



Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**CSIC**



Instituto de Recursos Naturales y  
Agrobiología de Sevilla

**TRABAJO FIN DE GRADO:  
RECUPERACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO POR  
EL HERBICIDA CLORTOLURÓN APLICANDO UN  
CONSORCIO BACTERIANO DEGRADADOR  
ESPECÍFICO Y CICLODEXTRINAS.**

**TITULACIÓN:**

**GRADO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA-MENCIÓN EN  
HORTOFRUTICULTURA Y JARDINERÍA**



**TUTORES:**

**RUBIO BELLIDO, MARINA**

**MORILLO GONZÁLEZ, ESMERALDA**

**MADRID DÍAZ, FERNANDO**

**FLORIDO FERNÁNDEZ, MARÍA DEL CARMEN**

**AUTOR:**

**MORO GONZÁLEZ, AXEL**

**Sevilla, enero de 2018**





Escuela Técnica Superior  
de Ingeniería Agronómica



**CSIC**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Instituto de Recursos Naturales y  
Agrobiología de Sevilla

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA,  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA,  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**RECUPERACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO POR EL HERBICIDA  
CLORTOLURÓN APLICANDO UN CONSORCIO BACTERIANO  
DEGRADADOR ESPECÍFICO Y CICLODEXTRINAS**

Memoria que presenta D. Axel Moro González para optar al título de Grado en  
Ingeniería Agrícola Mención en Hortofruticultura y Jardinería

**FDO.: Axel Moro González**

**TUTORES:**

**Dra. D<sup>a</sup>. Marina Rubio Bellido**  
Titulado Superior Contratado CSIC

**Dra. D<sup>a</sup>. Esmeralda Morillo González**  
Investigadora Científica CSIC

**Dr. D. Fernando Madrid Díaz**  
Técnico Superior Especializado CSIC

**Dra. D<sup>a</sup>. M.<sup>a</sup> del Carmen Florido Fernández**  
Profesora contratada doctora  
Dpto. Cristalografía, Mineralogía  
y Química Agrícola.  
ETSIA, Universidad de Sevilla

Visado en Sevilla, enero 2018



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo de investigación:

En primer lugar, a mis tutores, a la Dra. D<sup>a</sup>. Marina Rubio Bellido, a la Dra. D<sup>a</sup>. Esmeralda Morillo Gonzalez, al Dr. D. Fernando Madrid Díaz y a la Dra. D<sup>a</sup>. M.<sup>a</sup> del Carmen Florido Fernández, por aceptar la dirección del presente trabajo, por sus asesoramientos, consejos, por compartir su conocimiento, experiencia y por toda la ayuda prestada durante todo el tiempo tanto en la parte experimental, como en la elaboración del documento.

También dar las gracias al Dr. D. Jaime Villaverde Capellán por ser el tutor de las prácticas que realicé, y a todo el equipo del IRNAS, sin ellos no habría sido posible la realización de este trabajo.

Además, dar las gracias al IRNAS y la ETSIA por permitirme realizar este Trabajo, permitiéndome utilizar los recursos, equipos y formar parte de ese maravilloso grupo de investigación que he tenido el honor de conocer y aprender de ellos.

Por último y no por ello menos importante, a mi familia y a mi pareja sin ellos hubiese sido imposible llegar hasta aquí, mil gracias por todo el apoyo y cariño recibido.



## **RESUMEN**

En el presente Trabajo Fin de Grado se pretende desarrollar una técnica de recuperación de suelos contaminados por herbicidas debido a su impacto medioambiental, basada en el uso de cepas bacterianas degradadoras específicas, soluciones de nutrientes esenciales y ciclodextrinas. Estas últimas forman complejos de inclusión con el herbicida provocando un aumento en su solubilidad, y por lo tanto mejorando la disponibilidad para ser degradados. Dichas aplicaciones son técnicas conocidas con el nombre de bioaumentación (aplicación de organismos degradadores) y bioestimulación (mejora de las condiciones para favorecer la degradación). El herbicida seleccionado es Clortolurón, perteneciente a la familia química de las fenilureas. Los objetivos que se persiguen en el presente Trabajo son los siguientes:

- Estimar la potencial capacidad de Clortolurón para ser retenido en suelo, a través de la realización de isotermas de adsorción-desorción.
- Monitorizar diferentes tratamientos de biorrecuperación de un suelo contaminado artificialmente con el herbicida.
- Estudiar la actividad enzimática deshidrogenasa de los microorganismos del suelo para obtener información sobre cómo se comporta la flora microbiana del mismo en las diferentes etapas del experimento de biorrecuperación.

De los resultados obtenidos en los estudios de adsorción-desorción de Clortolurón en el suelo se concluye que las desorciones de Clortolurón con solución de ciclodextrina resultaron ser siempre más efectivas, poniendo de manifiesto la capacidad de extracción de la ciclodextrina.

La atenuación natural del herbicida Clortolurón en el suelo no resultó posible, lo que podría indicar que el suelo no posee una flora microbiana adecuada para su degradación.

La degradación del herbicida Clortolurón mediante el empleo de un consorcio bacteriano degradador específico, dio lugar a una biodegradación del 100% del herbicida cuando se aplicó la dosis de bacterias de mayor concentración. Sin embargo, la biodegradación solo fue del 50% cuando se aplicó una dosis de bacterias a menor concentración. En este caso la adición de ciclodextrina presentó mejores porcentajes de biodegradación.

Con respecto al estudio de la actividad deshidrogenasa del suelo a lo largo del tiempo de biorrecuperación se observa como la aplicación del consorcio bacteriano a la concentración alta ejerce un efecto positivo en la actividad deshidrogenasa del suelo, algo que no ocurre a la dosis más baja. Con el paso del tiempo, los valores de actividad deshidrogenasa se van igualando en los distintos tratamientos.

# ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN .....	1
1.1.- SUELO CONTAMINADO.....	1
1.2.- PLAGUICIDAS .....	2
1.2.1.- Herbicidas .....	4
1.2.1.1.- Clortolurón .....	6
1.3.-COMPORTAMIENTO DE LOS HERBICIDAS EN SUELO .....	7
1.4.- ADSORCIÓN DESORCIÓN DE HERBICIDAS EN SUELO .....	8
1.5.- ACTIVIDAD MICROBIANA DEL SUELO .....	10
1.6.- BIODEGRADACIÓN DE HERBICIDAS .....	11
1.7.- CICLODEXTRINAS .....	13
2.- OBJETIVOS .....	15
3.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
3.1.- MATERIALES .....	17
3.1.1.- Suelo.....	17
3.1.2.- Herbicida .....	17
3.1.3.- Ciclodextrina .....	17
3.1.4.- Consorcio bacteriano.....	18
3.1.5.- Medios de cultivo .....	18
3.1.6.- Solución de nutrientes (SN <sub>s</sub> ) .....	19
3.2.- MÉTODOS .....	20
3.2.1.- Determinaciones analíticas para la caracterización del suelo .....	20
3.2.2.- Análisis del herbicida Clortolurón .....	21
3.2.3.- Estudios de adsorción-desorción.....	22
3.2.4.- Estudios de biodegradación de Clortolurón en suelo .....	23
3.2.5.- Modelización de los resultados de biodegradación.....	27

3.2.6.- Estudio de la actividad de la enzima deshidrogenasa de los microorganismos del suelo .....	29
4.- RESULTADOS .....	31
4.1.- ISOTERMAS DE ADSORCIÓN-DESORCIÓN DE CLORTOLURÓN EN SUELO .....	31
4.1.1.- Isoterma de adsorción de Clortolurón en suelo .....	32
4.1.2.- Isotermas de desorción de Clortolurón en suelo .....	33
4.2.- BIODEGRADACIÓN DE CLORTOLURÓN EN SUELO .....	35
4.3.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DESHIDROGENASA .....	39
5.-CONCLUSIONES .....	45
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXO I: ESTUDIO ESTADÍSTICO .....	55



## **1.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1.- SUELO CONTAMINADO**

Comenzamos definiendo suelo, desde el punto de vista medioambiental, «como la fina capa superior de la corteza terrestre (litosfera), situada entre el lecho rocoso y la superficie. Está compuesto por partículas minerales, materia orgánica, agua, aire y organismos vivos». (Sabroso y Pastor, 2004).

El suelo, como resultado de la interacción con su entorno, tiende a alcanzar un equilibrio natural, que se ve modificado cuando alguno de los componentes de su entorno varía. Pero es la intervención del hombre, lo que de forma más violenta puede modificar un suelo y degradarlo. Por tanto, la degradación o modificación del mismo, es consecuencia directa de su utilización debida a cualquiera de sus usos: agrícola, ganadero, forestal, industrial, transporte, etc. (Aguilar *et al.*, 1999).

