegradación, 1 mg/Kg de pireno (figura IV.7.C) con el objetivo de poder ver si al aumentar la cantidad de HAP inicial en el suelo, la cinética de desaparición variaba. En este caso la tasa máxima obtenida (en % día⁻¹) para el pireno fue $16,1 \pm 1,1$ y el porcentaje final de mineralización fue $44,4 \pm 0,2$.

En las tres gráficas de la figura IV.7, puede observarse la cinética bifásica de desaparición que siguen los HAPs, en la cual existe una primera fase, de desaparición rápida, que se da entre los cinco o diez primeros días del ensayo, seguida de una segunda fase, de desaparición lenta, que se alarga hasta el final del periodo experimental.

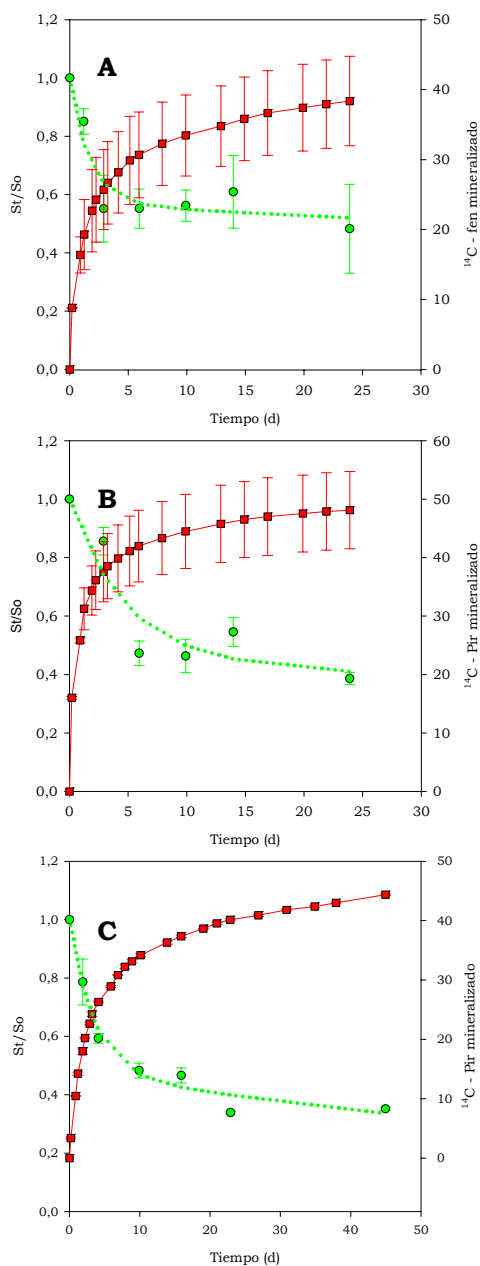


Figura IV.7. Mineralización (rojo) y desaparición (verde) de fenantreno (A), pireno (B) y de 1 mg/Kg de pireno añadido (C) en un suelo forestal (muestra 22) perteneciente al Monte la Teja en el Campo de Gibraltar. El suelo fue inoculado con *Mycobacterium gilvum* VM552 (1×10^7 UFC/g). Para la cinética de desaparición la línea discontinua representa el ajuste de los datos experimentales al modelo bifásico.

Para el resto de los HAPs considerados también se hizo el seguimiento de su desaparición, el cual aparece en la figura IV.8. En el caso de los HAPs que son biodegradados por *Mycobacterium gilvum* VM552 también se hizo el ajuste de los datos experimentales al modelo bifásico (figura IV.8.A).

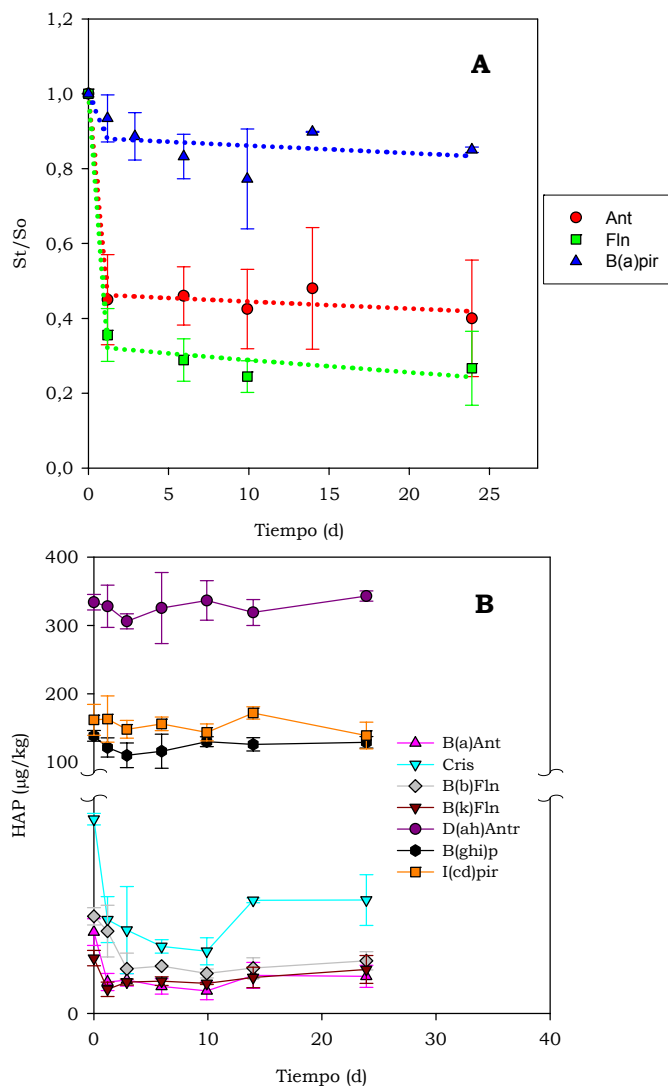


Figura IV.8. Cinéticas de desaparición de los HAPs biodegradables (A) y no biodegradables (B) en el suelo forestal n°22 (Monte de la Teja II) del Campo de Gibraltar. El suelo fue inoculado con *Mycobacterium gilvum* VM552 (1×10^7 UFC/g). En el caso A, las líneas discontinuas representan el ajuste de los datos experimentales al modelo bifásico.

Para el caso del benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, dibenzo(ah)antraceno, benzo(ghi)perileno y indeno(cd)pireno, se observó que prácticamente la concentración no variaba a lo largo del tiempo.

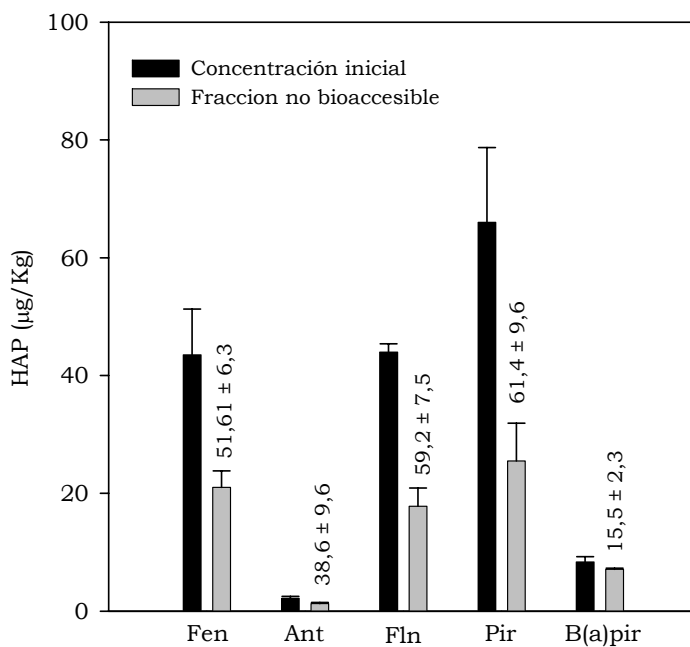


Figura IV.9. Bioaccesibilidad de los HAPs nativos en el suelo n°22 inoculado con *Mycobacterium gilvum* VM552. Los números indican la diferencia entre concentraciones iniciales y finales.

La bioaccesibilidad de todos los compuestos estudiados aparece en la figura IV.9. En la tabla IV.3 aparece reflejado para estos compuestos, el tamaño de las fracciones rápida y lenta de las cinéticas de desaparición, las constantes cinéticas rápida y lenta, y el tiempo de vida media de la fracción rápida y lenta.

Tabla IV.3. Tamaño de la fracción rápida y lenta, constantes cinéticas y tiempo de vida media de las cinéticas de desaparición de los compuestos biodegradados en suelo forestal inoculado con *Mycobacterium gilvum* VM552.

HAP	[HAP] _{inicial} µg/Kg	[HAP] _{final} µg/Kg	F _{rap} (%)	F _{len} (%)	K _{rap} (d ⁻¹)	K _{len} (*10 ⁻³ d ⁻¹)	t _{1/2 rap} ^a (d)	t _{1/2 len} ^b (d)
Fen	43,5 ± 7,8	21,0 ± 2,8	43,9 ± 8,1	58,1 ± 8,3	0,65 ± 0,05	12,0 ± 2,0	1,13 ± 0,03	63,8 ± 14,5
Ant	2,2 ± 0,3	1,3 ± 0,2	55,0 ± 3,5	44,0 ± 2,8	9,8 ± 0,02	4,0 ± 1,0	0,07 ± 0,01	160,9 ± 12,6
Fln	44,0 ± 1,4	17,8 ± 3,1	65,1 ± 1,2	33,5 ± 2,1	11,5 ± 2,6	8,0 ± 0,5	0,06 ± 0,01	76,5 ± 28
Pir	66,0 ± 12,7	25,5 ± 6,4	39,6 ± 8,4	60,4 ± 8,4	0,7 ± 0,02	2,03 ± 1,0	1,03 ± 0,05	30,3 ± 1,6
Pir (1mg/Kg añadido)	1180 ± 4,2	415 ± 10,0	52,3 ± 8,5	48,4 ± 7,6	0,34 ± 0,14	7,0 ± 2,0	2,27 ± 0,90	66,5 ± 3,2
B(a)pir	138,5 ± 7,8	129,0 ± 8,5	15,6 ± 0,04	84,5 ± 4,3	13,0 ± 0,002	0,5 ± 0,2	0,05 ± 0,01	2736,5 ± 143,7

^a tiempo de vida media de la fracción rápida. ^b tiempo de vida media de la fracción lenta.

Los valores obtenidos para $F_{\text{ráp}}$ fueron mayores para el caso de fenantreno, antraceno y fluoranteno. El menor valor de esta fracción fue para el benzo(a)pireno, por lo que puede decirse que el tamaño de la fracción rápida disminuye cuando aumenta la complejidad molecular del hidrocarburo. Por el contrario el tamaño de la F_{len} presenta el mayor valor para el caso del hidrocarburo con mayor complejidad molecular, de los estudiados en la tabla IV.3. Por lo que puede decirse que la biodisponibilidad del compuesto disminuye cuando aumenta el tamaño molecular.

En cuanto al tiempo de vida media, el correspondiente a la fracción rápida no varía mucho de un compuesto a otro, pero si observamos el de la fracción lenta ocurre que en el caso del benzo(a)pireno llega a ser de 7,5 años. Por lo que puede decirse que este compuesto es altamente persistente y acumulable en el suelo.

Estos resultados indican por tanto que un solo análisis final de los HAPs nativos, realizado lo suficientemente después de que se haya reducido la actividad microbiana (evidenciado mediante radiorespirometría), proporciona una estimación razonable de la bioaccesibilidad del compuesto nativo en una muestra de suelo.

IV.3.1 ESTIMACIÓN DE LA BIOACCESIBILIDAD DE HAPs DIANA, MEDIANTE ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN ACELERADA.

Una vez que teníamos constancia de la forma que tenían las cinéticas de desaparición de los HAPs diana, se determinó la bioaccesibilidad de éstos pero con todos los suelos que tenemos seleccionados para ello. Para estimar la bioaccesibilidad de HAPs diana mediante biodegradación acelerada, se realizaron ensayos siguiendo el protocolo descrito en la sección III.7.3. Los suelos seleccionados fueron inoculados con una estirpe bacteriana conocida, *Mycobacterium gilvum* VM552. En la figura IV.10 se muestra la mineralización de fenantreno y pireno en presencia de *Mycobacterium gilvum* VM552, precultivada en pireno, en diez suelos seleccionados para este estudio. En esta figura se observa que el porcentaje final de mineralización es muy parecido para el fenantreno y para el pireno. En la tabla IV.4 se representan los datos obtenidos en estos ensayos.

Con respecto a la bioaccesibilidad, representada en la figura IV.11, los resultados obtenidos con inoculación no difieren mucho de los obtenidos en el caso de los ensayos de persistencia. Se sigue mostrando una elevada persistencia de los HAPs diana, a pesar de utilizar condiciones que inducían a la rápida mineralización de estos compuestos.

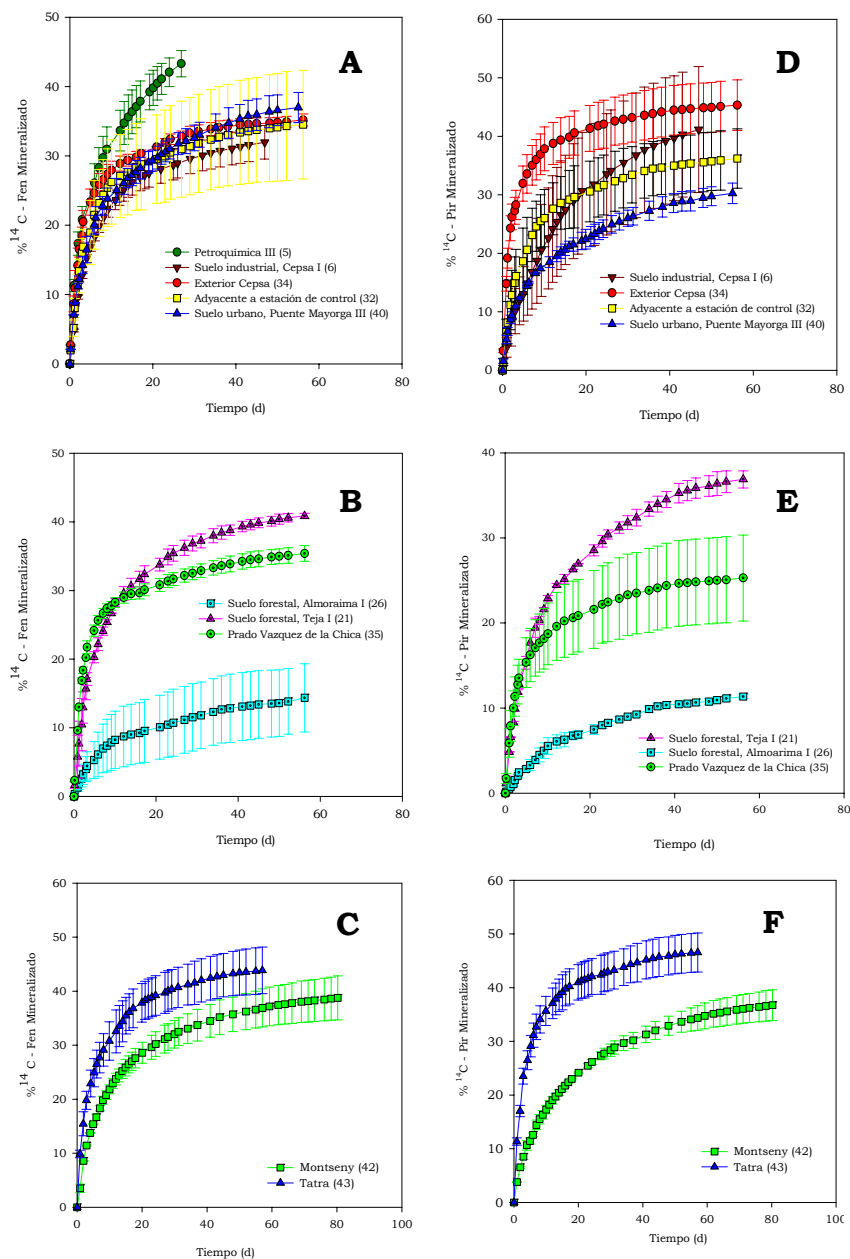


Figura IV.10. Mineralización de ^{14}C -fenantreno (A, B y C) y ^{14}C -pireno (D, E y F) en presencia de *Mycobacterium gilvum* VM552 (2×10^7 UFC/g) para suelos seleccionados en este trabajo. Las gráficas A, B, C y D pertenecen a muestras del Campo de Gibraltar, y las gráficas E y F pertenecen a las muestras forestales de altas montañas Montseny (n° 42) y Tatra (n° 43).

Tabla IV.4. Datos obtenidos en la mineralización de HAPs diana en presencia de *Mycobacterium gilvum* VM552.

Muestra de suelo	Tasa Máxima (% día⁻¹)	Porcentaje final
FENANTRENO		
Petroquímica III (5)	8,8 ± 0,8	43,3 ± 0,2
Suelo industrial, CEPESA I (6)	4,9 ± 0,1	32,0 ± 2,4
Suelo forestal, Teja I (21)	7,5 ± 1,2	40,9 ± 0,4
Suelo forestal, Almoraima I (26)	1,4 ± 0,6	14,4 ± 4,9
Adyacente a la estación de control de los Barrios (32)	5,2 ± 0,3	34,5 ± 7,8
Exterior a la refinería Cepsa (34)	8,2 ± 2,3	35,2 ± 0,9
Prado Vaquez de la Chica. CEPESA V (35)	10,8 ± 0,3	35,4 ± 1,1
Suelo urbano, Puente Mayorga III (40)	7,3 ± 0,1	37,7 ± 2,3
Suelo forestal, Montes Montseny (42)	4,2 ± 0,3	38,7 ± 4,1
Suelo forestal, Montañas Tatra (43)	8,1 ± 3,0	43,9 ± 4,4
PIRENO		
Petroquímica III (5)	ND ^a	ND ^a
Suelo industrial, CEPESA I (6)	4,8 ± 1,3	41,1 ± 10,8
Suelo forestal, Teja I (21)	5,2 ± 0,5	36,9 ± 1,0
Suelo forestal, Almoraima I (26)	0,9 ± 0,1	11,4 ± 0,2
Adyacente a la estación de control de los Barrios (32)	8,6 ± 0,9	36,2 ± 5,1
Exterior a la refinería Cepsa (34)	16,0 ± 1,4	45,3 ± 4,3
Prado Vaquez de la Chica. CEPESA V (35)	6,6 ± 1,5	25,3 ± 5,1
Suelo urbano, Puente Mayorga III (40)	4,2 ± 1,1	30,86 ± 1,9
Suelo forestal, Montes Montseny (42)	3,1 ± 0,3	36,8 ± 2,9
Suelo forestal, Montañas Tatra (43)	1,9 ± 0,1	46,5 ± 3,6

^a No determinado

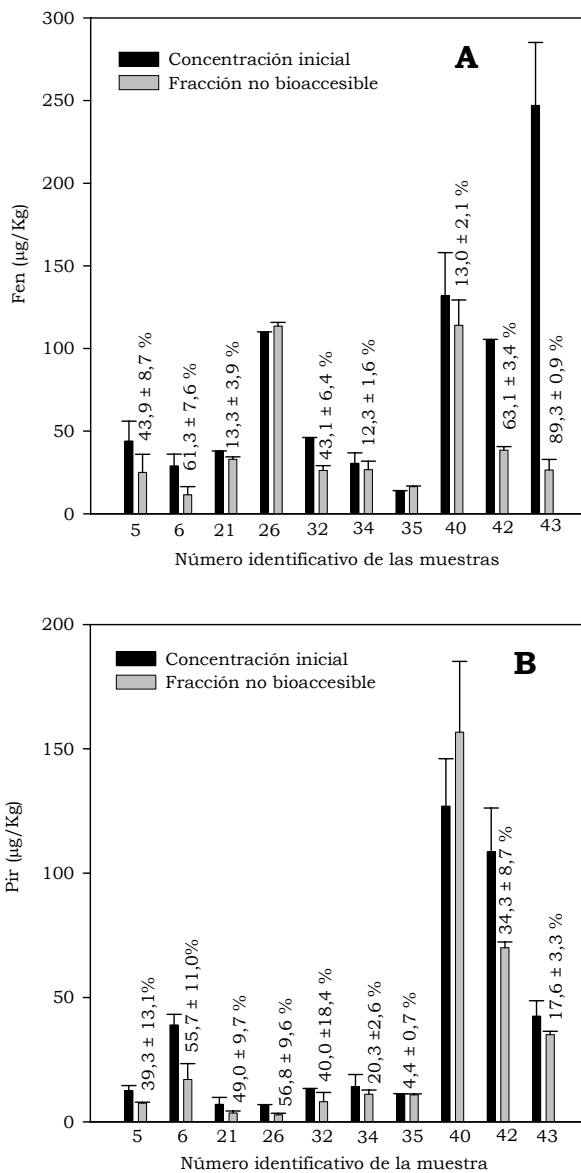


Figura IV.11. Bioaccesibilidad de fenantreno (A) y pireno (B) nativo. Los números indican la diferencia (en porcentaje) entre concentraciones iniciales y finales. El número identificativo de las muestras se corresponde con la tabla IV.4.

IV.4 ESTUDIO DE LOS POSIBLES FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN LA BIOACCESIBILIDAD DE HAPs EN LOS SUELOS.

IV.4.1 INFLUENCIA DE LA MATERIA ORGÁNICA EN LA BIOACCESIBILIDAD.

En la tabla IV.5 aparecen los suelos seleccionados para el estudio de la bioaccesibilidad ordenados de menor a mayor contenido en materia orgánica, junto con el contenido en arcilla y los porcentajes desaparecidos en los distintos ensayos de persistencia y bioaccesibilidad para fenanteno y pireno. En el apartado IV.2.1 se llegó a la conclusión de que en los suelos existe una tendencia a acumular más cantidad de HAPs a una mayor proporción de materia orgánica. Este hecho podría justificarse debido a que la materia orgánica de los suelos tiene una gran afinidad por los compuestos hidrófobos como son los HAPs. Según este hecho ocurriría que cuanto mayor es la materia orgánica más retenidos deberían estar los compuestos en los suelos, por lo que en menor medida se daría la biodegradación, es decir, que menos bioaccesibles serían los HAPs. Por lo que en la tabla IV.5 se debería observar la relación de que cuanto mayor es la cantidad de materia orgánica en el suelo, menor debe ser el porcentaje biodegradado. Pero sin embargo esto no es lo que aparece reflejado en la tabla, ya que por ejemplo en el suelo de mayor contenido en materia orgánica, suelo forestal n°43, existe un gran porcentaje biodegradado de fenantreno por los microorganismos inoculados (89,3 %).

Como resultado a este apartado podemos decir que no existe una clara relación entre el contenido de materia orgánica en los suelos y la bioaccesibilidad de los HAPs. Aunque es cierto que es difícil establecer esta relación ya que son muchos y complejos los factores que controlan el destino de los HAPs en los suelos.

Tabla IV.5 Efecto de la materia orgánica sobre la desaparición de fenantreno y pireno en los ensayos de persistencia y bioaccesibilidad en los suelos seleccionados

Muestras de Suelo	M.O (%)	Arcilla (%)	Fenantreno			Pireno		
			Ensayo de persistencia (%)	Ensayo de bioaccesibilidad (%)	Ensayo de persistencia (%)	Ensayo de bioaccesibilidad (%)	Ensayo de persistencia (%)	Ensayo de bioaccesibilidad (%)
Forestal, Teja I (21)	1,72	48,0	31,6 ± 11,2 ^a	13,3 ± 3,9 ^c	15,7 ± 2,4 ^a	49,0 ± 9,7 ^c		
Exterior Cepsa (34)	2,01	32,8	0,0 ^a	12,3 ± 1,6 ^c	25,0 ± 2,1 ^a	20,3 ± 2,6 ^c		
Cepsa I (6)	2,15	N.D ⁱ	N.D ^j	61,3 ± 7,6 ^d	N.D ^j	55,7 ± 11,0 ^d		
Forestal, Montseny (42)	3,31	N.D ⁱ	N.D ^j	63,1 ± 3,4 ^e	N.D ^j	34,3 ± 8,7 ^e		
Puente Mayorga III (40)	3,60	N.D ⁱ	N.D ^j	13,0 ± 2,1 ^f	N.D ^j	0,0 ^f		
Adyacente a estación de control (32)	4,49	22,4	17,4 ± 3,1 ^a	43,1 ± 6,4 ^c	24,6 ± 3,4 ^a	40,0 ± 18,4 ^c		
Petroquímica III (5)	4,55	32,0	N.D ^j	43,9 ± 8,7 ^g	N.D ^j	39,3 ± 13,1 ^g		
Prado Vazquez de la Chica (35)	4,55	31,7	24,8 ± 4,8 ^a	0,0 ^c	27,4 ± 3,6 ^a	4,4 ± 0,7 ^c		
Forestal, Teja II (22)	6,1	5,5	57,1 ± 2,6 ^b	51,6 ± 6,3 ^h	62,6 ± 1,3 ^b	61,4 ± 9,6 ^h		
Forestal Almoraima (26)	10,04	6,2	0,0 ^a	0,0 ^c	22,7 ± 4,2 ^a	56,8 ± 9,5 ^c		
Forestal, Tatra (43)	11,8	N.D ⁱ	N.D ^j	89,3 ± 0,9 ⁱ	N.D ^j	17,6 ± 3,3 ⁱ		

Los superíndices indican el periodo experimental en días, siendo, ^a 107, ^b 43, ^c 56, ^d 47, ^e 80, ^f 66, ^g 27, ^h 24, ⁱ 57, ^j no determinado.

IV.4.2 INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES EN LA BIOACCESIBILIDAD.

Los resultados obtenidos hasta ahora muestran unas fracciones resistentes a biodegradación significativas, y por lo tanto una gran persistencia de los HAPs estudiados. Además no existe una gran diferencia entre el tamaño de estas fracciones obtenido en los ensayos de persistencia, que utilizando inoculación con *Mycobacterium sp.* VM552, lo cual puede observarse en la tabla IV.6.

Una posible causa de esta elevada persistencia puede ser, que exista una limitada cantidad de microorganismos en los suelos, capaces de degradar estos compuestos.

Para poder ver esta influencia se realizaron ensayos de mineralización y biodegradación acelerada, utilizando un inóculo de la estirpe *Mycobacterium gilvum* VM552, el cual se preparó con tres densidades ópticas distintas. Estos ensayos se realizaron siguiendo el protocolo descrito en la sección III.7.3.

Las curvas de mineralización obtenidas en cada caso para fenantreno y pireno, aparecen en la figura IV.12. En la tabla IV.7 aparecen reflejados las velocidades y porcentajes máximos de mineralización. Se observa que el porcentaje final de mineralización es mayor cuanto mayor es el número de microorganismos degradadores. Lo mismo ocurre con la tasa máxima de mineralización.

En la figura IV.13, se representa la bioaccesibilidad de los HAPs nativos obtenida para las tres densidades ópticas del inóculo utilizadas. Se observa que la fracción resistente en cada caso sigue siendo significativa, y además no existe una gran diferencia entre las fracciones resistentes obtenidas para cada DO de inóculo utilizada.

Como conclusión a este apartado podríamos decir que el problema de que no se consiga disminuir la fracción resistente a biodegradación, no radica en que no exista una cantidad adecuada de microorganismos degradadores de los HAPs estudiados.

Tabla IV.6. Comparación entre las fracciones no bioaccesibles obtenidas utilizando ensayos de persistencia y las obtenidas usando inoculación con *Mycobacterium gilvum* VM552. El número identificativo de la muestra se corresponde con la tabla IV.5.

Muestra de suelo	[HAP] inicial µg/Kg	Ensayos de persistencia (µg/Kg)	Ensayos de bioaccesibilidad (µg/Kg)
FENANTRENO			
21	38,0 ± 0,01	26,0 ± 5,7	32,95 ± 1,5
22	43,5 ± 7,8	18,5 ± 2,1	21,0 ± 2,8
26	111,0 ± 0,2	115,0 ± 28,0	113,5 ± 2,3
32	46,0 ± 0,1	38,0 ± 1,4	26,2 ± 2,9
34	30,5 ± 6,4	24,0 ± 19,0	26,7 ± 5,1
35	14,0 ± 0,1	9,8 ± 1,8	16,35 ± 0,5
40	132 ± 26,0	N.D ^a	114,0 ± 15,3
42	105 ± 0,5	N.D ^a	38,5 ± 2,1
43	247,1 ± 38	N.D ^a	26,5 ± 6,4
PIRENO			
21	7,0 ± 2,8	5,9 ± 2,7	3,6 ± 0,7
22	66,0 ± 12,7	24,65 ± 0,5	25,5 ± 6,4
26	6,6 ± 0,3	5,1 ± 2,0	2,8 ± 0,6
32	13,4 ± 0,1	10,1 ± 3,7	8,1 ± 2,4
34	14,0 ± 5,0	10,5 ± 0,1	11,1 ± 1,7
35	11,3 ± 0,1	8,2 ± 2,2	10,8 ± 0,4
40	127,0 ± 9,0	N.D ^a	156,7 ± 28,4
42	108,5 ± 17,7	N.D ^a	70,0 ± 2,3
43	42,5 ± 6,2	N.D ^a	35,0 ± 1,4

^a no determinado.

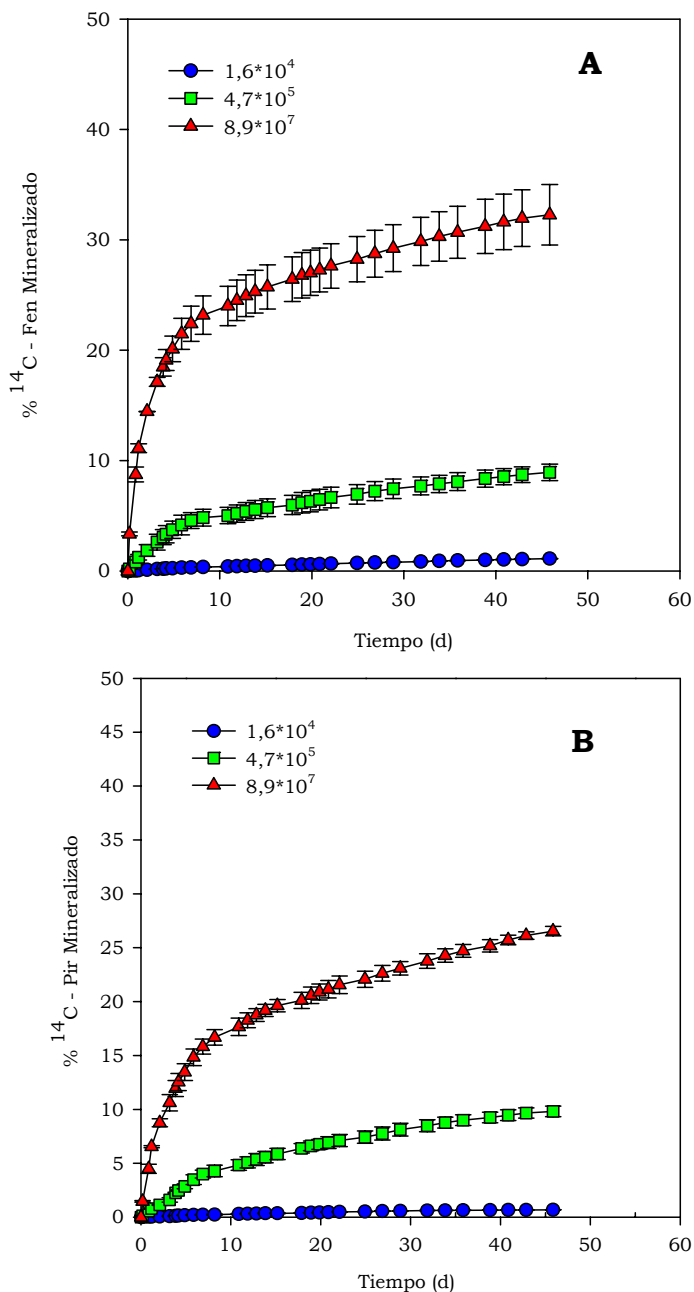


Figura IV.12. Mineralización de ^{14}C -fenantreno (A) y ^{14}C -pireno (B) para tres distintas cantidades inoculadas de *Mycobacterium gilvum* VM552 ($1,6 \cdot 10^4$, $4,7 \cdot 10^5$ y $8,9 \cdot 10^7$ CFU/g de suelo), en la muestra forestal n°22 (Monte de la Teja II).

Tabla IV.7. Datos obtenidos en la los ensayos de mineralización de ^{14}C -fenantreno y ^{14}C -pireno en presencia de distintas cantidades de *Mycobacterium gilvum* VM552, de la muestra forestal n°22 (Monte de la Teja II) del Campo de Gibraltar.

HAP	UFC /g <i>Mycobacterium gilvum</i> VM552	Tasa Máxima (% día ⁻¹)	Porcentaje final
Fen	$1,6 \times 10^4$	$0,06 \pm 0,01$	$1,12 \pm 0,02$
	$4,7 \times 10^5$	$1,10 \pm 0,20$	$8,90 \pm 0,80$
	$8,9 \times 10^7$	$9,50 \pm 0,4$	$32,30 \pm 2,70$
Pir	$1,6 \times 10^4$	$0,04 \pm 0,01$	$0,69 \pm 0,01$
	$4,7 \times 10^5$	$0,62 \pm 0,01$	$9,83 \pm 0,50$
	$8,9 \times 10^7$	$5,10 \pm 0,01$	$26,50 \pm 0,40$

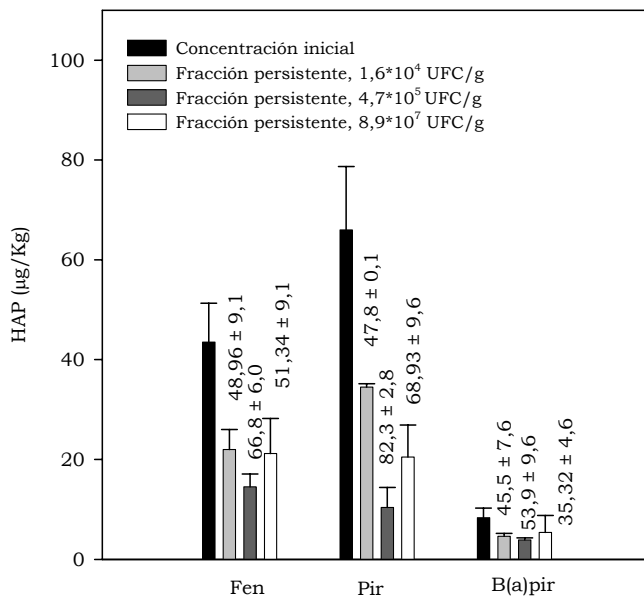


Figura IV.13. Bioaccesibilidad de los HAPs nativos para tres cantidades distintas de *Mycobacterium gilvum* VM552. Los números indican la diferencia (en porcentaje) entre concentraciones iniciales y finales.

IV.4.3 INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE HAPs INICIAL EN EL SUELO, SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD.

En la sección IV.1 se mostró que la concentración de los HAPs en los suelos que estamos estudiando puede considerarse como una concentración de fondo debida a deposición atmosférica, lo cual puede ser un factor que limite la bioaccesibilidad de los compuestos.

Por ello, en esta sección se ha estudiado la influencia de la cantidad de HAPs inicial en los suelos, sobre la bioaccesibilidad de éstos. Se realizaron ensayos con la misma muestra de suelo con la que se estudió la influencia de la cantidad de microorganismos degradadores. Previamente a los ensayos de mineralización y biodegradación se añadió a la muestra de suelo pireno hasta aumentar la concentración en el suelo en 66, 132 y 534 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, con respecto a la que ya contenía el mismo en forma nativa (66 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). La cantidad adicional añadida de ^{14}C -pireno a los suelos en los que se midió mineralización supuso un incremento de 3,1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. El compuesto se añadió al suelo previamente disuelto en acetona. Las concentraciones teóricas de pireno que se añadieron a la muestra fueron 66, 132 y 534 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. La concentración de pireno inicial total se confirmó experimentalmente mediante análisis por HPLC.

Las curvas de mineralización obtenidas en los distintos casos aparecen en la figura IV.14, y los datos correspondientes a éstas, en la tabla IV.8.

En la figura IV.15 se ha representado la bioaccesibilidad de pireno para *Mycobacterium gilvum* VM552 en la muestra forestal n° 22, tras haberle añadido a ésta tres cantidades distintas de pireno. En esta figura puede observarse que la fracción resistente a la que se llega es más o menos igual en todos los casos. Esta fracción resistente se corresponde con la concentración de pireno nativo que hay en el suelo. Estos resultados sugieren que se ha biodegradado el pireno adicional añadido al suelo pero no el que ya existía, debido probablemente a que el pireno añadido no está tan retenido en las partículas del suelo como el pireno nativo, y por ello es más bioaccesible.