Llegados a este punto, hablaremos de la degradación desde un punto de vista agronómico, con lo cual, cabría diferenciar entre dos tipos principales de degradación: una física ligada fundamentalmente a la erosión del suelo por factores abióticos, y una degradación química, la cual será responsable del interés del presente trabajo. Dentro de este tipo de degradación, un tipo especial es la producida por la presencia de sustancias químicas perjudiciales, y en este caso se la denomina contaminación. Un contaminante es una sustancia o elemento tóxico, que ya sea debido a que se encuentre situado fuera de lugar, o por su concentración mayor a las normales, genera un efecto negativo sobre algún organismo. Por su origen, podemos distinguir entre contaminantes de origen natural de los antropogénicos. Dichos conceptos pueden diferir según los intereses o puntos de vista. Por ejemplo, el uso de plaguicidas puede ser un elemento fundamental e indispensable en el entorno agrícola teniendo en cuenta que estos traten de ejercer solamente los efectos para los cuales son suministrados, y se minimizasen al máximo los efectos contaminantes. Pero es ya sabido que el uso generalizado e indiscriminado de estas sustancias está generando serios problemas de contaminación (Aguilar *et al.*, 1999).

En cuanto a normativa, no existe una normativa a nivel europeo, pero a nivel español los suelos contaminados se regulan en la Ley 22/2011, de 28 de julio, de Residuos y suelos contaminados, así como en el Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se



establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.

En Andalucía, la Ley 7/2007, de 9 de julio, de Gestión Integrada de la Calidad Ambiental, incluye distintas disposiciones sobre suelos contaminados en el Capítulo IV del Título IV. Dicha ley ha sido desarrollada por el Decreto 18/2015, de 27 de enero, por el que se aprueba el Reglamento que regula el régimen aplicable a los suelos contaminados, norma de referencia para la gestión de los suelos contaminados, así como a las actividades potencialmente contaminantes de los suelos en Andalucía.

En nuestro estudio, se observa el caso de la contaminación producida en un suelo por plaguicidas de ahí que, a continuación, introduzcamos el concepto de plaguicida y la importancia de los mismos en este estudio.

## **1.2.- PLAGUICIDAS**

El artículo 2º del *Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas* (FAO, 1990) define los plaguicidas como «cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte».

Los plaguicidas se pueden clasificar de manera diversa, nosotros los clasificaremos atendiendo a la clasificación realizada por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, que se basa en el tipo de organismo que desean controlar.

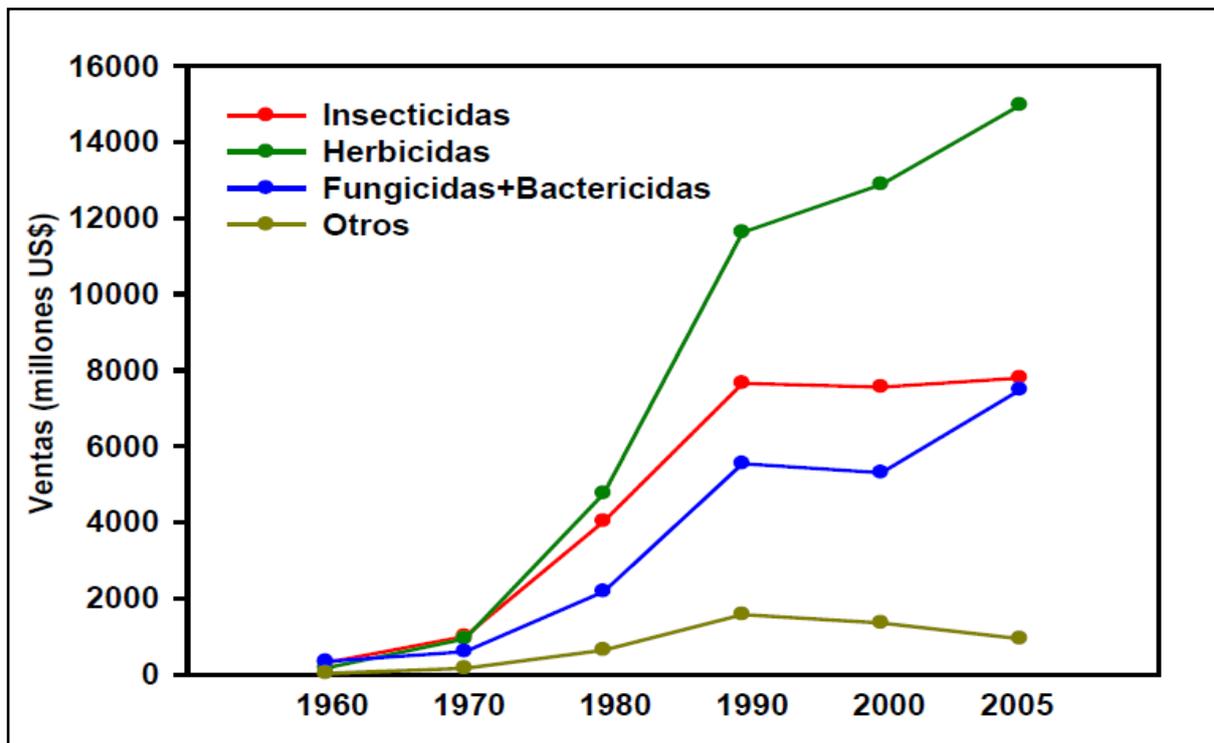
Esta se divide en cuatro grandes grupos:

- **Insecticidas y acaricidas:** destinados al control de insectos y ácaros.
- **Fungicidas y Bactericidas:** destinados al control de hongos y bacterias.

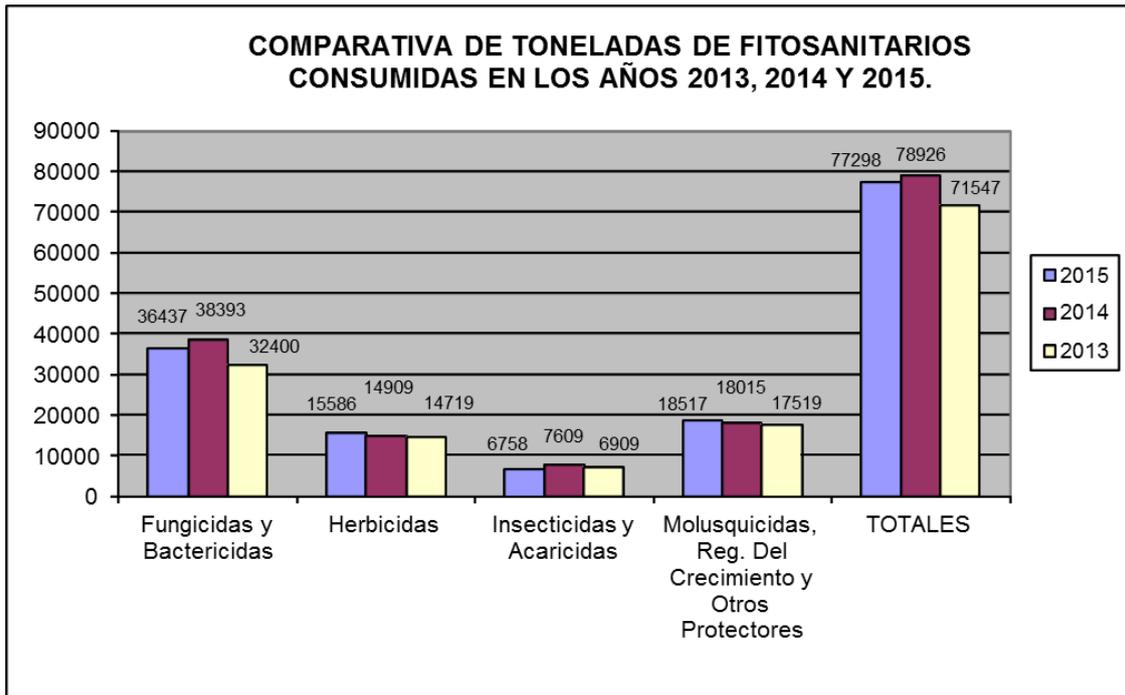


- **Herbicidas:** destinados al control de plantas.
- **Molusquicidas, Reguladores de crecimiento y otros:** destinados al control de moluscos y multitud de usos, empleados principalmente en fruticultura y otros ámbitos. Normalmente las sustancias utilizadas como reguladores de crecimiento son fitohormonas.

El consumo de estas sustancias va en aumento, como se muestra en las siguientes figuras, en la cuales se expresan las ventas en millones de dólares de cuatro grandes grupos de plaguicidas a nivel mundial (figura 1) y comparativa de toneladas consumidas de fitosanitarios durante los años 2013, 2014 y 2015 (figura 2).



**Figura 1.** Ventas en millones de dólares de cuatro grandes grupos de plaguicidas a nivel mundial. Elaborado por March, G. 2014.