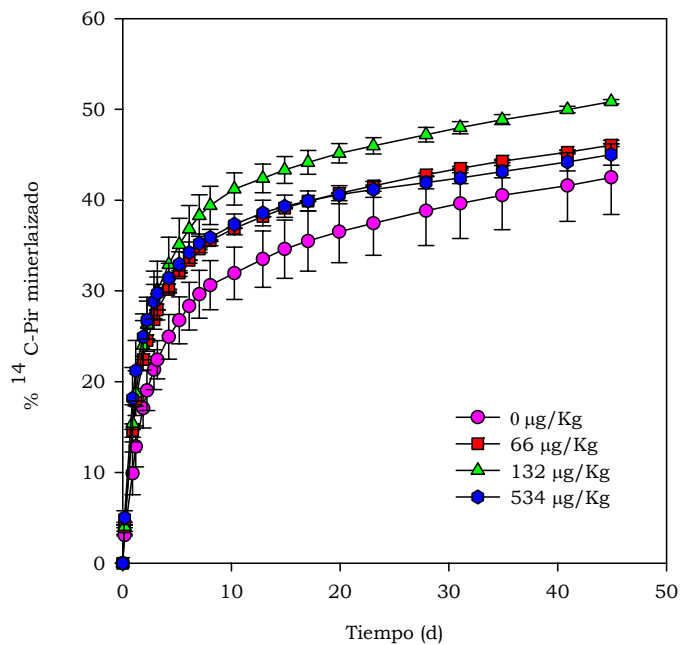


Figura IV.14. Mineralización de ^{14}C -pireno para *Mycobacterium gilvum* VM552 (3×10^7 UFC/g) en la muestra forestal n°22 (Monte de la Teja II), tras haberle añadido a ésta tres cantidades distintas de pireno.

Tabla IV.8. Datos obtenidos en las mineralizaciones representadas en la figura IV.14.

Concentración de pireno añadido ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Tasa Máxima ($\% \text{ día}^{-1}$)	Porcentaje final
0	$17,2 \pm 0,5$	$42,5 \pm 4,1$
66	$22,2 \pm ,6$	$46,1 \pm 0,2$
132	$22,5 \pm 1,6$	$50,8 \pm 0,2$
534	$27,8 \pm 4,3$	$45,0 \pm 1,2$

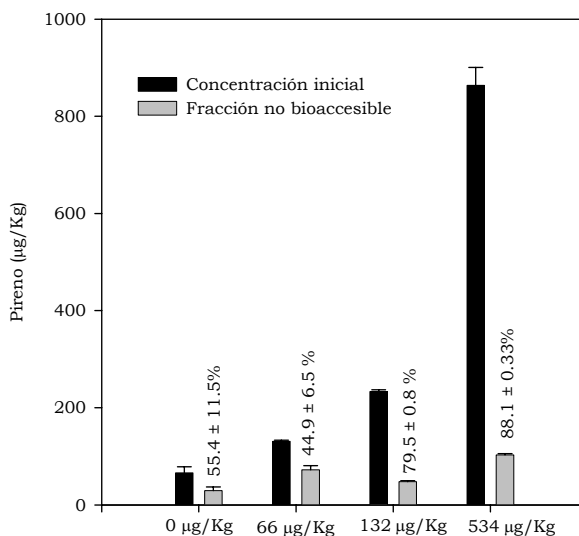


Figura IV.15. Bioaccesibilidad de pireno para *Mycobacterium gilvum* VM552 en la muestra forestal n°22, tras haberle añadido a ésta tres cantidades distintas de pireno.

Para poder explicar la influencia de la concentración inicial de HAPs en la bioaccesibilidad de éstos, se exponen a continuación resultados obtenidos con la muestra forestal n°20 (Tiradero II) del Campo de Gibraltar, a la cual se le añadió, previamente al ensayo de mineralización y biodegradación, dos concentraciones distintas de fenantreno y pireno, 100 y 500 mg/Kg, que son concentraciones bastante altas si las comparamos a las que se utilizaron para la muestra forestal n°22 (Monte de la Teja II), así como a la concentración de los compuestos nativos en ese suelo (56,6 y 212 µg/Kg de fenantreno y pireno respectivamente).

Los datos correspondientes a estos ensayos de mineralización aparecen en la figura IV.16 y en la tabla IV.9.

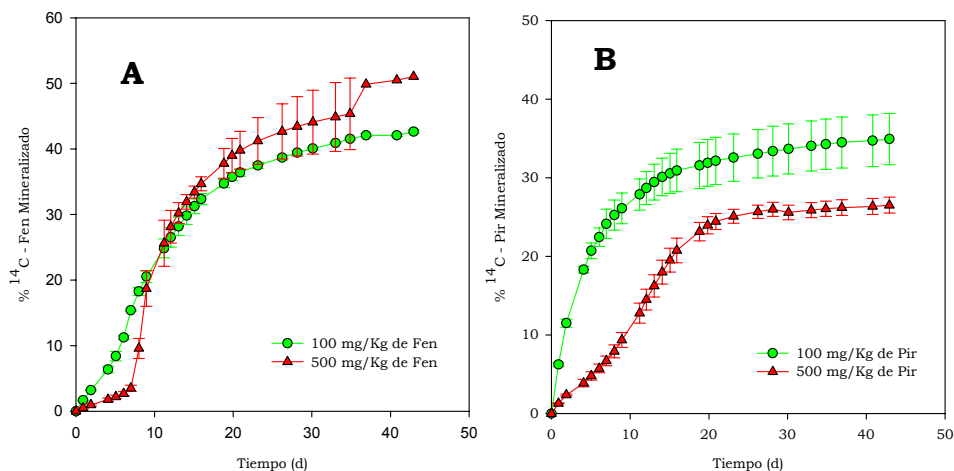


Figura IV.16. Mineralización de ^{14}C -fenantreno (A) y ^{14}C -pireno (B) para *Mycobacterium gilvum* VM552 ($1,3 \times 10^5$ UFC/g) en la muestra forestal n°20 (Tiradero II), tras haberle añadido a ésta dos cantidades distintas de fenantreno y pireno.

Tabla IV.9. Datos obtenidos en la mineralización de ^{14}C -fenantreno y ^{14}C -pireno para *Mycobacterium gilvum* VM552, de la muestra forestal n°20 (Tiradero II) del Campo de Gibraltar, tras haberle añadido a ésta dos cantidades distintas de estos compuestos.

Concentración de HAP añadido (mg/Kg)	[HAP] fracción resistente a biodegradación (mg/Kg)	Tasa Máxima (% día ⁻¹)	Porcentaje final
100 de Fen	0,3 ± 0,04	3,7 ± 0,5	42,6 ± 0,3
500 de Fen	0,7 ± 0,06	7,7 ± 1,1	51,0 ± 2,1
100 de Pir	0,02 ± 0,003	6,1 ± 0,3	34,9 ± 3,3
500 de Pir	0,09 ± 0,02	1,7 ± 0,1	26,5 ± 1,0

En la figura IV.17 se representa la bioaccesibilidad para *Mycobacterium gilvum* VM552 en la muestra forestal n°20 (Tiradero II), tras haberle añadido a ésta dos cantidades distintas de fenantreno y pireno. En esta figura puede observarse que prácticamente todo el compuesto que había inicialmente es bioaccesible ya que las fracciones resistentes a biodegradación a tiempo final del experimento son prácticamente nulas.

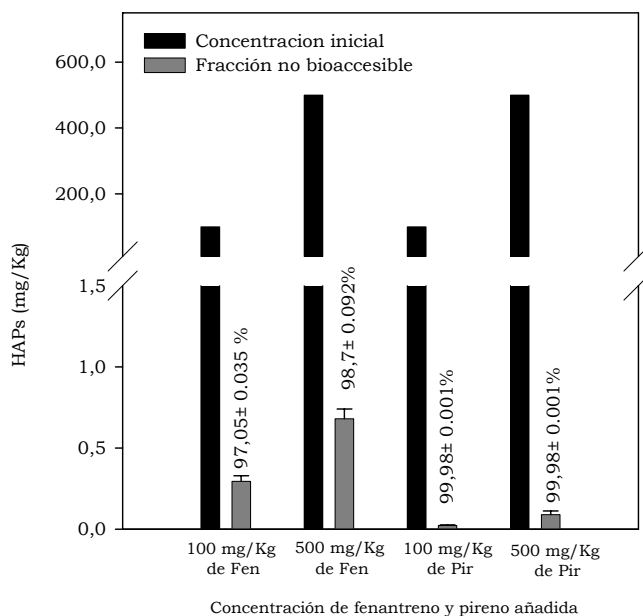


Figura IV.17. Bioaccesibilidad de fenantreno y pireno para *Mycobacterium gilvum* VM552 en la muestra forestal n°20 (Tiradero II), tras haberle añadido a ésta dos cantidades distintas de estos dos compuestos.

IV.4.4 ADSORCIÓN DE LOS HAPs A LOS SUELOS.

Las fracciones no bioaccesibles obtenidas hasta ahora pueden ser explicadas en base a una fuerte adsorción del compuesto a la matriz sólida del suelo. Por ello para poder estudiar este fenómeno de adsorción en los suelos se realizaron los ensayos que se describen a continuación.

IV.4.4.1 Determinación de los coeficientes de distribución para los suelos seleccionados.

El hidrocarburo del cual se siguió la adsorción en los suelos objeto de este estudio, fue pireno marcado con ^{14}C . Esto es debido a que el contenido de los HAPs en estos suelos es relativamente bajo, y sería muy difícil poder observar la adsorción del compuesto nativo.

Los ensayos de adsorción se realizaron siguiendo el protocolo descrito en la sección III.9.1. y los resultados obtenidos para cada suelo aparecen en la figura IV.18, en la cual se ha representado la pérdida de pireno disuelto (ng/ml) frente al tiempo (horas).

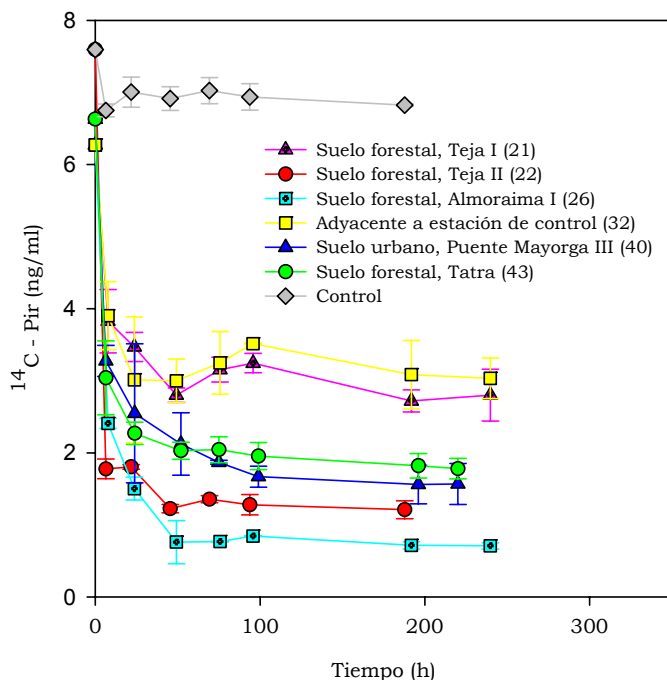


Figura IV.18. Cinéticas de adsorción de ^{14}C -pireno, para los distintos suelos de este estudio.

Para todas estas situaciones se determinó el coeficiente de distribución sólido-agua (K_d) en ml/g, utilizando la ecuación 11 (sección III.9.1). El coeficiente de reparto normalizado con el carbono orgánico, K_{oc} , se determinó en ml/g, utilizando la ecuación 3 (sección I.4.1). Mediante los experimentos correspondientes a la figura IV.18, se obtuvieron los coeficientes de distribución sólido-agua experimentales, pero según la bibliografía también se calcularon los coeficientes de distribución sólido-agua teóricos. Todos estos parámetros junto con la fracción de pireno disuelto en el agua en el equilibrio, F_w , se exponen en la tabla IV.10. En esta tabla puede observarse que cuanto mayor es el porcentaje de pérdida de pireno disuelto, mayor es la K_d , por lo que en mayor medida se ha dado el fenómeno de adsorción de pireno en el suelo.

Tabla IV.10. Datos obtenidos en las cinéticas de la figura IV.18.

Muestra	f_{oc}^a	Arcilla (%)	[pir] inicial (ng/ml)	pérdida pireno disuelto (%)	Log K_{oc}	Fw	Fs	$t_{1/2}$ (h) ^b	Log K_d Exper.	Log K_d Teórica ^c	% desv ^d
Forestal Teja I (21)	0,02	48,0	6,3	51,6	6,8	0,5	0,5	12,1 ± 1,7	3,4	3,0	60,3
Forestal Teja II (22)	0,06	5,5	7,6	84,1	5,3	0,2	0,8	9,6 ± 2,7	4,1	3,6	70,5
Forestal Almoraima I (26)	0,10	6,2	6,3	88,7	4,8	0,1	0,9	7,5 ± 0,1	4,3	3,8	68,4
Adyacente a la estación de control (32)	0,04	22,4	6,3	51,6	4,8	0,5	0,5	3,3 ± 0,8	3,4	3,4	3,3
Suelo urbano Puente Mayorga III (40)	0,04	N.D ^e	6,6	76,3	5,4	0,3	0,7	16,7 ± 5,2	3,9	3,4	72,3
Forestal, Tatra (43)	0,12	N.D ^e	6,6	73,1	4,8	0,3	0,7	10,4 ± 0,7	3,8	3,9	6,4

^a fracción de carbono orgánico en el suelo. ^b tiempo de vida media para alcanzar el equilibrio. ^c Calculada mediante la ecuación (2), donde la k_{oc} se calculó por la ecuación 3 y el valor de $k_{ow} = 5,0$ (Chiou et al., 1983). ^d % desviación de log K_d exper. respecto a log K_d teórica. ^e no determinado.

IV.4.4.2 Mineralización comparativa en varios suelos. Efecto de la capacidad de adsorción sobre la bioaccesibilidad.

Utilizando la información generada por los ensayos de adsorción del apartado IV.4.4.1, se estudió la mineralización en distintos suelos (21, 22, 26 y 32) en los cuales la cantidad de pireno marcado adsorbido inicialmente era la misma ($f_s = 0,89$). Para llevar a cabo este ensayo se procedió siguiendo el protocolo descrito en la sección III.9.4.

El ensayo se realizó en suspensión e inoculando con *Mycobacterium gilvum* VM552. Las curvas obtenidas aparecen en la figura IV.19. Los datos referentes a estos ensayos aparecen en la tabla IV.11.

En la figura IV.19 puede observarse que la mineralización se dio en diferente medida en los distintos suelos, aunque éstos tenían adsorbidos inicialmente la misma cantidad de pireno marcado. En los suelos 22 y 32, la mineralización fue muy parecida, pero estas dos son muy distintas de la de los suelos 21 y 26.

De la comparación en conjunto de las tablas IV.10 y IV.11 se deduce que estas diferencias obtenidas en la mineralización pueden deberse a algún componente del suelo, además de la materia orgánica (puesto que no se deben a la cantidad de pireno que tenían cada suelo adsorbido, porque se hizo que ésta fuese la misma en todos). Es posible que el contenido en arcilla haya jugado un papel en el proceso de adsorción.

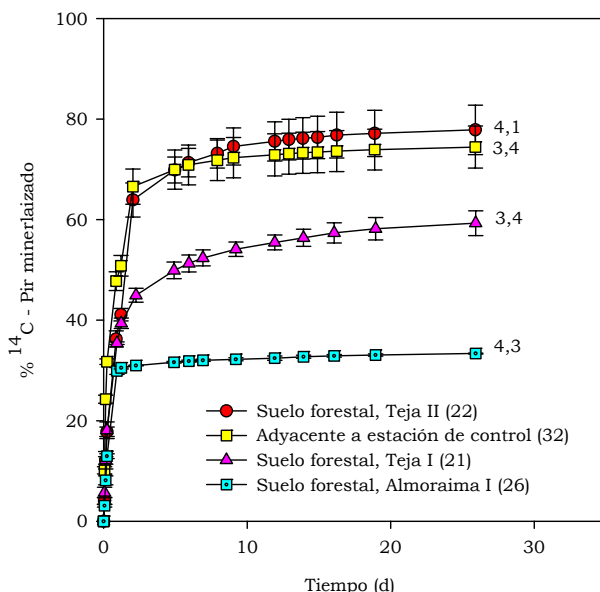


Figura IV.19. Mineralización de ^{14}C -pireno por *Mycobacterium gilvum* VM552 (1×10^6 UFC/ml) en distintos suelos. El número que aparece junto a cada gráfica corresponde a un log K_d experimental correspondiente a cada suelo.

Tabla IV.11. Datos obtenidos en la mineralización de ^{14}C -pireno por *Mycobacterium gilvum* VM552, realizada en suspensión con muestras pertenecientes al Campo de Gibraltar.

Muestra	Tasa Máxima (% día ⁻¹)	Porcentaje final
Suelo forestal, Teja I (21)	78,7 ± 7,3	59,3 ± 2,5
Suelo forestal, Teja II (22)	77,4 ± 4,0	77,8 ± 4,9
Suelo forestal, Almoraima I (26)	56,3 ± 2,0	33,4 ± 0,1
Adyacente a la estación de control de los Barrios (32)	138,0 ± 2,4	74,4 ± 4,2

Para completar este estudio sobre la influencia de la adsorción sobre la bioaccesibilidad, en la tabla IV.12 se incluyen los valores de $\log k_d$ determinados, frente a los porcentajes de pireno nativo disipados tras los ensayos de persistencia (sección IV.2.3) y bioaccesibilidad (sección IV.3.1). En base a estos datos, no es posible establecer una relación clara entre la capacidad de adsorción del suelo estimada mediante la K_d y la persistencia del compuesto nativo.

Tabla IV.12. Efecto de la capacidad de adsorción sobre el porcentaje de disipación de pireno nativo en los ensayos de persistencia y bioaccesibilidad.

Muestras de suelo	MO (%)	log K_d	Ensayos de persistencia (% disipación)	Ensayos de bioaccesibilidad (% disipación)
Forestal Teja I (21)	1,7	3,4	15,7 ± 2,4	49,0 ± 9,7
Exterior Cepsa (34)	2,0	N.D ^a	25,0 ± 2,1	20,3 ± 2,6
Cepsa I (6)	2,1	N.D ^a	N.D ^a	55,7 ± 11,0
Forestal Montseny (42)	3,3	N.D ^a	N.D ^a	34,3 ± 8,7
Puente Mayorga III (40)	3,6	3,9	N.D ^a	0,0
Adyacente a estación de control (32)	4,5	3,4	24,6 ± 3,4	40,0 ± 18,4
Prado Vazquez de la Chica (35)	4,5	N.D ^a	27,4 ± 3,6	4,4 ± 0,7
Forestal Teja II (22)	6,1	N.D ^a	62,6 ± 1,3	61,4 ± 9,6
Forestal Almoraima (26)	10,0	4,3	22,7 ± 4,2	56,8 ± 9,5
Forestal Tatra (43)	11,8	3,8	N.D ^a	17,6 ± 3,3

^a no determinado

IV.4.4.3 Adsorción de HAPs simulando en un suelo contaminación por deposición atmosférica.

En este ensayo se realizó una simulación de lo que sería contaminación en suelos por deposición atmosférica. Como ya se mencionó, las fuentes de contaminación difusa de HAPs son principalmente la combustión incompleta de la madera, del carbón, del coque para el uso doméstico, y las emisiones que provienen de la combustión incompleta del fuel en el sector del tráfico. Los HAPs liberados así a la atmósfera, son adsorbidos por las partículas en suspensión, y al ser transportados continuamente por el aire, pueden llegar a ser depositados en los suelos.

En nuestro caso lo que se hizo fue simular la deposición de HAPs, procedente del tráfico de vehículos diesel. Para ello se enriqueció la muestra de suelo forestal n° 22 (Monte de la Teja II) con un 1% (p/p) de una muestra de polvo negro aislada de varios tubos de escape de vehículos diesel (hollín diesel). El ensayo se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en la sección III.10. En la tabla IV.13 aparece el contenido en HAPs de la muestra de hollín diesel.

En la figura IV.20 se representa la distribución de los HAPs en el suelo forestal n° 22 y en este mismo suelo al cual se le añadió 1% de la muestra de hollín diesel.

Tabla IV.13. Contenido en HAPs de la muestra de hollín diesel.

HAPs	Concentración (mg/Kg) ^a
Fenantreno	19,10 ± 2,50
Antraceno	0,30 ± 0,02
Fluoranteno	3,83 ± 0,32
Pireno	3,30 ± 0,80
Benzo(a)Antraceno	1,91 ± 0,08
Criseno	4,62 ± 0,11
Benzo(b)fluoranteno	1,43 ± 0,01
Benzo(k)fluoranteno	1,04 ± 0,13
Benzo(a)pireno	1,76 ± 0,06
Dibenzo(ah)Antraceno	5,93 ± 0,01
Benzo(ghi)perileno	5,92 ± 1,80
Indeno(cd)pireno	ND ^b
ΣHPA	49,14 mg/Kg

^a desviación típica observada entre determinaciones por duplicado. ^b no detectado. LD del Indeno(cd)pireno (mg/kg peso seco): 0,42.

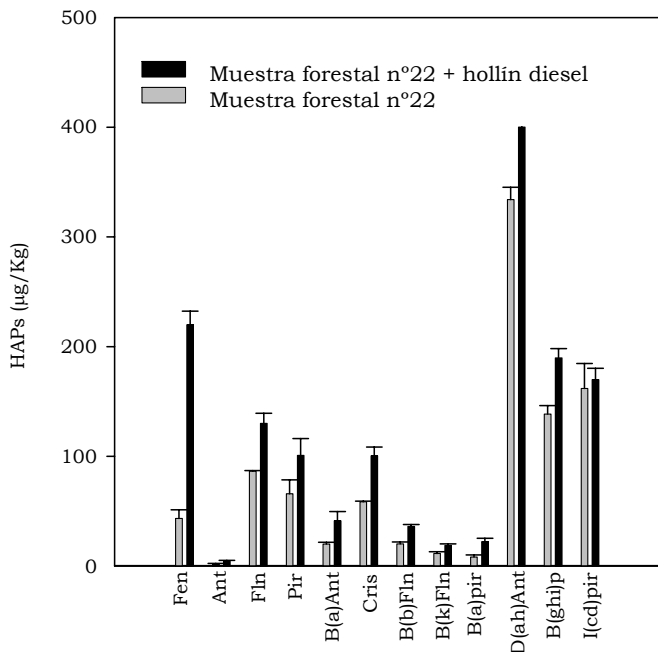


Figura IV.20. Distribución de los HAPs en el suelo forestal n° 22 y en este mismo suelo al cual se le añadió 1% de la muestra de hollín diesel.

En la muestra que se obtuvo al mezclar la n° 22 + 1% hollín diesel, la relación I(cd)pir:B(ghi)p, da como resultado 0,90. Cuando esta relación está próxima a 1, como es éste el caso, se puede decir que la principal fuente de emisión de HAPs es la combustión proveniente de los vehículos diesel (Caricchia et al., 1999).

A continuación, se realizó un ensayo de mineralización y biodegradación con *Mycobacterium gilvum* VM552, siguiendo el protocolo descrito en la sección III.7.3, y se determinó la fracción residual a tiempo final del ensayo mediante HPLC. En la figura IV.21 aparecen las curvas de mineralización de los HAPs diana.

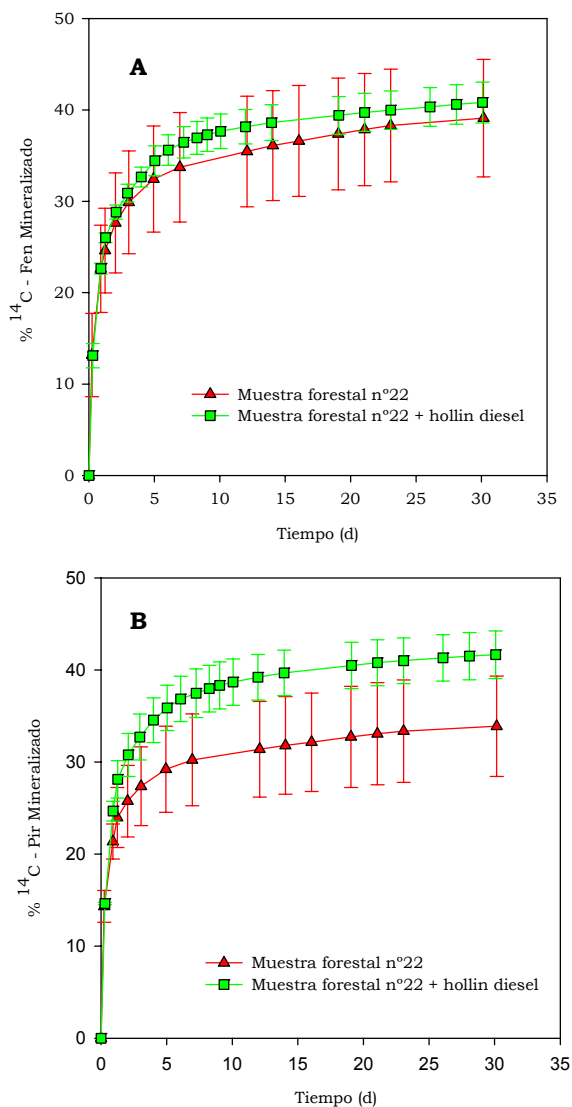


Figura IV.21. Mineralización de ^{14}C -fenantreno (A) y ^{14}C -pireno (B) por *Mycobacterium gilvum* VM552 ($1,5 \times 10^7$ UFC/g) en la muestra forestal n° 22 (Monte de la Teja II) y en la muestra resultada de la mezcla de esta misma con 1% de hollín diesel.

En la tabla IV.14 y en la figura IV.22 se representa la bioaccesibilidad de los HAPs correspondiente a estos ensayos.

Tabla IV.14. Datos obtenidos en la mineralización de ¹⁴C-fenantreno y ¹⁴C-pireno por *Mycobacterium gilvum* VM552 en la muestra forestal n° 22 y en la muestra resultante de la mezcla de esta misma con 1% de hollín diesel.

Muestra	Tasa Máxima (% día ⁻¹)	Porcentaje final
FENANTRENO		
Muestra forestal n°22	55,0 ± 8,2	39,0 ± 6,4
22 + 1% hollín diesel	45,2 ± 4,6	40,8 ± 2,2
PIRENO		
Muestra forestal n°22	59,8 ± 7,3	33,9 ± 5,4
22 + 1% hollín diesel	50,4 ± 0,5	41,7 ± 2,6

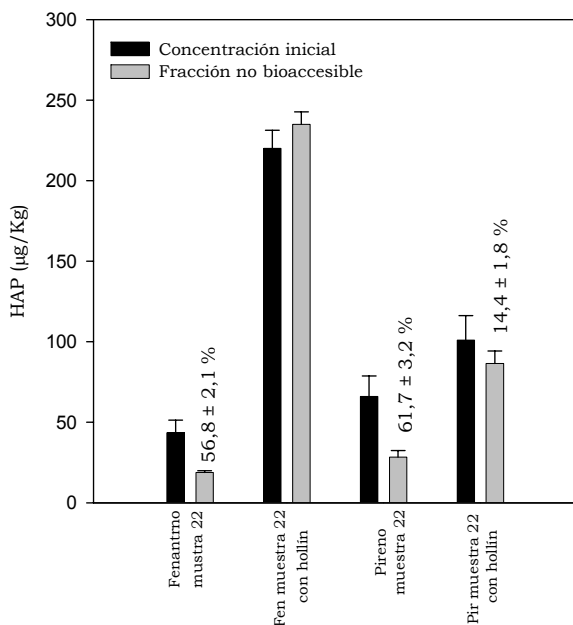


Figura IV.22. Bioaccesibilidad de los HAPs nativos por *Mycobacterium gilvum* VM552. Los números indican la diferencia (en porcentaje) entre las concentraciones iniciales y finales.

Además de estos ensayos también se llevaron a cabo ensayos de adsorción de pireno marcado con ^{14}C , para el suelo tal cual y para este mismo cuando previamente se le había añadido un 1% (p/p) de la muestra hollín diesel (figura IV.23.A). Una vez que finalizó el periodo de adsorción y ya teníamos al pireno marcado adsorbido en estos dos casos, se llevó a cabo la mineralización de éstos con *Mycobacterium gilvum* VM552 (figura IV.23.B).

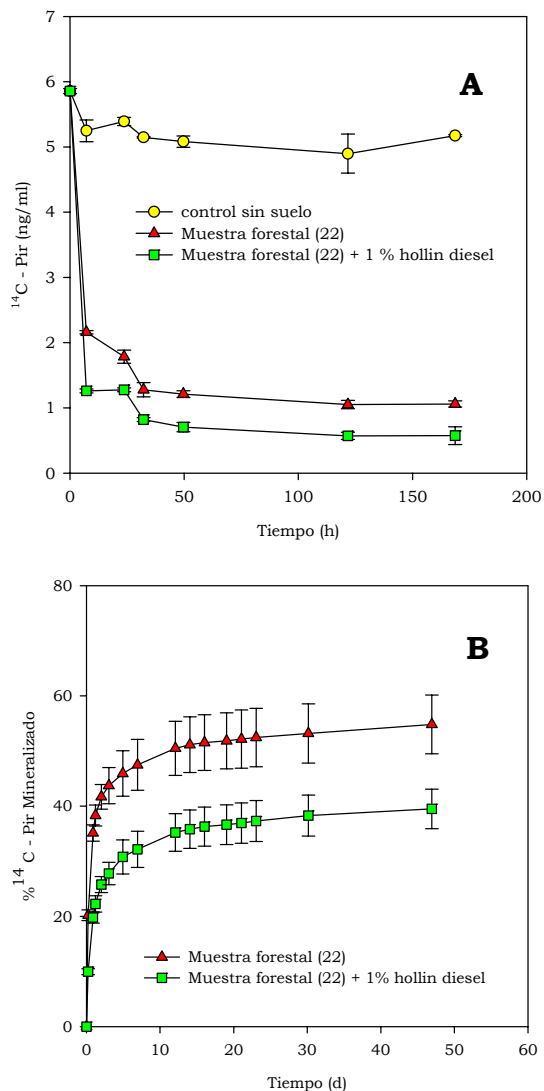


Figura IV.23. Adsorción de ^{14}C -pireno marcado (A) y posterior mineralización (B) por *Mycobacterium gilvum* VM552 (1×10^5 UFC/ml) de la muestra de suelo forestal n $^{\circ}$ 22 (Monte de la Teja II), perteneciente al Campo de Gibraltar.

En la tabla IV.15 se reflejan las constantes obtenidas en estas adsorciones. En esta tabla puede observarse que la K_d es mayor en el caso en el que se añadió hollín diesel, por lo que la adsorción de pireno se da en mayor medida en el caso del suelo que posee añadidas las partículas del hollín diesel. En cuanto al tiempo de vida media, éste es menor para el caso en el que existe hollín de diesel, ya que en este caso el compuesto se adsorbe más rápidamente y necesita menos tiempo para alcanzar el equilibrio.

Tabla IV.15. Constantes obtenidas en las adsorciones.

Muestra	Log K_d	Fw	Fs	$at_{1/2}$ (h)
Muestra forestal n°22	4,05	0,18	0,82	8,40 ± 2,90
Muestra forestal n°22 + 1% hollín diesel	4,36	0,09	0,90	7,93 ± 0,44

^a tiempo de vida media para alcanzar el equilibrio.

En la tabla IV.16 se reflejan los datos obtenidos en la mineralización realizada tras el ensayo de adsorción. En esta tabla se observa que tanto el porcentaje final como la tasa máxima de mineralización es mayor en el caso en el que no se añadió hollín diesel.

Tabla IV.16. Datos obtenidos en la mineralización de ^{14}C -pireno por *Mycobacterium gilvum* VM552.

Muestra	Tasa Máxima (% día)	Porcentaje final
Control sin suelo	122,3 ± 10,5	43,6 ± 5,3
Muestra forestal n°22	89,9 ± 4,2	54,8 ± 5,3
Muestra forestal n°22 +1% hollín diesel	43,3 ± 2,3	39,5 ± 3,6

IV.4.5 EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE HAPs.

Cuando los compuestos orgánicos son adsorbidos, pueden penetrar en el interior de los agregados del suelo a lo largo del tiempo haciendo que el sustrato esté menos disponible para los microorganismos, y ésto es a lo que se le llama envejecimiento. Este hecho podría ser una de las causas de la alta persistencia de los compuestos que estamos observando en los suelos estudiados en este trabajo.

Este efecto se estudió en dos de las muestras seleccionadas del Campo de Gibraltar, concretamente la muestra forestal Monte de la Teja II (n° 22) y en la muestra adyacente a una unidad móvil de captación atmosférica Puente Mayorga III (n° 40), y en dos de las muestras forestales pertenecientes a las altas montañas, concretamente la muestra n° 41 (Pirineos) y la n° 42 (Montseny). Los ensayos de envejecimiento (de 74 a 144 días, según el caso) se llevaron a cabo tal como se indica en la sección III.8. Las curvas de mineralización correspondientes a los suelos con el pireno envejecido y el no envejecido, aparecen reflejadas en la figura IV.24. Los datos obtenidos en estas curvas aparecen en la tabla IV.17, en la cual puede observarse una clara influencia del periodo de envejecimiento sobre la mineralización. Las tasas máximas de mineralización son menores cuanto mayor es el tiempo de residencia del compuesto en el suelo. También se observó el efecto del envejecimiento sobre el porcentaje final de la mineralización, siendo éste menor cuanto mayor es el periodo de envejecimiento.

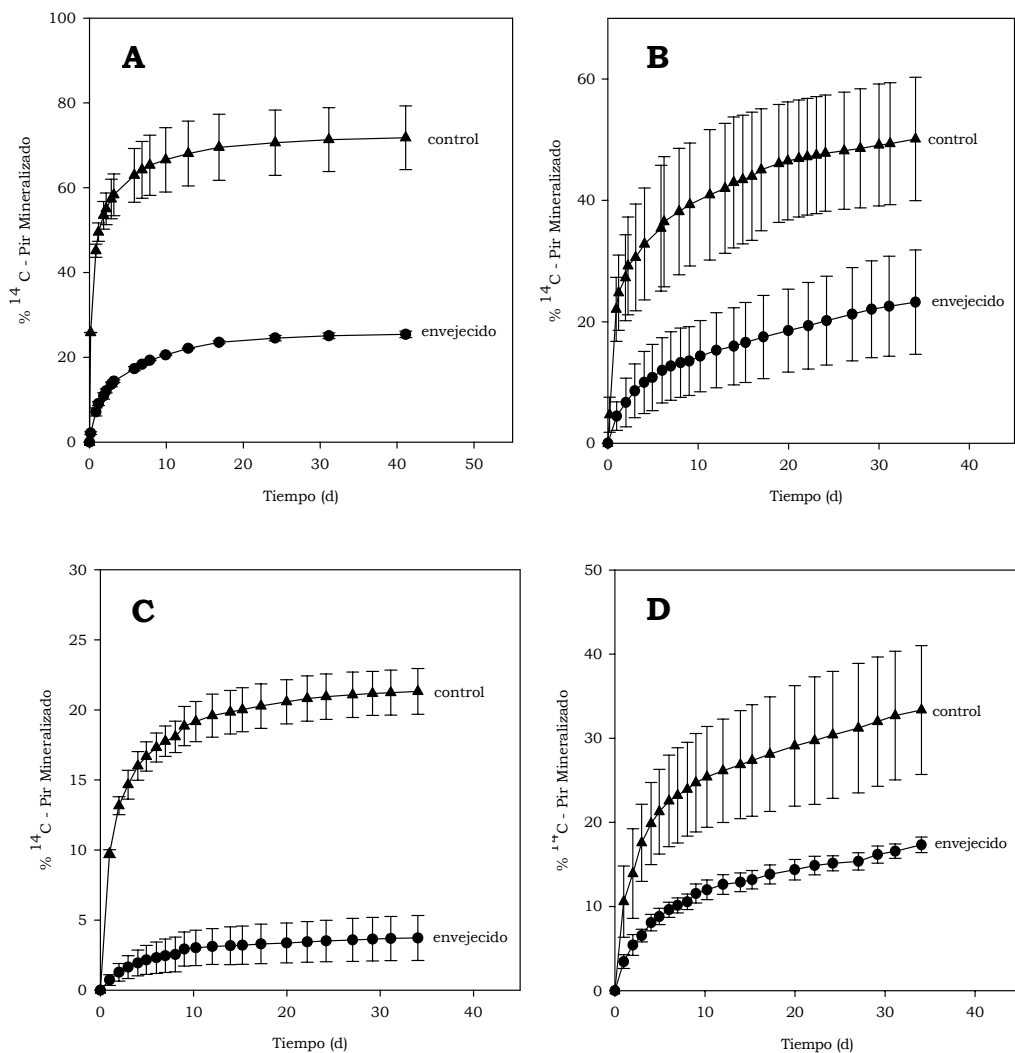


Figura IV.24. Mineralización de ^{14}C -pireno envejecido (círculos) y no envejecido (triángulos) por *Mycobacterium gilvum* VM552 (1×10^7 UFC)/g, de las muestras: n°22 Monte de la teja II (figura A), n°40 Puente Mayorga III (figura B), n°41 Pirineos (figura C) y n°42 Montseny (figura D).