**Figura 2.** Comparativa de toneladas de fitosanitarios consumidas en los años 2013, 2014 y 2015. Elaborado por Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente a través de la Estadística sobre Comercialización de Productos Fitosanitarios.

A partir de las figuras anteriores, se puede observar como la tendencia del consumo, producción y beneficio económico va en aumento, esto también es debido en cierto modo al aumento demográfico, que exige mayores producciones y que genera una agricultura dependiente de este tipo de aportes. Por lo tanto, se puede decir que la contaminación también aumenta como consecuencia directa de la aplicación de estos productos. En el presente trabajo nos centraremos en el grupo de los herbicidas por ser uno de los grupos de fitosanitarios más empleados, además, muchos se aplican directamente al suelo, y existen altos niveles de contaminación debido a este tipo de plaguicidas tanto a nivel de suelo como agua.

### 1.2.1.- Herbicidas

Comenzaremos definiendo el concepto de herbicida, etimológicamente, del latín herba `hierba` -cida `exterminador` o `matador`. Dicho de un producto químico que destruye plantas herbáceas. (RAE, 2017a).

Dentro del grupo de los herbicidas existen numerosas categorías de sustancias químicas comercializadas como herbicidas. A continuación, se expone una tabla que expresa en



toneladas las principales categorías de sustancias químicas comercializadas como herbicidas.

**Tabla 1.** Principales grupos de sustancias químicas comercializadas como herbicidas en el año 2015, expresadas en toneladas. Estadística de Comercialización de Productos Fitosanitarios. Elaborada por Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

Sustancias químicas comercializadas como herbicidas	Cantidad comercializada en Toneladas métricas
Fenoxifitohormonas	1470
Triazinas y Triazinonas	354
Amidas y Anilidas	1172
Carbamatos y Bicarbamatos	34
Urea y Uracilo	802
Otros y no clasificados	11754
Total	15586

La mayoría de los grupos de herbicidas afectan, bien a la fotosíntesis o a la división celular y el crecimiento. En este caso el herbicida empleado en la presente memoria, Clortolurón, pertenece al grupo de las ureas, concretamente a la familia de las fenilureas, con modo de acción C2, grupo de herbicida que actúa como inhibidor del fotosistema II (FSII). Alrededor del 35% de todos los herbicidas disponibles comercialmente interfieren con la fotosíntesis, que es el proceso involucrado en la conversión de energía luminosa en energía química, para así producir la liberación de oxígeno y la transformación del CO<sub>2</sub> en azúcares.

Herbicidas inhibidores del Fotosistema 2 (FSII). Estos bloquean el transporte de electrones mediante la interacción con un polipéptido en la membrana de los cloroplastos. La especificidad de este sitio de acción requiere del elemento estructural



para la acción inhibitoria y éstos se encuentran en la mayoría de los herbicidas de este grupo.

Cuando la clorofila absorbe la energía luminosa para activar el flujo de electrones desde el agua, ésta se excita hasta un denominado "estado de singlete" (<sup>1</sup>C1). Si la energía de

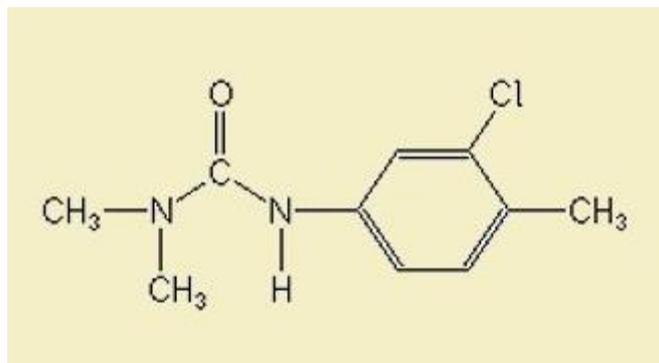


excitación no es utilizada porque el flujo de electrones está detenido, puede excitar al oxígeno a un "estado de singlete" ( $^1O_2$ ). Esta forma altamente dañina de oxígeno puede interactuar con los lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas celulares para causar la desorganización celular y, como consecuencia, la muerte de la planta. Esto se refleja en la aparición de síntomas fitotóxicos, como la clorosis y la necrosis (FAO, 2017).

### 1.2.1.1.- Clortolurón

Clortolurón es un herbicida de la familia de las fenilureas comúnmente usado y que está autorizado su uso en la Unión Europea. Su uso en España está autorizado en tres cultivos, trigo, cebada y triticale. Por lo general, suministrado como un concentrado soluble o gránulos humectables que son mezclados con agua y aplicados en forma de lluvia fina. Es un herbicida de contacto y residual, utilizado para controlar plantas tanto de hoja ancha como gramíneas. Es moderadamente soluble en agua, volátil con un alto potencial para lixiviar hacia los acuíferos. Es moderadamente persistente en suelo, pero tiende a no ser persistente debido a su rápida fotólisis acuosa. Tiene una baja toxicidad para los mamíferos, pero puede bioacumularse. Aunque no es tóxico para las abejas, es moderadamente tóxico para los pájaros, lombrices y la mayoría de los organismos acuáticos.

Es una sustancia de origen sintético cuya fórmula química es  $C_{10}H_{13}ClN_2O$ , su nombre según IUPAC es 3-(3-chloro-p-tolyl)-1,1-dimethylurea, tiene una masa molecular de 212,68 (g/mol). En su estado físico es un sólido cristalino incoloro. En la figura 3 queda representada la estructura química de este herbicida.



**Figura 3.** Estructura química de Clortolurón. Elaborado por IUPAC.

La solubilidad en agua a 20 (°C) es de 74 (mg/l), su punto de fusión es de 148,1 (°C), peso específico 1,34 (g/ml), su  $\lg k_{ow}$  es 2,41 y no presenta pKa. La degradación en

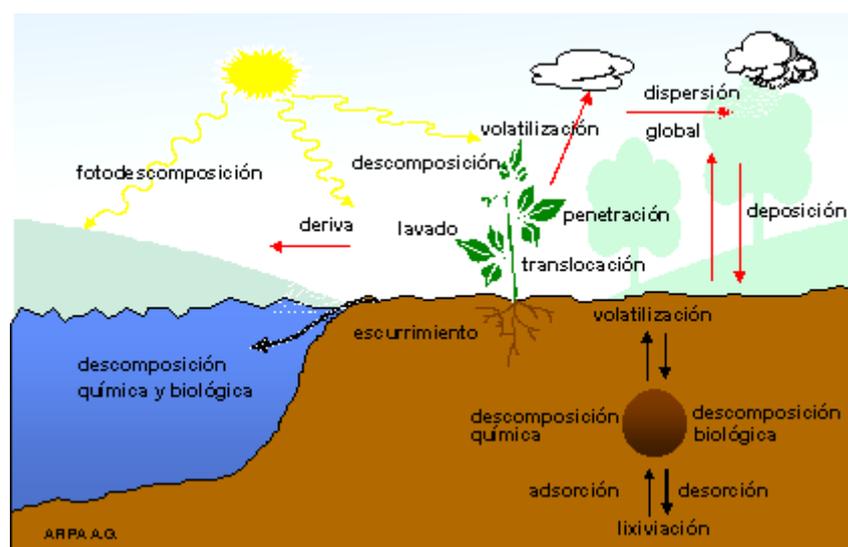


suelo aeróbica,  $DT_{50}$  (normal) es de 45 días,  $DT_{50}$  (laboratorio a 20 °C) es de 59 días,  $DT_{50}$  (campo) es de 34 días,  $DT_{90}$  (laboratorio a 20 °C) es de 173 días,  $DT_{90}$  (campo) es de 196 días, en la Unión Europea en estudios de laboratorio el  $DT_{50}$  oscila entre 52 – 66 días,  $DT_{90}$  oscila entre 42 – 304 días. En campo el  $DT_{50}$  oscila entre 26 – 42 días,  $DT_{90}$  oscila entre 173 – 218 días.

### **1.3.-COMPORTAMIENTO DE LOS HERBICIDAS EN SUELO**

El origen del herbicida en el suelo, suele deberse a aplicaciones del mismo, que normalmente son aplicaciones foliares en el caso de los herbicidas de contacto donde aproximadamente el 50% de la aplicación cae al suelo. En el caso de los herbicidas residuales que se incorporan directamente al suelo las concentraciones suelen ser mayores.

Cuando se aplica un herbicida éste se distribuye por las diferentes fases del ambiente como se muestra en la figura 4. Centrándonos en la distribución del herbicida en el suelo, su persistencia o lixiviación dependerá tanto de las propiedades del herbicida como las del suelo. Por ello, es fundamental el conocimiento de ambas propiedades que determinarán el comportamiento del herbicida en el suelo. Fundamentalmente, las interacciones tienen lugar entre las moléculas del herbicida y las fracciones coloidales del suelo, siendo estas interacciones influenciadas por la humedad, el pH, la temperatura, el contenido en arcillas y el contenido en materia orgánica (Rubio-Bellido *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Comportamiento de los herbicidas en las diferentes fases del ambiente.