Tabla IV.17. Datos obtenidos en la mineralización de ^{14}C -pireno envejecido y no envejecido por *Mycobacterium gilvum* VM552, en cuatro de las muestras estudiadas en este trabajo.

Muestra de suelo	Pireno	Periodo de envejecimiento	Tasa Máxima (% día⁻¹)	Porcentaje final
Suelo forestal Teja II (22)	no envejecido	0 días	161,5 ± 0,2	71,8 ± 7,5
	envejecido	74,1 días	13,3 ± 0,1	25,4 ± 0,8
Suelo urbano Puente Mayorga III (40)	no envejecido	0 días	23,4 ± 6,1	50,1 ± 10,2
	envejecido	100 días	3,9 ± 1,1	21,7 ± 10,7
Suelo forestal Pirineos (41)	no envejecido	0 días	6,6 ± 0,3	21,4 ± 1,6
	envejecido	144,2 días	0,8 ± 0,1	3,7 ± 1,6
Suelo forestal Montseny (42)	no envejecido	0 días	8,1 ± 1,2	33,4 ± 7,6
	envejecido	144,2 días	3,6 ± 0,2	17,3 ± 0,9

IV.4.5.1 Influencia del envejecimiento en la adsorción.

Este ensayo se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección III.9.3. El objetivo en este caso es poder estudiar cómo es la cinética de adsorción durante el periodo de envejecimiento, y excluir la posibilidad de artefactos en el ensayo de bioaccesibilidad causados por pérdidas del compuesto durante el envejecimiento.

Las cinéticas de adsorción del suelo con el compuesto envejecido y del suelo con el mismo compuesto no envejecido, aparecen en la figura IV.25.

Una vez que dimos por finalizado el periodo de adsorción se llevó a cabo la mineralización por *Mycobacterium gilvum* VM552. Los datos de este ensayo se reflejan en la tabla IV.18.

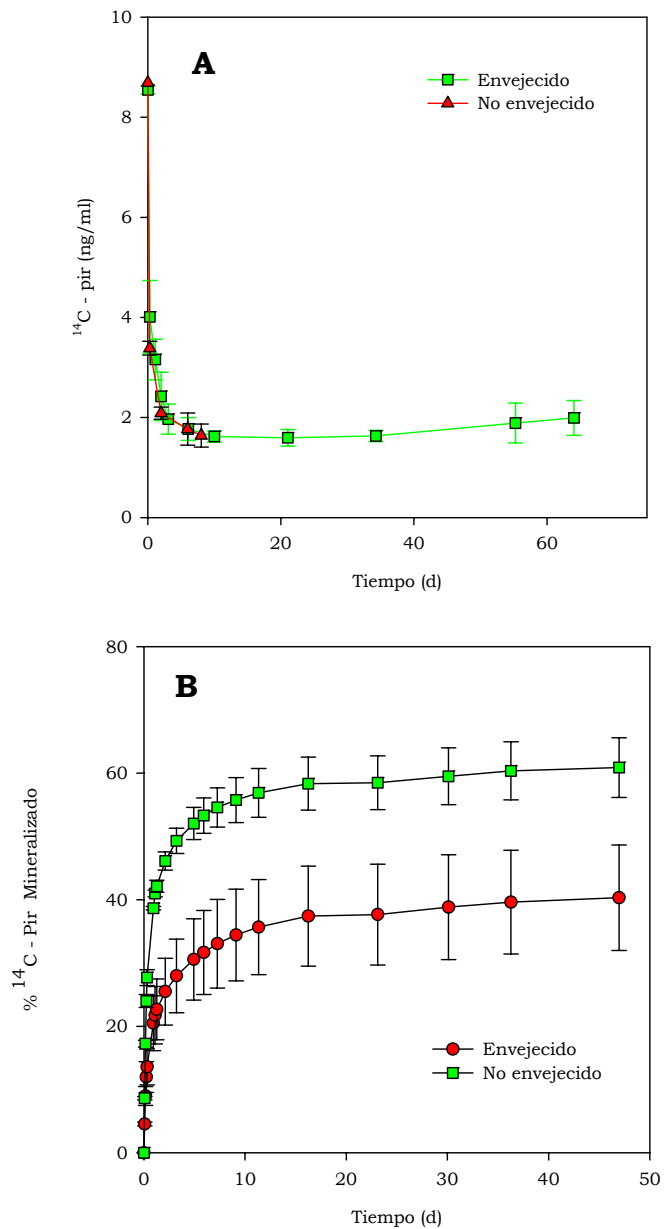


Figura IV.25. Adsorción de ^{14}C -pireno envejecido y no envejecido (A), y posterior mineralización (B) por *Mycobacterium gilvum* VM552 (1×10^5 UFC/ml) de la muestra de suelo forestal n° 22 (Monte de la Teja II), perteneciente al Campo de Gibraltar.

Tabla IV.18. Datos obtenidos en la mineralización de ^{14}C -pireno envejecido y no envejecido por *Mycobacterium gilvum* VM552, en la muestra de suelo forestal n° 22, perteneciente al Monte de la Teja en el Campo de Gibraltar.

Muestra	Tasa Máxima (% día)	Porcentaje final	^at_{1/2} (h)
Envejecida	50,7 ± 5,8	40,3 ± 8,3	19,0 ± 0,4
No envejecida	96,0 ± 3,9	60,9 ± 4,7	11,1 ± 4,2

^a tiempo de vida media para alcanzar el equilibrio.

En esta tabla puede observarse que tanto el porcentaje final como la tasa máxima de mineralización son mayores cuanto menor es el tiempo de residencia del compuesto que estamos estudiando en el suelo.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN



V.1 CONTENIDO EN HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN LOS SUELOS ESTUDIADOS.

Son muchas las publicaciones que existen sobre la distribución espacial en suelos de HAPs que han sido depositados desde la atmósfera (Jones et al., 1994; Jones et al., 1998; Maliszewska-Mordybach, 2000). De forma general todas éstas coinciden en que la concentración de HAPs depositados en los suelos, depende de la proximidad del suelo al punto de la propia fuente de emisión de estos contaminantes. De esta forma, la concentración es más alta cuanto más cerca esté el suelo de la fuente de emisión; así los suelos urbanos poseen más cantidad de HAPs que los suelos rurales.

En nuestro caso, de todas las muestras analizadas dentro del Campo de Gibraltar, las dos que poseen una mayor concentración de HAPs son, la n° 1 y la n° 6. La muestra n° 1 está próxima a un vertedero de la empresa Interquisa, y la n° 6 pertenece al interior de la refinería de Cepsa. La alta concentración en estas muestras con respecto a todas las demás analizadas en el Campo de Gibraltar se debe probablemente a la cercanía de éstas a los emplazamientos industriales citados.

Los HAPs originados por combustión y que se incorporan a los suelos por deposición atmosférica, se encuentran en los primeros centímetros de la capa superficial del suelo, pudiéndose extender a unos 25 cm, que es lo que se conoce como capa arable del suelo (Jones et al., 1989). Nosotros recogimos muestras de suelo a dos niveles distintos de profundidad, con el objetivo de poder estudiar esta influencia. El resultado en nuestro caso, fue que en todos los puntos donde se pudo estudiar la influencia de la profundidad, se encontró mayor concentración de estos compuestos en la capa arable del suelo (0-25 cm), existiendo así concordancia con los datos publicados. Sólo en uno de los casos no se cumplió esta regla, en la muestra n° 4 (Petroquímica II), donde se encontró una mayor concentración de HAPs en la capa más profunda. No podemos dar una clara explicación para esta excepción.

A la hora de estudiar esta distribución de HAPs hay que tener en cuenta también las propiedades de los suelos. En el estudio realizado por Wild y Jones se llegó a detectar incluso mayor concentración en suelos forestales, que en suelos urbanos (Wild y Jones, 1995). Los autores dedujeron así que la concentración de HAPs en los suelos estaba correlacionada positivamente con la cantidad de materia orgánica en éstos, de forma que generalmente los suelos forestales tienden a poseer una concentración de HAPs mayor que la de los suelos rurales.

Atendiendo a nuestros resultados, en las muestras forestales de la parcela de Tiradero, del Monte de la Teja y del Monte Almoraima (19, 20, 21, 22, 26, 28 y 29), se observó que a pesar de estar distantes de los núcleos urbanos e industriales, existían cantidades detectables de HAPs. Esto se debe a que por tratarse de suelos forestales, poseen un alto contenido en materia orgánica, lo

que hace que acumulen más a los HAPs provenientes de deposición atmosférica. Los HAPs, por su carácter hidrofóbico se adsorben principalmente a este componente del suelo, haciendo que estos contaminantes sean más persistentes y su degradación sea más lenta.

De todas las muestras analizadas en el Campo de Gibraltar, se ha obtenido como resultado una media de 282,7 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Si comparamos este valor con datos publicados, puede considerarse como una contaminación de fondo. Wild y Jones, determinaron que en los suelos ingleses, de los cuales el 10% eran suelos urbanos, y el 80% suelos rurales, la concentración obtenida para los suelos rurales concretamente correspondía a 187,2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Esta contaminación por HAPs era por deposición atmosférica, ya que en el Reino Unido la mayor parte de los HAPs incorporados a la atmósfera lo hacían por el tráfico y por la combustión del carbón en el uso doméstico (Wild y Jones, 1995).

Este valor obtenido como media en el Campo de Gibraltar, también está en concordancia con otros datos publicados en suelos europeos sobre HAPs. Por ejemplo, el contenido medio de HAPs obtenido en suelos rurales de Polonia es de 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Maliszewska-Mordybach, 2000). En esta publicación también se estudió la distribución espacial de los HAPs en toda Polonia y el resultado fue que este contenido total de HAPs era mayor en suelos cercanos a zonas industrializadas que en suelos rurales. Además, compararon dos tipos de suelos rurales, detectando un mayor contenido de HAPs en aquellos suelos rurales que poseían un mayor contenido en materia orgánica.

En la figura IV.4 puede observarse que en la mayoría de las muestras, el índice diagnóstico indica la combustión como la causa de la contaminación por HAPs en los suelos seleccionados. Este resultado es esperable debido a que como es sabido, las fuentes de contaminación difusa de HAPs, son principalmente la combustión incompleta de la madera, del carbón, del coke para el uso doméstico, y las emisiones que provienen de la combustión incompleta del fuel en el sector del tráfico. Además en la zona del Campo de Gibraltar existe una gran actividad industrial y urbana, lo que supone una fuente potencial de contaminación por HAPs a la atmósfera, que puede ser transferidos en parte a los suelos de la zona.

V.2 ENSAYOS DE PERSISTENCIA DE HAPs.

Cuando se llevan a cabo estudios de persistencia de HAPs en suelos, es conveniente estudiar el número de células viables degradadores de los HAPs. En nuestros suelos se determinó el número de células degradadoras de fenantreno y el resultado obtenido se reflejó en la tabla IV.1. La cantidad de células degradadoras de fenantreno por gramo de suelo obtenida para la mayoría de los suelos estudiados, son similares a las obtenidas en otros

estudios para suelos que poseen niveles de HAPs similares a los de nuestras muestras (10^6 a 10^8 UFCg⁻¹)(Johnsen y Karlson, 2005).

Nosotros no cuantificamos la cantidad de células degradadoras de pireno en los suelos, pero existen datos publicados en los cuales sólo se detectaron degradadoras de pireno en suelos donde el nivel de contaminación era muy alto (Johnsen y Karlson, 2005). Por lo que podríamos decir que en nuestros suelos probablemente la cantidad de células degradadoras de pireno sea muy baja comparada con las degradadoras de fenantreno.

El potencial de degradación de los HAPs por microorganismos autóctonos, ha sido investigado en numerosos estudios como una medida de la atenuación natural en suelos altamente contaminados por HAPs (Carmichael y Pfaender, 1997; Grosser et al., 1991). Existen estudios posteriores donde se estudia este potencial de degradación pero en suelos con niveles de fondo de HAPs, es decir, en suelos que poseen niveles de HAPs parecidos a los nuestros (Johnsen y Karlson, 2005).

La mineralización de los HAPs diana de estos ensayos se reflejó en la figura IV.5 y en ella pudo observarse que se mineralizó primero significativamente el fenantreno y en mucha menor proporción, tras una fase de aclimatación de unos diez días, fue mineralizado el pireno. La mineralización ocurre de forma secuencial según aumenta el peso molecular del compuesto, es decir, se mineraliza primero el fenantreno que posee tres anillos bencénicos, y después el pireno que posee cuatro anillos. Además las tasas máximas y los porcentajes finales de mineralización son mayores en el caso del fenantreno. También hay que destacar que la fase de aclimatación que aparece en el pireno no se observa en el caso del fenantreno. Este resultado en la mineralización está de acuerdo con estudios previos sobre la degradación de HAPs en el medioambiente, donde se encontraron que las tasas máximas de degradación estaban inversamente relacionadas con el número de anillos fusionados de benzeno (Cerniglia y Heitkamp, 1987).

Por otro lado, las diferencias observadas entre la mineralización del fenantreno y del pireno por microorganismos autóctonos, se debe, además de que probablemente en ese suelo haya más microorganismos degradadores de fenantreno que de pireno, a que el log K_{ow} del pireno es más alto que el del fenantreno. Así una larga fracción de pireno esta expuesta a adsorberse por la materia orgánica del suelo. Una alta adsorción y una baja difusión limita el flujo de pireno hacia las células degradadoras, y da lugar a unas tasas máximas de mineralización más bajas (Miller et al., 1985).

En la figura IV.6 puede observarse que existe un porcentaje significativo de fenantreno y pireno nativo que desapareció espontáneamente. En el caso de pireno, y en algunos casos con fenantreno, esta desaparición no se vio acompañada por una liberación significativa de $^{14}\text{CO}_2$ en los ensayos de respirometría. Ello es explicable por tanto a pérdidas de los compuestos atribuibles a procesos abióticos, principalmente volatilización. Dado que los matraces no estaban ocultos a la luz ambiental para simular en mayor

medida el proceso natural, los procesos de fotodegradación no son tampoco excluibles.

V.3 ESTIMACIÓN DE LA BIOACCESIBILIDAD DE HAPs EN LOS SUELOS SELECCIONADOS.

Para poder estudiar la bioaccesibilidad de los HAPs en los suelos, se determinó la persistencia de estos compuestos mediante el estudio de las cinéticas de biodegradación.

Para tener una idea inicial de esta persistencia se realizó un primer ensayo con un sólo suelo, concretamente con la muestra forestal nº 22 del Campo de Gibraltar, y se estudio la mineralización y la cinética de desaparición mediante la inoculación de un número suficiente de microorganismos. Los resultados indican que los HAPs ligeros llegan a ser degradados en su mayor parte, durante un periodo inicial de menos de cinco días. Fenantreno, fluoranteno y pireno son degradados por *Mycobacterium gilvum* VM552, ya que como se mencionó anteriormente, estos tres son utilizados por esta estirpe como fuente de carbono y energía durante su crecimiento. En el caso del antraceno, benzo(a)antraceno, criseno y benzo(b)fluoranteno, a pesar de no ser sustratos conocidos por *Mycobacterium gilvum* VM552, también fueron degradados. McLellan et al., demostraron que la estirpe RJGII-135, perteneciente al género *Mycobacterium*, era capaz de degradar mediante cometabolismo un amplio rango de HAPs entre ellos fenantreno, antraceno, pireno, benzo(a)antraceno y benzo(a)pireno (McLellan et al., 2002). Una situación semejante podría ocurrir en nuestro caso. En el caso de los HAPs más pesados presentes en este suelo, no mostraron variaciones significativas tras el ensayo.

Con los resultados obtenidos en este primer ensayo se dedujo que los HAPs estudiados eran persistentes a la biodegradación, a pesar de haber usado un número considerable de microorganismos degradadores.

El siguiente paso fue estimar la bioaccesibilidad de los HAPs, pero con los demás suelos seleccionados y utilizando población microbiana preacondicionada, para comprobar si se conseguía disminuir las fracciones resistentes obtenidas en los ensayos de persistencia. El resultado de las mineralizaciones por inoculación en todos los suelos se reflejaron en la figura IV.10. En esta figura se observó que al inocular con un gran número de microorganismos degradadores, desaparece la fase de aclimatación con pireno, degradándose de forma significativa.

Si comparamos los resultados de los ensayos de bioaccesibilidad en todas las muestras pertenecientes al Campo de Gibraltar, puede decirse que la muestra en la que, tanto la tasa máxima como el porcentaje final de mineralización es menor, es en la nº 26 (Monte Almoraima I), tanto para el caso del fenantreno como para el del pireno. Además para esta muestra, a tiempo final del experimento de biodegradación no se degradó nada de fenantreno nativo, lo

que puede observarse también en la figura IV.11. La explicación de este resultado se haría en base a que esta muestra es la que posee un mayor contenido en materia orgánica de todas las seleccionadas en el Campo de Gibraltar, además de que el fenantreno es altamente hidrofóbico, por lo que sus propiedades causan una rápida asociación entre éste y la superficie sólida del suelo. Este resultado concuerda con otros observados por Ortega-Calvo et al., donde se compararon la mineralización de fenantreno en varios suelos en los que el contenido en materia orgánica era distinto, y se obtuvo que cuanto mayor era el contenido en materia orgánica, menor era la tasa máxima y el porcentaje final de mineralización. En este estudio los resultados obtenidos se explicaron en base a que con el aumento de la materia orgánica, disminuye la concentración de fenantreno disuelto en la fase acuosa del suelo, por lo que disminuye la tasa máxima de mineralización (Chiou, 1989; Ortega-Calvo et al., 1997).

En base a esto, para esta muestra la degradación de pireno debería haber resultado como la de fenantreno. Sin embargo, el pireno en esta muestra se degradó un 56,8 %. La única explicación que podemos dar para este resultado, es que la estirpe utilizada en este tipo de ensayos, fue previamente precultivada durante varias semanas con pireno, y podría ser que al estar acostumbrada a utilizar a éste como fuente de energía durante su crecimiento, haya degradado en mayor medida este compuesto en el suelo.

Como resultado al estudio de la bioaccesibilidad de los HAPs diana mediante la utilización de poblaciones microbianas preacondicionadas, podríamos decir que al inocular con un gran número de microorganismos degradadores siguen existiendo limitaciones en la bioaccesibilidad, es decir, que se obtienen resultados similares a cuando se usaron poblaciones microbianas autóctonas.

V.4 ESTUDIO DE LOS POSIBLES FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN LA BIOACCESIBILIDAD DE HAPs EN LOS SUELOS.

V.4.1 INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES EN LA BIOACCESIBILIDAD.

Una posible causa de que exista una fracción resistente a biodegradación en los suelos que estamos estudiando, podría ser que el número de microorganismos degradadores no sea suficiente como para degradar totalmente a estos compuestos.