El comportamiento de los herbicidas en suelos puede clasificarse en dos grupos: procesos de transferencia, tales como procesos de adsorción-desorción en el suelo, absorción, exudación y retención por las plantas, lixiviación, etc. Y procesos de transformación, tales como la degradación química y microbiológica (Rubio-Bellido *et al.*, 2016).

En cuanto a los procesos de transferencia, nos centraremos en los procesos de adsorción-desorción, los cuales son clave en los procesos que controlan el destino del herbicida en el suelo, limitando la disponibilidad del herbicida en el perfil del suelo y teniendo potencial para reducir su movilidad (Suddaby *et al.*, 2016). Por otro lado, en cuanto a los procesos de transformación nos centraremos en la degradación microbiológica, la cual es objeto fundamental de este estudio. Y se observará la actividad biológica de los microorganismos del suelo, mediante un análisis de la actividad enzimática para ver qué ocurre en este proceso de degradación microbiológica. A continuación, se desarrollarán estos tres pilares fundamentales del estudio más ampliamente.

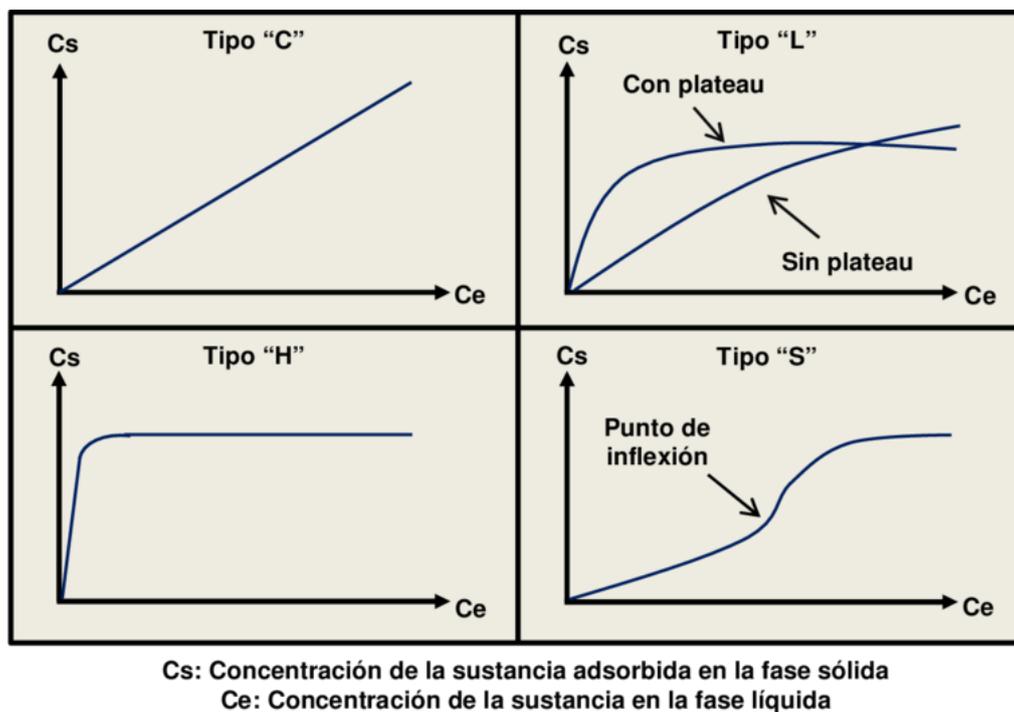
#### **1.4.- ADSORCIÓN DESORCIÓN DE HERBICIDAS EN SUELO**

Estos son unos de los procesos más importantes debido a que condicionan los demás procesos que ocurren en el suelo. Además, pueden informarnos de la eficacia que tendrá la aplicación del herbicida. De este modo, se obtiene su potencial de lixiviación que nos permite saber si es posible la contaminación de aguas subterráneas (Wauchope *et al.*, 2002). La adsorción puede definirse como el paso de un soluto desde una fase líquida o gaseosa a la superficie de una fase sólida sin producir cambios en esta última (Osgerby, 1970). El sistema suelo es un sistema muy complejo en el cual se encuentran tres fases principales: fase sólida, líquida y gaseosa. Dentro de éstas, podemos distinguir a grosso modo partículas minerales, partículas coloidales, sustancias orgánicas de distinta naturaleza, la solución del suelo y gases como CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> (Rubio-Bellido *et al.*, 2014). Las interacciones entre el adsorbente y el adsorbato pueden ser interacciones físicas y/o químicas como pueden ser el intercambio iónico, los enlaces por puentes de hidrógeno, cambio de ligando, enlace por transferencia de carga, fuerzas de Van de Waals e interacciones hidrofóbicas (García y Dorronsoro, 2017). En estos procesos de adsorción pueden intervenir varios tipos de interacciones siendo el resultado final la suma de estas.



En estos procesos las propiedades del herbicida determinarán por cuales procesos se rigen estas adsorciones. Los herbicidas iónicos son adsorbidos principalmente por los coloides del suelo. Mientras que los catiónicos se adsorben por reacciones de intercambio catiónico, las especies aniónicas son repelidas por las cargas negativas de los coloides del suelo y atraídas hacia los cargados positivamente (Rubio-Bellido *et al.*, 2014).

Los distintos mecanismos de adsorción generan diferentes tipos de isothermas de adsorción (Calvet, 1989). Las isothermas de adsorción se obtienen representando la cantidad de herbicida adsorbido frente a la concentración que queda en solución a una temperatura constante. Generalmente se pueden establecer cuatro tipos de isothermas, que implican una afinidad distinta del adsorbato por el adsorbente, como se muestra en la siguiente figura 5.



**Figura 5.** Tipos de isothermas de adsorción. Elaborado por Giles *et al.*, 1974.

El proceso contrario a la adsorción es la desorción, que puede ser total (adsorción reversible) o parcial (adsorción parcialmente reversible). Las diferencias entre la isothermas de adsorción y desorción obtenidas para un mismo soluto se denomina histéresis (Morillo *et al.*, 2004).

La ecuación de Freundlich es una ecuación empírica que será usada para describir tanto la adsorción como la desorción del herbicida en suelo:



$$C_s = K_f * C_e^n \quad (1)$$

Donde  $C_s$  es la cantidad de herbicida adsorbido por el suelo;  $K_f$  es una constante que refleja la capacidad de adsorción;  $C_e$  es la concentración del herbicida en la solución, y  $n$  es una constante relacionada con la pendiente que presenta la isoterma. El fenómeno de histéresis se puede describir mediante el factor  $H$ , que es el cociente entre los valores de  $n$  obtenidos de las isotermas de adsorción y desorción.

$$H = \frac{n_{\text{adsorción}}}{n_{\text{desorción}}} = \frac{n_a}{n_d} \quad (2)$$

La adsorción es reversible cuanto más semejantes sean las constantes  $n_a$  y  $n_d$ , y más irreversible cuando  $n_a$  sea mucho mayor que  $n_d$ . Pudiendo hablarse de la inexistencia de histéresis cuando  $\frac{n_a}{n_d} = 1$ , histéresis positiva cuando  $\frac{n_a}{n_d} > 1$  y de histéresis negativa cuando la relación  $\frac{n_a}{n_d} < 1$ .

## 1.5.- ACTIVIDAD MICROBIANA DEL SUELO

El suelo es un sistema vivo, donde la actividad bioquímica se desarrolla por medio de procesos enzimáticos. La mayoría de estas enzimas provienen de la descomposición microbiana de tejidos vegetales y animales que son incorporados como residuos orgánicos. Normalmente, la actividad enzimática del suelo es considerada un indicador para medir la calidad del suelo (Kennedy y Smith, 1995). Pero en el caso de este estudio, será utilizada para ver el comportamiento de los microorganismos del suelo en las distintas fases del experimento y en los diferentes tratamientos, sin centrarnos demasiado en cómo afecta esto a la calidad del suelo. Estas actividades enzimáticas son indicadores tempranos de degradación en el suelo más que los parámetros físicos o químicos (Tejada, 2009).

Las enzimas son un tipo especial de proteínas que al combinarse con un sustrato específico actúan para catalizar una reacción bioquímica (Henríquez *et al.*, 2014). Las enzimas del suelo pueden dividirse en dos grupos: las extracelulares y las intracelulares. Las primeras son liberadas durante el metabolismo y muerte celular. Mientras que las intracelulares forman parte de la biomasa microbiana, siendo estas últimas de interés en este trabajo. A continuación, desarrollaremos con más detalle la actividad enzimática estudiada.



### Actividad enzimática deshidrogenasa

La actividad enzimática deshidrogenasa nos permite tener una idea general de los procesos microbianos que ocurren en el suelo, ya que se encuentran solamente presentes en sistemas vivos y es considerada un buen indicador de las actividades oxidativas del suelo (Skujins, 1973). También, se ha encontrado una buena correlación entre esta actividad y la respiración del suelo, pero esto no implica que constituya una estimación del número de microorganismos (Casida, 1964).

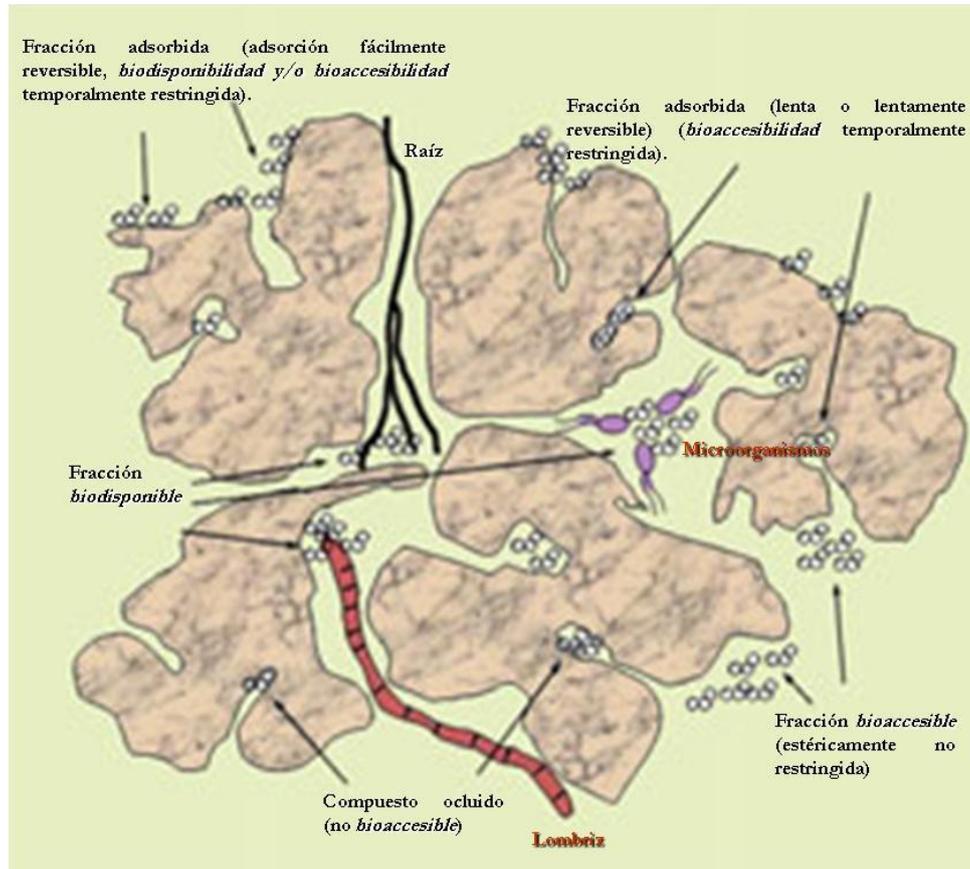
## **1.6.- BIODEGRADACIÓN DE HERBICIDAS**

Como biodegradación se entiende el proceso de descomposición o transformación de una sustancia mediante la acción de organismos vivos (RAE, 2017b). En este proceso los contaminantes son biotransformados por que los microorganismos son capaces de utilizarlos para su propio beneficio utilizándolos como fuente de energía (Rubio-Bellido *et al.*, 2014). La capacidad degradadora de un organismo depende del desarrollo de un sistema metabólico que le permita asimilar el herbicida, pero para ello, este ha de enfrentarse a otra serie de condicionantes que limitan su actividad, como pueden ser las condiciones físicas debidas principalmente a factores ambientales, como el pH, la temperatura, concentración de minerales, humedad del suelo respiración y nutrientes disponibles. O condiciones químicas como puede ser la estructura molecular del herbicida, la solubilidad, su concentración y la presencia de una población potencialmente activa (Gómez *et al.*, 2008). De estas condiciones dependerán factores tan importantes como la biodisponibilidad que se podría definir como la cantidad de contaminante que puede ser asimilado y degradado por el microorganismo. O como la bioaccesibilidad que se podría definir como la disponibilidad de una sustancia para ser asimilada por el microorganismo. De estos condicionantes se puede obtener una idea de la importancia que tienen los anteriores estudios mencionados en la recuperación de suelos contaminados.

La biodisponibilidad de un compuesto o elemento está determinada principalmente por su solubilidad en líquidos y por la capacidad de adsorción a sustancias sólidas o a volatilizarse, debido a que las sustancias volátiles o fuertemente adsorbidas no se encuentran disponibles, lo cual reduce su potencial de toxicidad. La adsorción en componentes coloidales del suelo, tales como las arcillas y la materia orgánica, limita la bioaccesibilidad, entendiéndose tal como la falta de disponibilidad del contaminante



para el microorganismo por no encontrarse en una fase accesible para el mismo. A continuación, se muestra la figura 6 donde se explican algunos conceptos de forma esquemática.



**Figura 6.** Esquema del concepto biodisponibilidad y bioaccesibilidad de un contaminante en el suelo. Elaborado por Rubio-Bellido, 2014.

Para aumentar la degradación microbiana en un suelo, se pueden utilizar estrategias como la bioestimulación, que sería la mejora de las condiciones del medio para favorecer la biodegradación a partir de los microorganismos nativos del suelo, u otras como el bioaumentación, basado en la inoculación de cepas o consorcios microbianos que son degradadores específicos del contaminante (Gómez, 2008).

Por último, se comentará sobre sustancias que mejoran estos factores de biodisponibilidad y bioaccesibilidad. En general, son sustancias que mejoran la solubilización de los compuestos en la solución del suelo permitiendo de este modo que los contaminantes se encuentren más disponibles para los organismos degradadores. En este estudio nos centraremos en explicar el caso de las ciclodextrinas.

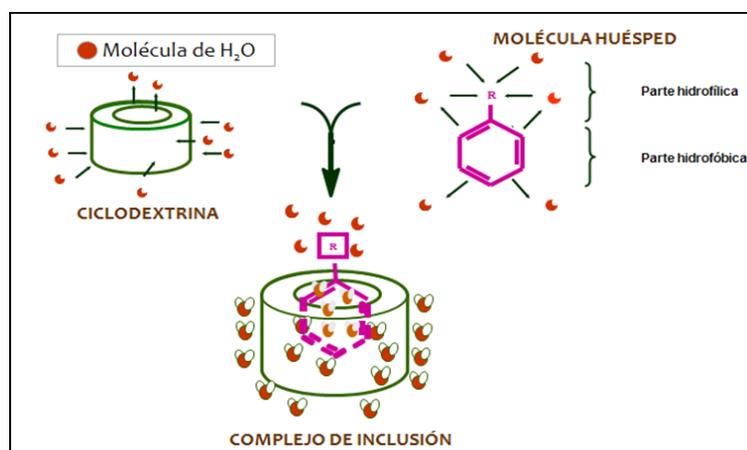


## 1.7.- CICLODEXTRINAS

Las ciclodextrinas se pueden definir como oligosacáridos cíclicos constituidos por un número variable de unidades de glucosa. Estas moléculas son capaces de formar complejos de inclusión con numerosos productos, debido a su conformación toroidal, que delimita una cavidad relativamente apolar, mientras que el exterior presenta una naturaleza hidrofílica, pudiendo formar complejos de inclusión tanto en medio líquido como en medio sólido y solubilizar moléculas hidrofóbicas de tamaño compatible con su cavidad (Morillo *et al.*, 2012). Las ciclodextrinas son compuestos naturales, no tóxicos e inocuos para los microorganismos, de ahí que tengan multitud de usos en aplicaciones farmacológicas.

La formación de los complejos de inclusión con ciclodextrinas se divide en cinco etapas, que se presentan en la figura 7 y se describen a continuación.

1. Ruptura de las moléculas de agua del interior de la cavidad de la ciclodextrina con salida de algunas moléculas de agua fuera del anillo.
2. Desorden de la estructura del agua alrededor de la molécula que va a ser incluida y transporte de algunas moléculas de agua hacia la solución.
3. Interacción de la molécula del sustrato o de algunos de sus sustituyentes con grupos del borde o del interior de la cavidad de la ciclodextrina.
4. Formación de posibles puentes de hidrógeno entre el sustrato y la ciclodextrina.
5. Restablecimiento de la estructura del agua alrededor de la parte exterior de la molécula de ciclodextrina después de la inclusión.



**Figura 7.** Esquema de la formación de complejo de inclusión entre un compuesto orgánico y ciclodextrina. Elaborado por Rubio, 2014.