Para estimar este efecto se estudió la mineralización y disipación de HAPs en un suelo utilizando tres distintas cantidades de microorganismos degradadores (*Mycobacterium gilvum* VM552). Los resultados de la figura IV.12 y IV.13 y de la tabla IV.7, sugieren que ni aún usando un número muy

elevado de microorganismos degradadores, se consiguió disminuir las fracciones resistentes a biodegradación de fenantreno y pireno.

Resultados equiparables a los obtenidos han sido encontrados en otros trabajos. Heitkamp y Cerniglia encontraron que doblando el tamaño del inóculo de las degradadoras de pireno *Mycobacterium gilvum*, incrementaba la degradación de pireno sólo y ligeramente en uno de los sedimentos acuáticos estudiados (Heitkamp y Cerniglia, 1989). Estos resultados fueron explicados en base a que cuando se usa la inoculación se da una competición de nutrientes entre las células introducidas y las indígenas en los suelos, aunque la supervivencia bacteriana en los suelos es difícil de medir.

En nuestros ensayos el número de células añadidas por gramo de suelo (10^6 a 10^8) fue similar a los utilizados en otros estudios, como por ejemplo el realizado por Grosser et al., donde detectaron cómo el número de células añadidas afectaba al nivel de mineralización de carbazol, pero no afectaba al del pireno (Grosser et al., 1991).

En nuestro caso no se encontró una relación entre el número de células degradadoras utilizadas y la fracción no bioaccesible obtenida en los suelos tras el ensayo de mineralización y biodegradación. Son otros los estudios en los que se ha obtenido, que el número de población microbiana y los niveles de actividad no son necesariamente indicadores del potencial para la degradación de las moléculas recalcitrantes. Por ejemplo, Herbes y Schwall encontraron que en determinados sedimentos la transformación del antraceno no estaba relacionada con la actividad microbiana y la biomasa de éstos (Herbes y Schwall, 1978).

De forma resumida con nuestros resultados podemos decir que, la persistencia de los HAPs en los suelos estudiados no es consecuencia de la falta de degradadores microbianos de HAPs, sino que más bien es consecuencia de la baja bioaccesibilidad de éstos.

V.4.2 INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE HAPs INICIAL EN EL SUELO.

En este apartado se estudió cómo podía influir en la bioaccesibilidad de los HAPs, el que en los suelos la concentración de estos compuestos inicialmente fuese muy baja. Para ello se determinó la mineralización de pireno por *Mycobacterium gilvum* VM552 en la muestra nº22 (Monte de la Teja II), tras haberle añadido a ésta tres cantidades distintas de pireno (figura IV.14). Los resultados mostraron claramente que el compuesto añadido a concentraciones comparables era mucho más accesible que el nativo, no existiendo prácticamente diferencias en cuanto a las concentraciones residuales. Se concluye por tanto que la contribución del pireno añadido a la fracción resistente fue mínima, siendo degradado en su totalidad.

Se realizó otro ensayo en el cual se aumentó la concentración de pireno y fenantreno 100 veces más de las que se usaron en el ensayo correspondiente a la figura IV.14. La muestra utilizada en este caso fue la muestra forestal

n°20 (Tiradero II) , la cual pertenecía también al Campo de Gibraltar y tenía unas características muy similares a las de la muestra utilizada anteriormente (n° 22, Monte de la Teja II), en cuanto a que se trataba también de una muestra forestal y ambas tenían prácticamente la misma cantidad de materia orgánica. Los resultados de la mineralización y la bioaccesibilidad de fenantreno y pireno en este caso, se reflejaron en la figura IV.16 y IV.17 respectivamente. En la figura IV.17 puede observarse que cuando las concentraciones de los compuestos diana eran del rango de unos 100 a 500 mg/kg de suelo, estos HAPs eran casi totalmente biodegradados por *Mycobacterium gilvum* VM552.

En el 2005, Johnsen y Karlson encontraron una relación lineal inversa entre el nivel de contaminación de HAPs en el suelo y el tiempo necesario para llegar al 10% de la mineralización, es decir, que cuanto mayor era el contenido de HAPs en el suelo, menor era el tiempo necesario para alcanzar el 10% de mineralización. En esta relación se encontró que el R^2 obtenido para el pireno era mayor que para el fenantreno, por lo que el potencial de degradación del pireno era más dependiente con la concentración de HAPs. Estos autores encontraron una relación entre la concentración de HAPs en el suelo y el número de degradadores de fenantreno y pireno. Además explicaron que los resultados obtenidos podían deberse a que cuando la concentración de HAPs en los suelos aumenta, aumentan las tasas máximas de degradación debido al crecimiento de la población degradadora de HAP y debido a la inducción de las enzimas degradadoras de HAPs (Johnsen y Karlson, 2005). Aunque los degradadores de HAPs pueden *in situ* utilizar otras fuentes de carbono que no sean HAPs (por ejemplo, *Mycobacterium* puede también utilizar hidrocarburos alifáticos para crecer), y por consiguiente no debería ser esperada una directa correlación entre la concentración total de HAPs, o incluso el contenido bioaccesible de HAPs de los suelos, y el número de degradadores de HAPs.

Podemos comparar nuestros resultados de biodegradación por *Mycobacterium gilvum* VM552 de HAPs, con otros referentes a un estudio realizado por Bueno-Montes en 2005 de la misma biodegradación pero en un suelo donde la contaminación por HAPs no se debe a contaminación atmosférica, sino que este suelo había sido contaminado con creosota. En este suelo, la concentración total de HAPs era 4540,8 mg/Kg y el porcentaje biodegradado de fenantreno y pireno fue 99,3 y 95,5 respectivamente (Bueno-Montes, 2005). No obstante los niveles residuales tras biorremediación eran todavía significativos (del orden de mg/kg). Estos niveles pudieron reducirse al utilizar tensioactivos no tóxicos, que favorecían la desorción de estas fracciones resistentes.

V.4.3 ADSORCIÓN DE PIRENO A LOS SUELOS

V.4.3.1 Coeficientes de distribución.

En los ensayos en los que se realizó la adsorción de pireno a los suelos seleccionados, el objetivo fue determinar el coeficiente de distribución sólido-agua. Los resultados de este coeficiente para todos los suelos estudiados aparecen en la tabla IV.10. Este coeficiente determinado por nosotros experimentalmente mediante el método batch, puede compararse con el coeficiente de distribución sólido-agua teórico, calculado a partir del contenido en carbono orgánico utilizando datos bibliográficos. Esta K_d teórica también aparece en la tabla IV.10. En esta tabla puede observarse que para la mayoría de los suelos el valor del coeficiente de distribución sólido-agua calculado experimentalmente en nuestros ensayos, es mayor que el valor teórico.

Para determinar la K_d teórica se utilizó la siguiente ecuación:

$$K_d = f_{oc} * K_{oc} \quad (2)$$

En esta ecuación se relaciona la materia orgánica natural del suelo con el coeficiente de distribución sólido-agua, ya que estudios realizados desde 1970 indicaban que la materia orgánica de los suelos es el principal factor que controla la adsorción de los HAPs (Chiou et al., 1979).

En estudios posteriores se llegó a la conclusión de que la materia orgánica del suelo es bastante compleja, y para explicar la afinidad de ésta por los HAPs se describió el denominado “doble modelo” conceptual, del cual se habla detalladamente en el apartado I.4. Según este modelo la materia orgánica de los suelos está dividida en dos tipos, por un lado la materia orgánica amorfa y por otro la cristalina. De esta forma la adsorción de los HAPs en el suelo ocurre de manera que, por un lado se da una absorción lineal y una rápida desorción en el dominio amorfo, y por otro lado, una alta adsorción no lineal y lenta desorción en el dominio cristalino. Además es en este dominio cristalino de la materia orgánica del suelo, donde se encuentra el ya conocido como carbono negro.

Teniendo en cuenta este doble modelo conceptual de la materia orgánica, la ecuación (2) se ha sustituido en publicaciones más recientes por la siguiente:

$$K_d = f_{oc} * K_{oc} + f_{BC} * K_{BC} \quad (14)$$

donde f_{BC} es la fracción de carbono negro que posee la muestra y la K_{BC} es el coeficiente de distribución carbono negro-agua. En la ecuación 14, la K_{BC} es independiente de la concentración del compuesto disuelta, pero existen estudios que han comprobado que este coeficiente si es dependiente de la concentración disuelta (C_w), por lo que la ecuación 14, pasa a ser la siguiente (Accardi-Dey y Gschwend, 2002):

$$K_d = f_{oc} * K_{oc} + f_{BC} * K_{BC} * C_w^{n-1} \quad (15)$$

donde n , es el exponente de Freundlich para la adsorción a carbono negro.

Nosotros para determinar la K_d teórica utilizamos la ecuación (2), y nos dió como resultado que este coeficiente era mucho menor, en la mayoría de los casos, que el coeficiente de distribución determinado experimentalmente. El motivo de esta desviación se debe a que al utilizar la ecuación (2) no estábamos teniendo en cuenta el factor adicional de la adsorción debida al carbono negro. Si hubiésemos calculado la K_d teórica a través de la ecuación (15), seguramente este valor estaría más en concordancia con el valor obtenido experimentalmente. No obstante, hubiera sido necesario determinar la fracción de carbono negro presente en los suelos, lo cual se escapaba de los objetivos inicialmente propuestos en esta tesis doctoral.

Es probable por tanto, que en la mayoría de las muestras de suelo seleccionadas en nuestro estudio, exista una fracción de carbono negro que forme parte de la materia orgánica antropogénica del suelo, ya que proviene probablemente de los procesos de combustión incompleta. Esta materia orgánica antropogénica junto con la materia orgánica natural del suelo, hace que la adsorción de pireno sea más acusada que si solamente existiese en el suelo materia orgánica natural. La presencia del carbono negro da lugar a una lenta desorción del pireno, lo cual hace que exista una limitación potencial para la degradación de los HAPs por los microorganismos, y por lo tanto disminuya la bioaccesibilidad de éstos en los suelos.

V.4.3.2 Mineralización comparativa.

Cuando se estudió la mineralización en varios suelos en los que inicialmente la concentración de pireno marcado adsorbida era la misma, se observó diferencia entre las tasas máximas y porcentajes finales de mineralización.

En los suelos utilizados por nosotros para comparar la mineralización entre ellos (los que aparecen en la tabla IV.11), el contenido en materia orgánica es diferente. Si ordenamos a los suelos según este contenido en orden creciente tendríamos: 21 < 32 < 22 < 26. Si de la misma forma, atendiendo a los datos de la tabla IV.11, los ordenamos según la tasa máxima obtenida en la mineralización: 26 < 22 < 21 < 32 y si lo hacemos con el porcentaje final de mineralización: 26 < 21 < 32 < 22. Se observó por tanto que, en general, cuanto mayor es el contenido en materia orgánica, menor es la tasa máxima de mineralización.

Nuestros resultados concuerdan con otros observados por Ortega-Calvo et al., donde se compararon la mineralización de fenantreno en varios suelos en los que el contenido en materia orgánica era distinto, y se obtuvo que cuanto mayor era el contenido en materia orgánica, menor era la tasa máxima y el porcentaje final de mineralización. En este estudio los resultados obtenidos se

explicaron en base a que con el aumento de la materia orgánica, disminuye la concentración de fenantreno disuelto en la fase acuosa del suelo, por lo que disminuye la tasa máxima de mineralización (Chiou, 1989; Ortega-Calvo et al., 1997).

En base a estos conocimientos, si observamos nuestros resultados podríamos preguntarnos por qué en el suelo n° 21 (Monte de la Teja I) la tasa máxima y el porcentaje final de mineralización es menor que en el suelo n° 32 (adyacente a la estación de control en Los Barrios), si el contenido en MO del suelo 21 es menor que el del suelo 32. Esta diferencia sería explicable en base a que en estos dos suelos existe otro componente que es distinto, y éste es la arcilla. En el suelo 21 el contenido en arcilla es 48%, mientras que en el suelo 32 es de 22,4%. Según nuestros resultados podríamos decir que en suelos donde el contenido en MO es parecido, la mineralización es menor cuanto mayor es el contenido en arcilla.

Según Hassett y Banwart, cuando el contenido en MO de los suelos está por debajo de 6-8%, la contribución de la arcilla a la adsorción de los HAPs en los suelos, puede ser significativa. De esta forma, la arcilla puede también afectar a la biodegradación de los contaminantes orgánicos hidrofóbicos (Hassett y Banwart, 1989; Knaebel et al., 1994).

En el trabajo realizado por Ortega-Calvo et al., se estudió que el efecto de la arcilla sobre la mineralización era potenciado en asociación con los ácidos húmicos. Ellos dedujeron que en los suelos donde el contenido en MO era similar, la combinación de la MO y la arcilla reducía la accesibilidad de fenantreno para los microorganismos. La conclusión a la que llegaron en este trabajo fue que, la influencia de la adsorción a la MO del suelo en la biodegradación fue clara, y los datos sugirieron que las interacciones entre las fracciones húmicas y la arcilla dentro del suelo, son también importantes factores en la biodegradación de los contaminantes hidrofóbicos en el suelo (Ortega-Calvo et al., 1997).

Toda esta relación explicada entre la materia orgánica, la arcilla y la mineralización de los suelos, sólo se cumple si atendemos a los datos de las muestras que aparecen en la tabla IV.11, es decir, que sólo se cumple con los suelos en los que la mineralización del pireno marcado con ^{14}C se realizó en ensayos en suspensión.

Pero si tenemos en cuenta los ensayos con los compuestos nativos (tabla IV.12) no se observó una clara relación entre el contenido de materia orgánica, el de arcilla y los porcentajes de desaparición. Con todos los datos recopilados en esta tabla, no se encontró relación evidente entre la materia orgánica y la adsorción, ni entre esta última y la bioaccesibilidad de los compuestos.

Se concluye que en los suelos, aparte de la materia orgánica y la arcilla, debían de existir otros factores que probablemente estuviesen haciendo que no ocurriera la biodegradación total de los HAPs estudiados. Por lo tanto se

estudiaron otros posibles factores que pudiesen influir en la bioaccesibilidad, pasando así a los ensayos con hollín de diesel y a los de envejecimiento.

V.4.3.3 Ensayo de simulación de deposición atmosférica.

Los HAPs que están presentes en los suelos estudiados se deben a deposición atmosférica. Cuando los HAPs son liberados a la atmósfera debido a los procesos de combustión, éstos son adsorbidos por las partículas en suspensión y transportados por el aire hasta llegar a ser depositados en los suelos.

El hecho de que los HAPs presentes en nuestros suelos hayan llegado en forma de partículas en suspensión, puede que sea uno de los motivos por los cuales estos contaminantes son poco bioaccesibles.

Para comprobar este efecto, se realizaron ensayos con una muestra en la cual se simuló contaminación atmosférica añadiéndole una cantidad determinada de un polvo de hollín, obtenido de la combustión en los tubos de escape de los vehículos diesel.

En la figura IV.21 se mostró la mineralización de los HAPs diana para la muestra forestal n° 22 (Monte de la Teja II) y para la muestra n° 22 + hollín. Tanto en esta figura como en la tabla IV.14, pudo verse que el porcentaje final de mineralización es mayor para el caso en el que existe el hollín.

La bioaccesibilidad por *Mycobacterium gilvum* VM552 de fenantreno y pireno “nativo” en la muestra enriquecida con este polvo de hollín, aparece reflejada en la figura IV.22. En esta figura se observó que cuando en la muestra de suelo existían las partículas de hollín, los HAPs diana eran mucho menos bioaccesibles.

Además, con el ensayo de adsorción correspondiente a la figura IV.23, pudo deducirse que el motivo de esta baja bioaccesibilidad cuando están presentes las partículas de hollín, se debía a que el fenómeno de la adsorción de los HAPs era más acusado.

Un estudio con polvo de hollín parecido al realizado por nosotros, fue publicado por Johnsen et al. en 2006. Ellos simularon también contaminación difusa en un suelo urbano utilizando un polvo de hollín aislado de vertederos municipales. Los resultados que obtuvieron fueron que cuando estaba presente el hollín en las muestras de suelo, el porcentaje de mineralización de los HAPs marcados con ^{14}C aumentaba, debido a que aumentaban el número de degradadores de HAPs. Pero a pesar de este aumento en la mineralización, ellos obtuvieron que los HAPs de 3 y 4 anillos se biodegradaban en un 10-20%, mientras que los de 5-6 anillos no se biodegradaban. Como conclusión en esta publicación supusieron que la persistencia y la baja bioaccesibilidad se debían a la adsorción a las partículas de carbono negro existentes en el polvo de hollín (Johnsen et al., 2006).

La literatura es extensa para el carbono negro, el cual es un término que se usa para describir a los productos de la erosión de las rocas y el grafito, y la combustión incompleta de los combustibles fósiles. Después de la combustión incompleta, tiene lugar unas reacciones de recondensación en la fase gas, lo cual da lugar a estructuras globulares aromáticas que se condensan para dar los agregados que forman el denominado “soot”, es decir, hollín (Goldberg, 1985). El carbono negro actúa como una fase fuertemente adsorbente de los compuestos hidrofóbicos, HAPs (Lohmann et al., 2005).

Los resultados obtenidos por nosotros en los ensayos de simulación de deposición atmosférica, están de acuerdo con los obtenidos por Johnsen et al., por lo que nosotros también asumimos que cuando los HAPs se incorporan en el suelo en forma de partículas en suspensión, son menos bioaccesibles debido a la presencia de las partículas de carbono negro que se encuentran presentes en el polvo de hollín y que hacen que los HAPs estén más adsorbidos y sean más difícilmente biodegradados.

V.4.4 EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE HAPs.

Nuestros datos muestran que para un mismo suelo, el porcentaje final de mineralización del pireno, disminuye con el aumento del tiempo de residencia de este compuesto en el suelo (tabla IV.17). Esta reducción sugiere que con el tiempo, un gran porcentaje cada vez mayor de este compuesto llega a ser menos biodisponible y más resistente a la biodegradación. Estos resultados concuerdan con otros trabajos publicados, como el de Namhyun y Alexander, donde se determinó en diferentes suelos, que el porcentaje final de la mineralización de fenantreno era menor cuanto mayor era el tiempo de envejecimiento de este compuesto (Namhyun y Alexander, 1998).

De la misma forma, hemos obtenido que la tasa máxima de mineralización del pireno, disminuye con el aumento del tiempo de envejecimiento. Esto sugiere que la concentración de compuesto disponible para los microorganismos degradadores, está disminuyendo. La concentración de un compuesto orgánico disponible para la bacteria, y por lo tanto la tasa de su metabolismo, puede ser controlada por la tasa de la transferencia de este compuesto desde la forma no disponible hasta la forma disponible (Alexander y Scow, 1989).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, están de acuerdo con otro trabajo publicado, donde se determinó que el tiempo que el fenantreno y el 4-nitrofenol permanecían en el suelo afectaba a la biodisponibilidad de éstos (Hatzinger y Alexander, 1995). De esta forma, con el envejecimiento, los compuestos orgánicos se hacen progresivamente menos disponibles para los organismos.