## **2.- OBJETIVOS**

En el presente Trabajo Fin de Grado se pretende desarrollar una técnica de recuperación de suelos contaminados por herbicidas organoclorados debido a su impacto medioambiental, basada en el uso de cepas bacterianas degradadoras específicas, soluciones de nutrientes esenciales y ciclodextrinas.

Se ha seleccionado un herbicida organoclorado que se detecta frecuentemente en suelos debido a su carácter hidrofóbico y por lo tanto potencialmente persistente en el mismo, además de por sus propiedades tóxicas. El herbicida seleccionado es Clortolurón, perteneciente a la familia química de las fenilureas.

La capacidad de las ciclodextrinas para formar complejos de inclusión con compuestos hidrofóbicos provoca un aumento en su hidrosolubilidad, incrementando la concentración de estos en la solución del suelo y por lo tanto su biodisponibilidad para ser degradados por los microorganismos.

Los objetivos específicos que se persiguen en el presente Trabajo son los siguientes:

- Estimar la potencial capacidad de Clortolurón para ser retenido en suelo, a través de la realización de isotermas de adsorción-desorción.
- Monitorizar diferentes tratamientos de biorrecuperación de un suelo contaminado artificialmente con el herbicida Clortolurón basados en la atenuación natural asistida a través de procesos de bioestímulo, mediante la adición de solución de nutrientes, así como usando soluciones de agentes complejantes como son las ciclodextrinas (CDs) que incrementen la solubilidad del contaminante y por tanto su biodisponibilidad, y procesos de bioaumento, con la adición de bacterias o consorcios bacterianos degradadores específicos de fenilureas.
- Estudiar la actividad enzimática deshidrogenasa de los microorganismos del suelo para obtener información sobre cómo se comporta la flora microbiana del mismo en las diferentes etapas del experimento de biorrecuperación.



**RECUPERACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO POR EL HERBICIDA CLORTOLURÓN APLICANDO UN CONSORCIO BACTERIANO DEGRADADOR ESPECÍFICO Y CICLODEXTRINAS.**

*Objetivos*



### 3.- MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.- MATERIALES

##### 3.1.1.- Suelo

Para la realización de este estudio, se utilizó un suelo procedente del corredor verde del Guadamar, situado en el término municipal de Sanlúcar la Mayor, Sevilla (37° 27' 58.8''N 6° 12' 44.5'' W). En este estudio se nombrará este suelo como CV. Dicho suelo fue contaminado por el desastre que se produjo tras el vertido de aguas ácidas ricas en metales, causado por la rotura de la presa de la balsa de decantación de las minas de Aznalcóllar el 25 de abril de 1998. A partir de aquí, este suelo contaminado fue sometido a un programa de recuperación, en el cual se aplicaron fundamentalmente técnicas de remoción, junto con la aplicación de métodos de estabilización con enmiendas y finalmente métodos de fito-recuperación. La muestra de suelo fue tomada en febrero del año 2017 del horizonte superficial (0-20 cm). A continuación, se muestra en la tabla 2 las propiedades físico-químicas analizadas.

**Tabla 2.** Propiedades físico-químicas del suelo estudiado.

Suelo	pH	CaCO <sub>3</sub> (%)	MO (%)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Clasificación Textural
CV	7,46	3,9	3,04	64,8	23,8	11,4	Franco arenoso

##### 3.1.2.- Herbicida

Se ha utilizado Clortolurón (CL) en polvo con una pureza mayor del 98%, suministrado por Sigma Aldrich (Madrid, España).

##### 3.1.3.- Ciclodextrina

Se aplicó un tipo de ciclodextrina de origen sintético, concretamente 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPBCD), con una pureza superior al 97%. La ciclodextrina empleada fue suministrada por Cyclolab (Budapest, Hungría). En la tabla 3, se muestra la solubilidad en agua (g/l) y el peso molecular de la ciclodextrina empleada.

**Tabla 3.** Solubilidad acuosa (g/l) y peso molecular de HPBCD.

Ciclodextrina	HPBCD
Solubilidad en agua (g/l)	> 330
Peso molecular	1303,3



### 3.1.4.- Consorcio bacteriano

El consorcio bacteriano utilizado en el presente trabajo consta de tres cepas bacterianas (también denominadas triada a lo largo del trabajo), cuya concentración total será de  $10^8$  y  $10^9$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC), obtenidas a partir de la turbidez del medio utilizando el método McFarland. Este consorcio microbiano se emplea porque en estudios anteriores se vio que era efectivo para la biodegradación y mineralización de Diurón, otro herbicida perteneciente a la familia de las sulfonilureas (Villaverde *et al.*, 2017).

Las cepas bacterianas utilizadas son las siguientes:

- *Advenella kashmirensis*, previamente aislada e identificada en un suelo contaminado por derivados del petróleo, hidrocarburos clorados y ftalatos (Sopeña *et al.*, 2014). La morfología de esta bacteria fue descrita por Ghosh *et al.* (2005, 2013) y Coenye *et al.* (2005). No contiene flagelos, aparece sola, en parejas, en cadenas, en cadenas ramificadas o en grupos. Es Gram negativa, ovalada en forma de coco.
- *Acthrobacter sulfonivorans*, capaz de crecer con Diurón como única fuente de carbono, fue caracterizada por Widehem *et al.* (2002) y adquirida de la colección del Instituto Pasteur (Paris, Francia). Su código en esta colección es CIP 105365. Esta bacteria es Gram positiva y esférica. Forman grupos o cadenas en solución, son móviles y no presentan esporas (Borodina *et al.*, 2002).
- *Variovorax soli*, proporcionada por el Doctor Sebastian Sorensen, del Instituto “Geological Suvey of Denmark and Greenland” (GEUS, Copenhague, Dinamarca). Esta bacteria es capaz de mineralizar Diurón y otros herbicidas del grupo de las fenilureas, utilizándolos como única fuente de carbono (Sorensen *et al.*, 2008). Según Kim *et al.* (2006) esta bacteria es Gram negativa, bacilo móvil y no presenta esporas.

### 3.1.5.- Medios de cultivo

Los medios de cultivos empleados en los experimentos con la triada son los denominados: MSM, LB y R2A se describen a continuación, y su composición aparece en la tabla 4.

- MSM: Mineral Salts Medium. Resultado de la mezcla de las siguientes disoluciones:



- Disolución I: 2,0 (g) de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  más 4,0 (g) de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 500 (ml) de agua destilada.
- Disolución II: 1,6 (g) de  $(\text{NaH}_4)_2\text{SO}_4$  más 0,8 (g) de  $(\text{NaH}_4)_2\text{SO}_4$  en 500 (ml) de agua destilada.
- El pH se ajustó con NaOH a 7,5.
- LB: Luria-Bertani medium. Medio 381 de la lista de medios para microorganismos (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures).
- R2A: Medio 830 de la lista de medios para microorganismos (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures).

**Tabla 4.** Composición (g/l) de los medios de cultivo utilizados en este trabajo.

Componentes	MSM	LB	R2A
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,0		
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	4,0		
$(\text{NaH}_4)_2\text{SO}_4$	0,8		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,6		0,5
NaCl		10,0	
Triptona		10,0	
Extracto de levadura		5,0	0,5
Peptona			0,5
Casaminoácidos			0,5
Glucosa			0,5
Almidón			0,5
$\text{K}_2\text{HPO}_4$			0,5
Piruvato sódico			0,5

### 3.1.6.- Solución de nutrientes ( $\text{SN}_5$ )

Para activar tanto a la flora endógena del suelo como a las tres cepas bacterianas presentadas en el anterior apartado, se aplicó al suelo una solución de nutrientes con la composición que se muestra en la tabla 5.



**Tabla 5.** Solución de nutrientes  $SN_5$ .

Nutrientes que contiene la solución nutritiva ( $SN_5$ )	$\mu\text{g/ml}$
Ca $SO_4 \cdot 2 H_2O$	10,0
Zn $SO_4 \cdot 7 H_2O$	12,5
Al <sub>2</sub> ( $SO_4$ ) <sub>3</sub> $\cdot 18 H_2O$	12,5
Ni $Cl_2 \cdot 6 H_2O$	12,5
Co $Cl_2 \cdot 6 H_2O$	12,5
Sn $Cl_2 \cdot 2 H_2O$	25,0
Fe $SO_4 \cdot 7 H_2O$	37,5
Li Cl	2,50
K Br	3,75
K Cl	3,75
Mn $Cl_2 \cdot 4 H_2O$	75,0

### 3.2.- MÉTODOS

#### 3.2.1.- Determinaciones analíticas para la caracterización del suelo

Antes de proceder a las diferentes determinaciones, la muestra de suelo se dejó secar al aire durante 24 horas a temperatura ambiente, posteriormente, se separaron las piedras y se rompieron los agregados con un rodillo. La muestra así preparada, se pasó por un tamiz con luz de malla de 2 mm.

- **Determinación del carbono orgánico total y materia orgánica**

El método seguido ha sido el basado en la técnica descrita por Walkley y Black (1934), que consiste en la oxidación de la materia orgánica con dicromato potásico ( $K_2Cr_2O_7$ ) en presencia de ácido sulfúrico y posterior valoración del dicromato no reducido con sal de Mohr (valoración por retroceso).

Suponiendo que la materia orgánica contiene el 58 % de carbono, se ha utilizado 1,724 como factor de conversión de carbono orgánico total a materia orgánica, de acuerdo con Jackson (1982).

- **Determinación del pH**

Se siguió el método propuesto por Guitán y Carballas (1976), mediante la medida en pasta saturada de muestra en agua.

- **Determinación de la granulometría**

Se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Gee y Bauder (1986), usando hexametáfosfato sódico como agente dispersante.



- **Determinación de carbonatos**

El suelo se trata con HCl y el volumen de CO<sub>2</sub> desprendido es medido a través de un calcímetro Bernard. Los resultados se expresan en porcentaje de CaCO<sub>3</sub> equivalente en el suelo.

### 3.2.2.- Análisis del herbicida Clortolurón

La concentración del herbicida Clortolurón en solución se obtuvo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los cromatogramas se obtuvieron en un equipo de HPLC modular (Varian ProStar 410 HPLC) con un detector ultravioleta-visible, empleando una columna Kromasil C18 de fase reversa 15 x 0,40 (cm x cm) suministrada por Teknokroma (España), con un volumen de inyección de 100 µl y a una temperatura de horno de 30 °C. Para la adquisición y manejo de los datos se empleó el programa informático Galaxie Chromatography Data System. En la tabla 6, se detallan las condiciones empleadas en el análisis del herbicida y en la figura 8 se muestra el cromatógrafo empleado. Se preparó una curva de calibrado, que permitió pasar las áreas obtenidas en el cromatógrafo a unidades de concentración.

**Tabla 6.** Condiciones empleadas en el análisis del herbicida Clortolurón.

Herbicida	Fase móvil			Tiempo de retención	Longitud de onda (λ)
	Acetonitrilo	Agua Mili O	Flujo		
Clortolurón	60%	40%	1ml/min	5 min	230 nm



**Figura 8.** Equipo de HPLC modular (Varian ProStar 410).



### **3.2.3.- Estudios de adsorción-desorción**

Para medir la capacidad de adsorción del herbicida Clortolurón en el suelo seleccionado, se pesaron 10 g de suelo en tubos de centrífuga de 30 ml de capacidad. A continuación, se puso el suelo en contacto con 10 ml de soluciones de Clortolurón a 5 concentraciones diferentes (2, 5, 10, 15 y 20 mg/l), en una solución acuosa con  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0,01M y  $\text{HgCl}_2$  200 ppm para mantener la fuerza iónica constante y para detener cualquier actividad de los microorganismos del suelo que pueda degradar el herbicida. Los tubos se mantuvieron en agitación durante 72 horas a 120 rpm y 25 °C de temperatura. Todas las experiencias se realizaron por triplicado. Posteriormente las suspensiones fueron centrifugadas (10 minutos a 11000 rpm) y del sobrenadante se retiraron 5 ml, para medir la cantidad de Clortolurón no adsorbido.

Las isotermas de desorción se llevaron a cabo solo a 3 concentraciones (2, 10 y 20 mg/l), reemplazando los 5 ml del sobrenadante retirados, por 5 ml de solución de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0,01 M y  $\text{HgCl}_2$  200 ppm. Las suspensiones se dejaron equilibrar durante otras 24 horas más en las mismas condiciones anteriores. Este proceso se repitió hasta un total de tres veces. En cada paso de desorción, las suspensiones fueron centrifugadas (10 minutos a 11000 rpm) y se retiraron 5 ml de sobrenadante, en el que se midió el herbicida por HPLC con detector ultravioleta.

Las isotermas de desorción también se llevaron a cabo empleando una solución de ciclodextrina en lugar de la solución de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Para ello se reemplazó la mitad del sobrenadante de los tubos de centrífuga correspondientes a concentraciones iniciales del herbicida de 2, 10 y 20 mg/l una vez que el equilibrio de adsorción se había alcanzado, por 5 ml de una solución de HPBCD equivalente a 10 veces la concentración molar inicial del herbicida ( $8,1 \cdot 10^{-4}$  M). Las suspensiones se dejaron equilibrar durante otras 24 horas más en las mismas condiciones anteriores y posteriormente se volvió a retirar la mitad del sobrenadante en el que se determinó por HPLC la concentración de Clortolurón. Este proceso se repitió hasta un total de tres veces.

Las isotermas de adsorción y desorción se obtuvieron representando la cantidad adsorbida, expresada en  $\mu\text{mol}$  de Clortolurón adsorbido por kg de suelo ( $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ), frente a las correspondientes concentraciones del herbicida en equilibrio ( $\mu\text{mol}/\text{l}$ ). Las isotermas de adsorción han sido ajustadas a la forma logarítmica de la ecuación de Freundlich:



$$\log C_s = \log k_f + n \log C_e \quad (3)$$

donde:

- $C_s$  ( $\mu\text{mol/kg}$ ): cantidad de herbicida adsorbido por kilogramo de suelo.
- $C_e$  ( $\mu\text{mol/l}$ ): concentración de herbicida en la solución de equilibrio.
- $k_f$ : es una constante relacionada con la capacidad de adsorción del suelo y representa la cantidad de herbicida adsorbido cuando la concentración de equilibrio es la unidad.
- $n$ : es un parámetro que indica la intensidad de la adsorción y está relacionado con la curvatura de la isoterma.

Las isotermas de adsorción-desorción de los suelos fueron modelizadas mediante recta de regresión lineal utilizando Microsoft Office Excel 2017, a partir del cual se obtuvieron las constantes  $k_f$  y “n”.

El papel que juegan los enlaces hidrofóbicos del herbicida Clortolurón con la materia orgánica en la adsorción de herbicidas no polares en suelos puede ser comparado utilizando el coeficiente de distribución de un determinado herbicida en un suelo determinado para una concentración de equilibrio fija ( $k_d$ ), pero referido al porcentaje de carbono orgánico (CO) del suelo ( $k_{foc}$ ).

$$k_{foc} = (k_f / \% \text{CO}) \times 100 \quad (4)$$

### 3.2.4.- Estudios de biodegradación de Clortolurón en suelo

El suelo CV se contaminó con Clortolurón a una concentración de 50 mg/kg. El herbicida fue aplicado en una solución de metanol, debido a esto solo se aplicó al 25 % del suelo y una vez volatilizado el metanol, se mezcló con el resto del suelo alcanzando la concentración fijada. Este procedimiento se realiza de este modo para tratar de no eliminar la flora microbiana presente en el suelo, al menos la totalidad de la misma.

En este ensayo se realizaron 7 tratamientos por duplicado, y se tomaron muestras de suelo a diferentes tiempos de envejecimiento (1, 7, 15, 30 y 60 días). En los 7 tratamientos se aplicó una humedad final al suelo del 60% de la capacidad de campo del mismo (19,65 ml/100 g). En la tabla 7 se detallan dichos tratamientos y se describen a continuación:



**Tabla 7.** Tratamientos de biodegradación de Clortolurón en el suelo CV.

Tratamiento		SNs (1ml)	HPBCD (x10)	Triada (10 <sup>9</sup> UFC/g)	Triada (10 <sup>8</sup> UFC/g)
1	Control				
2	Nutrientes (SNs)	✓			
3	SNs + HPBCD	✓	✓		
4	SNs + Consorcio (1)	✓		✓	
5	SNs + HPBCD + Consorcio (1)	✓	✓	✓	
6	SNs + Consorcio (2)	✓			✓
7	SNs + HPBCD + Consorcio (2)	✓	✓		✓

- Tratamiento 1 (TTO1): Se realiza para comprobar si el herbicida se degrada en el suelo solo con la propia flora endógena.
- Tratamiento 2 (TTO2): Se realiza para comprobar si el herbicida se degrada en menor tiempo al activar la propia flora endógena con solución de nutrientes.
- Tratamiento 3 (TTO3): Se realiza para comprobar si el herbicida se degrada en menor tiempo en el periodo transcurrido en el ensayo por aumentar la solubilidad del Clortolurón en solución y así estar más biodisponible para la propia flora endógena del suelo. De HPBCD se añade 10 veces la concentración del herbicida inicialmente añadido (x10).
- Tratamiento 4 (TTO4): Se realiza para comprobar si la triada a 10<sup>9</sup> UFC/g junto con la propia flora del suelo y solución de nutrientes favorece la biodegradación acortando el tiempo del ensayo.
- Tratamiento 5 (TTO5): Se realiza para comprobar si el tratamiento mixto (la triada a 10<sup>9</sup> UFC/g + HPBCD) junto con la propia flora del suelo y solución de nutrientes favorece la biodegradación acortando el tiempo del ensayo.
- Tratamiento 6 (TTO6): Se realiza para comprobar si la triada a 10<sup>8</sup> UFC/g junto con la propia flora del suelo favorece la biodegradación acortando el tiempo del ensayo.
- Tratamiento 7 (TTO7): Se realiza para comprobar si el tratamiento mixto (la triada a 10<sup>8</sup> UFC/g + HPBCD) junto con la propia flora del suelo favorece la biodegradación acortando el tiempo del ensayo.