La incorporación de los compuestos orgánicos a los suelos implica, a menudo dos procesos cinéticamente distintos: un proceso inicial rápido y reversible,

seguido de un periodo largo y lento que puede ocurrir en unas semanas, meses o quizás años. Es esta lenta adsorción la que conlleva a una fracción de estos compuestos que serán resistentes a la desorción. Es en este caso en el que se habla de compuestos envejecidos.

Han sido varios los mecanismos descritos para el envejecimiento de los compuestos orgánicos en suelos y sedimentos, pero de forma esquematizada podría decirse que, en el envejecimiento están implicados varios procesos: difusión hacia los microporos del suelo, reparto dentro de la materia orgánica del suelo, alta adsorción a la superficie del suelo, o bien, una combinación de estos procesos (Steinberg et al., 1987)(Brusseu et al., 1991; Wu y Chschwend, 1986). De esta forma la tasa de biodegradación de los compuestos envejecidos puede estar limitada por la tasa de difusión desde los microporos, la repartición hacia fuera de la materia orgánica, o la desorción desde la superficie (Alexander y Scow, 1989).

Se cree que durante el envejecimiento, las moléculas se mueven lentamente hacia el interior de la matriz del suelo, donde los sitios no son accesibles ni para los microorganismos más pequeños. El principal adsorbente para las moléculas hidrofóbicas es la materia orgánica del suelo, y es en esta fracción donde supuestamente se atrapan a estas moléculas.

Se ha propuesto que la materia orgánica del suelo es el principal factor por el cual se reduce la biodisponibilidad del fenantreno envejecido (Nam et al., 1998), aunque la materia orgánica no es la única propiedad importante del suelo (Chung y Alexander, 1998). La fracción orgánica de los suelos contiene abundantes nanoporos (Xing y Pignatello, 1997) y el secuestro de los compuestos puede localizarse en estos poros minúsculos.

Por lo que el fenómeno de envejecimiento incrementa la adsorción de los HAPs a la matriz sólida del suelo, haciendo más difícil la accesibilidad de éstos para los microorganismos.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES



Las conclusiones más importantes obtenidas en esta tesis son:

- 1. Los resultados obtenidos para la concentración de HAPs totales en la capa superficial del suelo (0 - 25 cm) en las muestras analizadas en el Campo de Gibraltar, dan una media de 282,7 µg/Kg.** Esta concentración puede considerarse como una contaminación de fondo, y se corresponde con niveles de contaminación difusa por HAPs detectados tanto en Europa como en EE.UU.
- 2. La evaluación de los datos obtenidos con respecto a los niveles genéricos de referencia (NGR) recogidos en el “ 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”, da como resultado la ausencia de problemas significativos de contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos en los suelos estudiados.** Sería recomendable la revisión de algunos NGR para la protección de organismos acuáticos, ya que estos niveles se sobrepasaron en algunos puntos y HAPs específicos. En ningún caso se sobrepasaron los NGR propuestos para la protección de los organismos del suelo y vertebrados terrestres.
- 3. Los resultados de los ensayos de bioaccesibilidad muestran una gran persistencia de los HAPs.** A pesar de detectarse un porcentaje significativo de mineralización de los compuestos marcados añadidos (30 - 40%), se obtienen unas fracciones resistentes a biodegradación significativas.
- 4. El uso de poblaciones microbianas preacondicionadas y un mayor número de microorganismos degradadores de los HAPs diana, no disminuyó en nada la persistencia de estos compuestos en los suelos.** La baja bioaccesibilidad de los HAPs no se debe a la falta de microorganismos en los suelos capaces de degradar estos compuestos.
- 5. Las fracciones resistentes de los HAPs obtenidas, pueden deberse en parte a que la concentración de estos compuestos en los suelos es muy baja.** Además por tratarse de HAPs depositados desde la atmósfera, lo hacen en forma de partículas en suspensión y esto también hace que estos compuestos sean menos bioaccesibles.

6. **La baja bioaccesibilidad de los HAPs en los suelos estudiados, sería explicable en base a una fuerte adsorción del compuesto a la matriz sólida del suelo**, que se ve incrementada por el fenómeno de “envejecimiento”.
7. **El contenido en materia orgánica de los suelos afecta a la mineralización, y en consecuencia, a la biodegradación** de estos contaminantes hidrofóbicos en los suelos. La presencia de materia orgánica antropogénica (carbono negro), además de la materia orgánica natural del suelo, hace que la adsorción de los HAPs sea más acusada y por lo tanto hace a éstos menos bioaccesibles.
8. **Los datos obtenidos sugieren que la exposición crónica de los suelos a flujos, aunque bajos, de deposición de HAPs de la atmósfera da lugar a la formación de fracciones muy resistentes a la biodegradación, lo que puede ser una causa de un aumento progresivo en la concentración de estos contaminantes.**

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA



- Accardi-Dey, A.; Gschwend, P. M. Assessing the Combined Roles of Natural Organic Matter and Black Carbon as Sorbents in Sediments. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 21-29.
- Alexander, M.; Scow, K. M. Kinetics of biodegradation in soil. In *Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils*, 1989; pp 243-269.
- Alexander, M. Research needs in bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **1991**, *25*, 1972-1973.
- Alexander, M. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press: San Diego, CA, 1999.
- Alexander, M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 4259-4265.
- Baek, S. O.; Goldstone, M. E.; Kirk, P. W. W.; Lester, J. N.; Perry, R. Phase distribution and particle size dependency of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmosphere. *Chemosphere* **1991**, *22*, 503-520.
- Bastiaens, L.; Springael, D.; Wattiau, P.; Harm, H.; de Wachter, R.; Verachtert, H.; Diels, L. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *66*, 1834-1843.
- Beck, A. J.; Wilson, S. C.; Alcock, R. E.; Jones, K. C. Kinetic constraints on the loss of organic chemicals from contaminated soils: implications for soil-quality limits. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **1995**, *25(1)*, 1-43.
- Bidleman, T. E. Atmospheric processes: wet and dry deposition of organic compounds are controlled by their vapor-particle partitioning. *Environ. Pollut.* **1998**, *22*, 361-367.
- Bonazountas, M.; Kallidromitou, D. Mathematical Hydrocarbons fate modelling in soil system. In *Principals and Practices for petroleum contaminated soil*. Lewis Publishers: USA, 1993.
- Brusseau, M. L.; Jessup, R. E.; Rao, P. S. C. Nonequilibrium sorption of organic chemicals: elucidation of Rate-Limiting Processes. *Environ. Sci. Technol.* **1991**, *25*, 134-142.
- Bucheli, T. D.; Blum, F.; Desaulles, A.; Gustafsson, O. Polycyclic aromatic hydrocarbons, black carbon, and molecular markers in soils of Switzerland. *Chemosphere* **2004**, *56*, 1061-1076.

Bueno-Montes, M. Biorrecuperación de suelos contaminados: Influencia de los agentes tensioactivos en la biodisponibilidad microbiana de hidrocarburos aromáticos policíclicos, Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla 2005.

Caricchia, A. M.; Chiavarini, S.; Pezza, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmospheric particulate matter in the city of Naples (Italy). *Atmospher. Environ.* **1999**, *33*, 3731-3738.

Carmichael, L. M.; Pfaender, F. K. Polynuclear aromatic hydrocarbon metabolism in soils: relationship to soil characteristics and preexposure. *Environ. Toxicol. Chem.* **1997**, *16*, 666-675.

Cerniglia, C. E.; Heitkamp, M. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*; Varanasi, U., Ed; CRC Press, Boca Raton, FL: USA, 1989; pp 41-68.

Chaineau, C. H.; Yepremian, C.; Vidalie, J. F.; Ducreux, J.; Ballerini, D. Bioremediation of a crude Oil-Polluted Soil: Biodegradation, Leaching and Toxicity Assesments. *Wat. Air Soil Pollut.* **2003**, *144*, 419-440.

Chiou, C. T.; Peters, L. J.; Freed, V. H. A physical concept of soil-water equilibria of nonionic organic compounds. *Chemosphere* **1979**, *206*, 831-832.

Chiou, C. T.; Porter, P. E.; Schmedding, D. W. Partition equilibriums of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. *Environ. Sci. Technol.* **1983**, *17*, 227-231.

Chiou, C. T.; Malcolm, R. L.; Brinton, T. I.; Kile, D. E. Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids. *Environ. Sci. Technol.* **1986**, *20*, 502-508.

Chiou, C. T. Theoretical considerations of the partition uptake of nonionic organic compounds by soil organic matter. In *Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils*; Sawhney, B. L. and Brown, K., Eds; SSSA Special Publication no. 22; Madison, 1989; pp 1-29.

Chiou, C. T.; Mc Groddy, S. E.; Kile, D. E. Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 264-269.

Chung, N.; Alexander, M. Differences in Sequestration and Bioavailability of Organic Compounds Aged in Dissimilar Soils. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 855-860.

Chung, N.; Alexander, M. Effect of Concentration on Sequestration and Bioavailability of Two Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 3605-3608.

Coleman, A. J.; Mauro, D. M. Background polycyclic aromatic hydrocarbons in surface soil in the United States. Proceedings of the First International Conference on Remediation Contaminated Sediments. Vol 1, Venice, Italia, 10-12 October 2001, Batelle Press: Ohio, USA **2002**, *61*, 335-341.

Cornelissen, G.; Rigterink, H.; Ferdinandy, M. M. A.; van Noort, P. C. M. Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 966-970.

Cornelissen, G.; Gustafsson, O.; Bucheli, T. D.; Jonker, M. T. O.; Koelmans, A. A.; van Noort, P. C. M. Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal, and kerogen in sediments and soils: mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation and biodegradation. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 6881-6895.

Cousins, I. T.; Jones, K. C. Air-Soil exchange of semi-volatile organic compounds (SOCs) in the U.K. *Environ. Pollut.* **1998**, *102*, 105-118.

Cousins, I. T.; Beck, A. J.; Jones, K. C. A review of the processes involved in the exchange of semi-volatile organic compounds (SVOC) across the air-soil interface. *Sci. Total Environ.* **1999**, *228*, 5-24.

Cuyppers, C. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and sediments. Prediction of bioavailability and characterization of organic matter. University Wageningen, Holanda 2001.

Dabestani, R.; Ivanov, I. N. A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 10.

Dibble, J. R.; Bartha, R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **1979**, *37*, 729-739.

Dickhut, R. M.; Gustafson, K. E. Atmospheric washout of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Southern Chesapeake Bay region. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 1518-1525.

Dupont, R. R.; Sims, R. C.; Sorensen, D. L. In situ Biological treatment of Hazardous Waste-Contaminated soils. In *Biotreatment Systems*, 1998; pp 2.

Dzombak, D. A.; Luthy, R. G. Estimating adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils. *Soil Sci.* **1984**, *137*, 292-308.

Dzombak, D. A.; Labieniec, P. A.; Siegrist, R. L. The need for uniform soil cleanup goals. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, 765-766.

Evants, W. C.; Fuchs, G. Anaerobic Degradation of Aromatic Compounds. *Ann. Rev. Microbiol.* **1998**.

Eweis, J. B.; Ergas, S. J.; Chang, B.; Schroeder, E. D. Principios de Biorrecuperación. García-Brage, A., Ed; McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.: Madrid, España, 1998.

Fernandez, P.; Vilanova, R. M.; Grimalt, J. O. Sediment fluxes of polycyclic aromatic hydrocarbons in european high altitude mountain lakes. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 3716-3722.

Fernandez, P.; Vilanova, R. M.; Martinez, C.; Appleby, P.; Grimalt, J. O. The historical record of atmospheric pyrolytic pollution over Europe registered in the sedimentary PAH from remoted mountain lakes. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 1906-1913.

Gardner, B.; Hewitt, C. N.; Jones, K. C. PAH in air adjacent to two inland water bodies. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 2405-2413.

Gee, G. W.; Baueder, J. W. Particle-size Analysis. Cap.15. In Klute A. Ed; Methods of soil analysis. Part.1. Physical and Mineralogical Methods. 2^a ed; American Society of Agronomy. Madison. Wisconsin, 1986; pp 383-411.

Gibson, D. T. Microbial Degradation of organic Compounds, Marcel Dekker, New York. **1984**.

Goldberg, E. D. Black carbon in the Environment: Properties and Distribution; Wiley: New York. **1985**.

Grathwohl, P. Influence of organic matter from soils and sediments from verious origins on the sorption of some clorinated aliphatic hydrocarbons: implications on Koc correlations. *Environ. Sci. Technol.* **1990**, *24*, 1697-1693.

Grimalt, J. O.; van Drooge, B. L.; Ribes, A.; Fernandez, P.; Appleby, P. Polycyclic aromatic hydrocarbon composition in soils and sediments of high altitude lakes. *Environ. Pollut.* **2004**, *131*, 13-24.

Grosser, R. J.; Warshawsky, D.; Vestal, J. R. Indigenous and Enhanced Mineralization of Pyrene, Benzo(a)pyrene y Carbazole in Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 3462-3469.

Hassett, J. J.; Banwart, W. L. The sorption of nonpolar organics by soils and sediments. In Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils; Eds; B.L. Sawhney and K.Brown. SSSA Special Publication no. 22, Madison. **1989**; pp 31-44.

Hatzinger, P. B.; Alexander, M. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, *29*, 537-545.

Heitkamp, M.; Cerniglia, C. E. The effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in fresh water and stuarine ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* **1987**, *6*, 535-546.

Heitkamp, M.; Cerniglia, C. E. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by a *Mycobacterium sp.* in microcosms containing sediment and water from a pristine exosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 1968-1976.

Herbes, S. E.; Schwall, L. R. Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleum-contaminated sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **1978**, *35*, 306-316.

Hicks, B. B.; Baldocchi, D. D.; Meyers, T. P.; Hosker, R. P.; Matt, D. R. A preliminary multiple resistance routine for deriving dry deposition velocities from measured quantities. *Wat. Air Soil Pollut.* **1987**, *36*, 311-330.

Hipplein, M.; McLachlan, M. S. Soil/air partitioning of semivolatile organic compounds. Part I: Method development and influence of physical-chemical properties. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 310-316.

Holliger, C.; Zehnder, A. J. Anaerobic biodegradation of Hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7*, 326-330.

Jensen, J.; Folker-Hansen, P. Soil quality criteria for selected organic compounds. Danish Environmental Protection Agency. Working report No. 47. **1995**.

Johnsen, A. R.; Karlson, U. PAH Degradation Capacity of Soil Microbial Communities-Does it Depend on PAH Exposure? *Microb. Ecol.* **2005**, *0*, 1-8.

Johnsen, A. R.; De Liphay, J. R.; Sorensen, S. J.; Ekelund, F.; Christensen, P.; Andersen, O.; Karlson, U.; Jacobsen, C. S. Microbial biodegradation of

street dust polycyclic aromatic hydrocarbons in microcosms simulating diffuse pollution or urban soil. *Environ. Microbiol.* **2006**, 8, 535-545.

Jones, K. C.; Stratford, J. A.; Waterhouse, K. S.; Vogt, N. B. Organic contaminants in Welsh soils: polynuclear aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* **1989**, 23, 540-550.

Jones, K. C. Observations on long-term air-soil exchange of organic contaminants. *Environ. Sci & Pollut. Res.* **1994**, 1, 171-177.

Jones, K. C.; Stratford, J. A.; Tidrikge, P.; Waterhouse, K. S.; Johnston, A. E. Polynuclear aromatic hydrocarbons in an agricultural soil: long-term changes in profile distribution. *Environ. Pollut.* **1994**, 56, 337-351.

Jones, K. C.; Alcock, R. E.; Johnson, D. L.; Northcott, G. L.; Semple, K. T.; Woolgar, P. J. Organic chemicals in contaminated land: Analysis, significance and research priorities. *Land Contaminant. Reclam.* **1996**, 4, 189-197.

Jones, K. C.; Stratford, J. A.; Waterhouse, K. S.; Furlong, E. T.; Giger, W.; Hites, R. A.; Schaffner, C.; Johnston, A. E. Increases in the polynuclear aromatic hydrocarbon content of an agricultural soil over the last century. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 23, 95-101.

Jonker, M. T. O.; Kolemans, A. A. Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Soot and Sediment: Solvent Evaluation and Implications for Sorption Mechanism. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, 36, 4107-4113.

Junker, B. A.; Zehnder, A. J. B.; Harm, H. Quantification of polymer interactions in bacterial adhesion. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32, 2909-2915.

Kanally, R. A.; Harayama, S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 2059-2067.

Karickhoff, S. W.; Brown, D. S.; Scott, T. A. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Wat. Res.* **1979**, 13, 241-248.

Karickhoff, S. W.; Morris, K. R. Sorption dynamics of hydrophobic pollutants in sediments suspensions. *Environ. Toxicol. Chem.* **1985**, 4, 469-479.

Knaebel, D. B.; Federle, T. W.; McAvoy, D. C.; Vestal, J. R. Effect of mineral and organic soil constituents on microbial mineralization of organic compounds in a natural soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60, 4500-4508.

- Ligocki, M. P.; Leuenberger, C.; Pankow, J. F. Trace organic compounds in rain- III. Particle scavenging of neutral organic compounds. *Atmospher. Environ.* **1985**, *19*, 1619-1626.
- Lohmann, R.; MacFarlane, J. K.; Gschwend, P. Importance of Black carbon to sorption of Native PAHs, PCBs and PCDDs in Boston and New York Harbor Sediments. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 141-148.
- Luthy, R. G.; Aiken, G. R.; Brusseau, M. L.; Cunningham, S. D.; Gschwend, P. M.; Pignatello, J. J.; Reinhard, M.; Traina, S. J.; Weber, W. J.; Westall, J. C. Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 3341-3347.
- Maliszewska-Mordybach, B. Polycyclic aromatic hydrocarbons in agroecosystems-example of Poland. *Polycyclic Aromatic Compounds* **2000**, *21*, 287-295.
- Mastrangelo, G.; Fadda, E.; Marzia, V. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ. Health Perspect.* **1996**, *104*, 1166.
- McLellan, S. L.; Warshawsky, D.; Shann, J. R. The effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on the degradation of Benzo[a]pyrene by *Mycobacterium sp.* strain RJGII-135. *Environ. Toxicol. Chem.* **2002**, *21*, 253-259.
- Menn, F. M.; Easter, J. P.; Sayler, G. S. Bacterial activity enhancement and soil decontamination. In H.J. Rehm, G. Reed A. Puhler and P. Stadler, editor; Biotechnology. *Environmental Process II. Soil Decontamination.* Wiley-VCH. Weinheim. **2000**, *2*, 425-439.
- Métodos oficiales de análisis Tomo III. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. **1986**.
- Miller, M. M.; Wasik, S. P.; Haung, G. L.; Shiu, W. Y.; Mackay, D. Relationships between octanol water partition-coefficient and aqueous solubility. *Environ. Sci. Technol.* **1985**, *19*, 522-529.
- Nam, K.; Chung, N.; Alexander, M. Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 3785-3788.
- Namhyun, C.; Alexander, M. Differences in Sequestration and Bioavailability of Organic Compounds Aged in Dissimilar Soils. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 855-860.

Ortega-Calvo, J. J.; Lahlou, M.; Saiz-Jimenez, C. Effect of Organic Matter and Clays on the Biodegradation of phenanthrene in Soils. *Internat. Biodet. Biodegrad.* **1997**, *40*, 101-106.

Poster, D. L.; Baker, J. E. Influence of sub-micron particles on hydrophobic organic contaminants in precipitation. 2. Scavenging of polycyclic aromatic hydrocarbons by rain. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 349-354.

Reid, B. J.; Stokes, J. D.; Jones, K. C.; Semple, K. T. Nonexhaustive Cyclodextrin-Based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 3174-3179.

SAEFL; Swiss Agency for the environment, Forest and Landscape CH-3003 Bern Cometary on the ordinance of 1st July 1998 relating to impacts on soil. Environment in practice, 2001.

Semple, K. T.; Doick, K. J.; Jones, K. C.; Burauel, P.; Craven, A.; Harms, H. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, 228-231.

Steinberg, S. M.; Pignatello, J. J.; Sawhney, B. L. Persistence of 1,2-Dibromoethane in soils: Entrapment in Intraparticle micropores. *Environ. Sci. Technol.* **1987**, *21*, 1201-1208.

Ten Hulscher, D. E. M.; Cornelissen, G. Effect of temperature on sorption equilibrium and sorption kinetics of organic micropollutants - a review. *Chemosphere* **1996**, *32*, 609.

Trenck, K. T.; Ruf, J.; Flittner, M. Guide values for contaminated sites. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, *1*, 253-261.

U.S. Department of Health and Human Services Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. 1995.

Urbieto-Garagorri, M. T.; Egiarte-Intxaurza, I.; Uria-Navaridas, E. Optimization of the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in road asphalts by HPLC with fluorimetric detection. *Química Analítica.* **1999**, *18*, 197-202.

U.S. EPA. Test Methods for evaluating solid waste, 3rd ed., Uptade III, EPA SW-846; U.S.-GPO, Washington DC. 1995.

Van Herwijnen, R. Metabolic and cometabolic biodegradation of PAHs. Universidad de Amsterdam. Holanda. 2003.

- Volkering, F.; Breure, A. M.; Rulkens, W. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* **1998**, *8*, 401-417.
- Wania, F.; Hoff, J. T.; Jia, C. Q.; Mackay, D. The effects of snow and ice on the environmental behaviour of hydrocarbons organic chemicals. *Environ. Pollut.* **1998**, *102*, 25-41.
- Wania, F.; Mackay, D.; Hoff, J. T. The importance of snow scavenging of PCB an PAH vapors. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 195-197.
- Weber, W. J.; McGinley, P. M.; Katz, L. E. A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 1. Conceptual basis and equilibrium assessments. *Environ. Sci. Technol.* **1992**, *26*, 1955-1962.
- Weber, W. J.; Huang, W. A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 1. Conceptual basis and equilibrium assessments. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 881-888.
- Weissenfels, W. D.; Klewer, H. J.; Langhoff, J. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *36*, 689-696.
- Wick, L. Y.; Colangelo, T.; Harms, H. Kinetics of mass transfer-limited bacterial growth on solid PAHs. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35* (2), 354-361.
- Wick, L. Y.; Wattiau, P.; Harm, H. Influence of the growth substrate on the micolic acid profiles on *Mycobacterium*. *Environ. Microbiol.* **2002**, *4* (10), 612.
- Wild, S. R.; Jones, K. C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environ. Pollut.* **1995**, *88*, 91-108.
- Wu, S. C.; Gschwend, P. Sorption kinetics of hydrophobic organic compounds to natural sediments and soils. *Environ. Sci. Technol.* **1986**, *20*, 717-725.
- Xia, G.; Pignatello, J. J. Detailed sorption isotherms of polar and apolar compounds in a high-organic soil. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 84-94.
- Xing, B. S.; Pignatello, J. J. Dual-mode sorption of low-polarity compounds in glassy poly(vinylchloride) and soil organic matter. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 792-799.

CAPÍTULO VIII

ANEXO



Tabla VIII.1 Contenido en HAPs ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) de los suelos analizados.

HAP	Cantera COALSA 1	Exterior CEPSA 3	Exterior CEPSA 4(a)	Exterior CEPSA 4(b)	Exterior CEPSA 5	Interior CEPSA 6	Interior CEPSA 7(a)	Interior CEPSA 7(b)	Barranco Bochorno 9(a)
Fno	N.D ^a	N.D ^a	1,2 (1,0)	N.D ^a	3,4 (1,0)	360,0 (42,0)	2,8 (1,1)	2,1 (0,4)	N.D ^a
Fen	220,0	32,0 (1,4)	22,6 (7,0)	116,5 (23,3)	44,5 (12,0)	29,0 (7,1)	88,0 (27,0)	40,5 (4,9)	15,5 (3,5)
Ant	33,0	6,4 (3,7)	4,6 (1,3)	20,0 (18,4)	6,2 (2,4)	11,5 (2,2)	6,2 (2,6)	3,1 (0,4)	8,5 (1,3)
Fln	43,0	41,7 (12,2)	12,9 (1,6)	70,5 (23,4)	42,5 (6,4)	89,0 (12,7)	28,5 (7,8)	3,7 (1,0)	15,6 (0,6)
Pir	70,0	8,0 (0,2)	23,0 (0,5)	39,5 (23,2)	12,5 (2,1)	39,0 (4,2)	9,7 (0,4)	2,1 (0,4)	12,3 (1,1)
B(a)Ant	60,0	3,2 (0,7)	5,5 (1,1)	11,3 (5,3)	20,0 (8,5)	104,0 (22,6)	9,7 (3,8)	0,4 (0,1)	3,1 (0,3)
Cris	220,0	5,0 (0,01)	1,2 (0,1)	19,6 (10,5)	21,0 (5,7)	53,5 (53,0)	7,1 (0,4)	0,5 (0,01)	0,3 (0,0)
B(b)Fln	410,0	11,1 (0,1)	N.D ^a	9,9 (4,5)	10,8 (1,7)	116,5 (6,4)	4,0 (0,01)	2,3 (1,7)	12,1 (4,1)
B(k)Fln	32,0	9,0 (1,1)	N.D ^a	4,0 (1,3)	8,9(1,1)	58,0 (1,4)	3,1 (0,8)	1,0 (0,2)	16,5 (0,7)
B(a)pir	99,0	8,0 (2,3)	0,5 (0,1)	9,5 (3,5)	6,3 (0,7)	46,5 (3,5)	1,6 (0,1)	1,4 (0,6)	4,1 (0,1)
D(ah)Ant	110,0	N.D ^a	0,8 (0,2)	1,7 (0,6)	0,4 (0,1)	28,0 (5,7)	8,6 (0,5)	0,5 (0,1)	4,6 (0,8)
B(ghi)p	51,0	N.D ^a	0,3 (0,01)	2,1 (1,3)	3,0 (0,6)	168,0 (11,3)	3,2 (0,2)	0,3 (0,2)	4,2 (0,1)
I(cd)pir	18,0	N.D ^a	3,5 (0,1)	2,5 (1,2)	1,6 (0,01)	146,5 (3,5)	6,0 (0,8)	0,7 (0,1)	1,6 (0,3)
Σ HAP	1366,0	124,0	55,3	305,3	186,0	1250,0	166,5	59,0	98,4
% M.O	8,52	2,4	0,5	N.d ^b	4,5	2,1	2,3	N.d ^b	6,2

^aNo detectado. LD ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ suelo seco): Fno: 1,14; B(b)Fln: 0,59; B(k)Fln: 0,61; D(ah)Ant: 0,57; B(ghi)p: 0,8 y I(cd)pir: 0,63. ^b No determinado.

Tabla VIII. 1 (continuación). Contenido en HAPs ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) de los suelos analizados.

HAP	Barranco Bochorno 9(b)	Sed.Arroyo Madreveja 10	Majadal Bustos 11	Interquisa Exterior 15	Enterram. La Línea 16(a)	Enterram. La Línea 16(b)	El Zabal 17	Tiradero Alto 19(a)	Tiradero Alto 19(b)
Fno	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	27,5 (2,1)	N.D ^a
Fen	8,6 (1,3)	116,5 (23,3)	10,0 (2,8)	37,0 (2,8)	10,5 (2,1)	7,3 (0,3)	43,0 (10,6)	16,0 (0,6)	14,0 (1,4)
Ant	6,9 (1,0)	20,0 (18,4)	8,8 (0,6)	6,3 (0,0)	6,7 (2,1)	4,1 (1,1)	20,5 (7,8)	17,0 (3,5)	8,6 (1,6)
Fln	2,7 (0,4)	70,4 (23,3)	3,0 (0,6)	24,0 (4,2)	8,2 (3,3)	6,8 (1,8)	55,0 (4,2)	5,2 (0,3)	2,6 (0,1)
Pir	5,4 (0,8)	39,5 (23,3)	13,5 (4,9)	63,0 (7,1)	6,6 (0,8)	15,0 (7,1)	103,0 (9,9)	5,7 (0,6)	3,1 (0,1)
B(a)Ant	2,7 (0,1)	11,3 (5,3)	1,0 (0,0)	63,0 (7,1)	4,7 (0,7)	3,9 (0,1)	53,0 (17)	1,1 (0,1)	2,7 (0,1)
Cris	3,4 (0,4)	19,6 (10,5)	N.D ^a	0,8 (0,4)	5,4 (0,1)	4,9 (0,4)	1,4 (0,4)	2,9 (0,1)	4,9 (0,1)
B(b)Fln	2,8 (0,1)	9,9 (4,5)	2,8 (0,6)	33,0 (1,4)	7,7 (0,4)	3,0 (0,1)	47,0 (11,3)	7,1 (0,7)	3,1 (0,6)
B(k)Fln	2,7 (0,2)	4,0 (1,3)	2,4 (0,6)	30,5 (0,7)	9,1 (0,5)	5,9 (0,1)	19,5 (4,9)	6,2 (0,8)	2,7 (0,6)
B(a)pir	0,5 (0,1)	9,5 (3,5)	0,5 (0,1)	6,1 (0,1)	2,2 (0,2)	0,9 (0,2)	40,5 (9,2)	1,2 (0,1)	0,4 (0,1)
D(ah)Ant	6,8 (1,8)	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	2,9 (0,3)	1,5 (0,1)	3,6 (1,1)	7,2 (0,7)	2,6 (0,4)
B(gh)ip	2,4 (0,1)	N.D ^a	N.D ^a	8,5 (0,7)	1,4 (0,2)	0,9 (0,1)	24,0 (3,2)	9,9 (1,6)	2,9 (0,1)
I(cd)pir	1,1 (0,4)	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	1,8 (0,1)	0,8 (0,0)	18,5 (3,5)	11,0 (1,6)	6,3 (0,2)
ΣHAP	50,5	300,0	41,7	221,7	67,2	55,0	429,0	118,0	53,9
% M.O	N.d ^b	2,7	5,3	3,6	0,01	N.d ^b	0,1	5,1	N.d ^b

^aNo detectado. LD ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ suelo seco): Fno: 1,14; Cris: 0,51; D(ah)Ant: 0,57; B(gh)ip: 0,8 y I(cd)pir: 0,63. ^bNo determinado.

Tabla VIII.1 (continuación). Contenido en HAPs ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) de los suelos analizados.

HAP	Tiradero	Monte de la	Monte	Monte	Monte	Monte	Monte	RTV	RTV
	Bajo	Teja	Almoraima	Almoraima	Almoraima	Almoraima	Almoraima	Los Barrios	Los Barrios
	20	21	22	26	28	29	31	31	32
Fno	4,2 (0,1)	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a
Fen	56,6 (3,5)	38,0(0,02)	43,5 (7,8)	110,0 (0,01)	74,0 (6,2)	63,0 (1,4)	19,0 (4,2)	19,0 (4,2)	46,0 (0,01)
Ant	8,9 (0,1)	0,5 (0,1)	2,2 (0,3)	5,3 (0,6)	6,6 (0,2)	4,6 (0,2)	0,4 (0,01)	0,4 (0,01)	3,3 (0,3)
Flu	24,0 (7,1)	4,6 (0,8)	86,5 (0,7)	8,2 (3,3)	28,0 (4,2)	124,0 (2,1)	11,5 (8,0)	11,5 (8,0)	22,0 (6,4)
Pir	212,0(150,5)	7,0 (2,8)	66 (12,7)	6,6 (0,3)	5,1 (0,2)	6,0 (2,0)	7,0 (0,8)	7,0 (0,8)	13,4 (0,01)
B(a)Ant	12,6 (0,1)	0,1 (0,0)	20,1 (1,6)	8,2 (0,01)	0,3 (0,1)	N.D ^a	2,2 (0,3)	2,2 (0,3)	1,9 (0,8)
Cris	10,5 (0,8)	2,5 (0,7)	58,6 (0,6)	1,8 (0,7)	0,7 (0,1)	30,2 (1,1)	3,0 (0,5)	3,0 (0,5)	4,0 (1,0)
B(b)Flu	7,4 (0,4)	8,0 (4,2)	20,3 (1,8)	26,1 (1,3)	3,0 (0,01)	2,9 (0,6)	3,3 (0,3)	3,3 (0,3)	2,5 (0,2)
B(k)Flu	3,1 (0,2)	5,0 (1,4)	11,5 (1,6)	45,8 (4,0)	1,0 (0,2)	5,5 (1,8)	2,6 (0,8)	2,6 (0,8)	3,2 (0,6)
B(a)pir	3,8 (0,2)	6,2 (1,7)	8,3 (1,9)	26,2 (0,3)	4,4 (0,4)	13,6 (2,0)	2,6 (0,8)	2,6 (0,8)	2,4 (0,5)
D(ah)Ant	3,8 (0,2)	3,9 (1,2)	334,0 (11,3)	71,0 (11,0)	3,0 (0,8)	64,5 (12)	1,6 (0,3)	1,6 (0,3)	5,1 (0,6)
B(ghi)P	2,3 (0,4)	7,4 (0,6)	138,5 (7,8)	32,3 (1,8)	11,0 (4,9)	20,5 (4,9)	1,5 (0,2)	1,5 (0,2)	1,2 (0,1)
I(cd)pir	11,4 (3,7)	1,9 (0,2)	162,0 (22,6)	8,0 (1,1)	4,0 (0,2)	11,5 (2,1)	0,4 (0,2)	0,4 (0,2)	6,2 (2,6)
Σ HAP	372,0	85,1	951,6	347,6	142,0	346,0	59,0	59,0	111,0
% M.O	7,2	1,7	6,1	10,04	9,5	4,6	2,6	2,6	4,5

^aNo detectado. LD ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ suelo seco): Fno: 1,14 y B(a)Ant: 0,57.

Tabla VIII.1 (continuación). Contenido en HAPs ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) de los suelos analizados.

HAP	Cepsa 34	Cepsa (prado) 35	Vertedero la Doctora 37	Puente Mayorga I 38	Puente Mayorga II 39	Puente Mayorga III 40	Montes Pirineos 41	Montes Montseny 42	Montañas Tatra 43
Fno	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a	N.D ^a
Fen	30,5 (6,4)	13,0 (1,4)	82,0 (9,9)	37,0 (9,0)	141,5 (6,0)	132,0 (26,0)	1055 (130,0)	105,0 (15,6)	247,1 (38,0)
Ant	8,7 (2,4)	1,2 (0,3)	20,0 (4,2)	1,4 (0,1)	38,0 (8,0)	16,5 (6,0)	14,1 (4,2)	6,85 (0,5)	4,5 (1,0)
Fln	35,0 (5,7)	14,0 (0,8)	115,0 (21)	29,0 (5,0)	264,5 (71,0)	78,5 (4,0)	63,0 (17,0)	60,0 (4,2)	32,5 (6,4)
Pir	14,0 (5,0)	11,3 (0,4)	9,9 (0,1)	22,0 (9,0)	164,0 (57,0)	127,0 (19,0)	131,0 (6,4)	108,5 (17,7)	42,5 (5,3)
B(a)Ant	8,5 (0,7)	11,3 (0,4)	27,0 (1,4)	8,3 (0,1)	76,2 (9,0)	18,6 (2,0)	12,3 (2,4)	18,0 (1,4)	3,4 (0,9)
Cris	13,5 (3,5)	8,3 (1,1)	4,6 (0,8)	7,9 (0,2)	116,0 (27,0)	44,0 (14,0)	12,1 (1,3)	28,5 (0,7)	5,6 (0,6)
B(b)Fln	1,3 (0,1)	5,6 (0,8)	17,0 (2,8)	10,4 (2,0)	45,5 (18,0)	25,1 (7,0)	103,4 (40,0)	18,9 (0,8)	7,5 (0,4)
B(k)Fln	3,1 (0,1)	4,7 (1,0)	16,0(2,8)	8,5 (4,0)	52,0 (1,0)	53,5 (6,0)	63,0 (1,0)	12,3 (1,0)	17,0 (1,4)
B(a)pir	8,3 (0,4)	6,1 (1,3)	15,0 (2,1)	4,3 (0,2)	148,0 (44,0)	18,2 (1,0)	94,0 (3,0)	29,5 (0,1)	11,0 (2,8)
D(ab)Ant	8,5 (2,1)	6,0 (1,4)	105,0 (6,4)	N.D	141,5 (15,0)	19,5 (11,0)	95,0 (11,0)	2,9 (0,2)	0,5 (0,1)
B(ghi)lp	0,3 (0,1)	2,5 (0,7)	33,0 (1,4)	16,0 (5,0)	40,0 (13,0)	26,0 (7,0)	224,0 (6,0)	4,2 (0,2)	2,9 (0,2)
I(cd)pir	0,9 (0,3)	8,6 (2,1)	12,5 (0,7)	4,4 (1,0)	43,2 (10,0)	90,7 (2,0)	37,0 (10,0)	13,0 (0,7)	9,9 (2,0)
Σ HAP	132,0	142,0	457,0	149,2	1270,0	695,0	1903,4	407,7	384,0
% M.O	2,0	4,5	6,0	3,8	3,35	3,6	42,8	3,3	11,8

^aNo detectado. LD ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ suelo seco): Fno: 1,1,4.