Una parte fundamental de nuestro experimento es la aplicación de microorganismos degradadores exógenos, para ello, se utilizó el consorcio bacteriano (la triada) el cual ha sido descrito en el apartado 3.1.4 de Materiales. La preparación de estos inóculos bacterianos se realizó de la siguiente manera:

Preparación de los inóculos bacterianos:

Las tres cepas que forman el consorcio bacteriano se conservan en crioviales (Microbank PL170/M, PROLAB Diagnostics) especialmente diseñados para ese cometido. Estos contienen pequeñas esferas porosas que sirven de soporte para las bacterias y que a su vez se encuentran sumergidas en un líquido crioprotector, cuya composición no es suministrada por el fabricante. Los crioviales se conservaron a -80°C en congelador (Revco Elite Plus, Clarkson Laboratory & Supply Inc. USA).

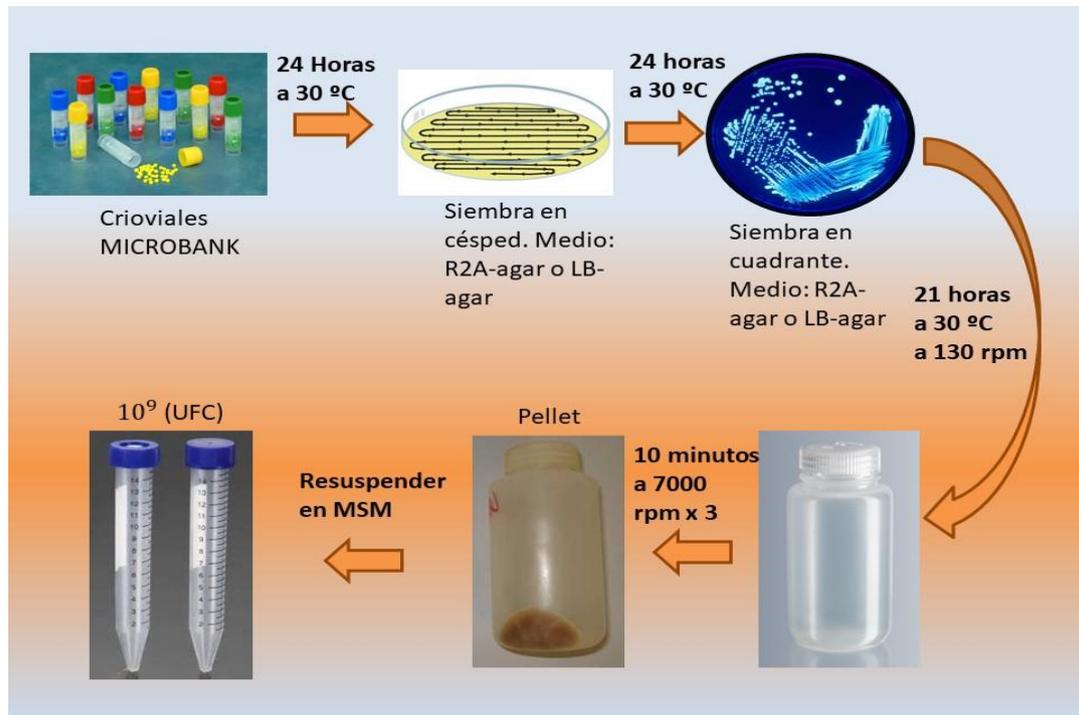
De los crioviales se utilizó una esfera para sembrar las diferentes cepas individualmente en placas Petri conteniendo bacto agar (20 g/l). Cada una de las cepas bacterianas se sembraron en el medio de cultivo más adecuado para su crecimiento: *Acthrobacter sulfonivorans* y *Advenella kashmirensis* en LB y *Variovorax soli* en R2A. La siembra se realizó en césped y las placas se incubaron 24 horas en horno a 30 °C.

A partir de cada placa Petri sembrada en césped, las tres cepas se sembraron en cuadrantes por quintuplicado en nuevas placas Petri, dejándolas incubar durante 24 horas en horno a 30 °C para conseguir obtener biomasa suficiente y colonias aisladas de suficiente calidad. Posteriormente, se recogió la biomasa en botellas de vidrio estériles de 250 ml, en las cuales se le añadieron 100 ml de medio LB para *Acthrobacter* y *Advenella* y 100 ml de R2A para *Variovorax*, estos medios de cultivo fueron suplementados con Clortoluron (10 mg/l) y 1 ml de una solución de nutrientes (SN<sub>5</sub>). Seguidamente, se incubaron a 30 °C en un agitador horizontal durante 21 horas a 130 rpm. Las bacterias se tomaron al inicio de la fase estacionaria de crecimiento (21 h). Esto es conocido debido a que se realizaron estudios previos para analizar las curvas de crecimiento de cada cepa bacteriana.

Pasado dicho tiempo se pasaron a botes de centrifuga y se centrifugaron durante 10 minutos a 7000 rpm, obteniendo únicamente el pellet formado por las bacterias y eliminando el medio de cultivo. Este proceso se repitió tres veces, pero esta vez siendo resuspendido el pellet con el medio MSM. Con este proceso tratamos de lavar los restos del medio de cultivo. Una vez obtenido el pellet final, se resuspendió dicho pellet en



tubos falcón con medio MSM. En la figura 9 puede observarse la preparación del inóculo bacteriano de forma esquemática.



**Figura 9.** Esquema preparación del inóculo bacteriano.

En este caso, la densidad óptica de los cultivos se ajustó a la solución de McFarland del número 4 ( $13 \times 10^8$  (UFC/g)). En microbiología, los estándares de turbidez de McFarland se usan como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber el número de bacterias por mililitro, o las unidades formadoras de colonias (UFC), según una escala que va de 0,5 a 10. Estos estándares son creados al mezclar soluciones de cloruro de bario al 1% con ácido sulfúrico al 1% en volúmenes específicos. Los estándares pueden ser visualmente comparados con suspensiones de bacterias en solución salina estéril. La ventaja de este método es que no es necesario incubar ni usar equipo especial para estimar el número de bacterias. En nuestro experimento la cantidad de cada cepa bacteriana a aplicar fue de  $10^9$  y  $10^8$  UFC/g.

Una vez aplicados los materiales descritos a cada tratamiento, se dividió cada tratamiento en viales de vidrio estériles (2,5 g), para obtener los diferentes tiempos de envejecimiento (1, 7, 15, 30 y 60 días) por duplicado.

Por último, cuando los distintos tratamientos fueron alcanzando sus correspondientes tiempos de envejecimiento, se procedió a realizar la extracción con metanol. Para



realizar dicha extracción se pesó 1 g de cada vial por duplicado. Esta muestra se introdujo en tubos de centrifuga de 30 ml y se le añadieron 5 ml de metanol. Seguidamente, se realizó una agitación de 30 segundos en vortex, 30 minutos en ultrasonidos y 1 hora de volteo. Este proceso se repitió tres veces en este orden. Una vez finalizada la agitación, se centrifugó durante 15 minutos a 7000 rpm. Por último, se recogió el sobrenadante y se procedió al filtrado, para el que se usaron filtros de nylon con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . El filtrado fue depositado en viales de 2 ml especialmente diseñados para medir en HPLC.

La cuantificación del analito, se hizo por recta de calibrado externa hasta una concentración de 20 ppm de Clortolurón.

### **3.2.5.- Modelización de los resultados de biodegradación**

Para el cálculo de los parámetros cinéticos de las curvas de biodegradación obtenidas en estos ensayos, éstas se ajustaron y fueron modelizadas usando las indicaciones incluidas en la guía FOCUS (2006), grupo de trabajo de expertos constituido en 1993 para ayudar en el cálculo de las cinéticas de disipación necesarias para el proceso europeo de autorización de plaguicidas según la Directiva 91/414/CEE, empleando el programa matemático SOLVER de Microsoft Office Excel 2017.

Los principales tipos de cinéticas que se describen en el documento de FOCUS son las cinéticas de Primer Orden que engloban a: Cinética de Primer Orden Simple (SFO), cinética del Modelo de Hockey-Stick (HS), cinética de Gustafson y Holden (FOMC), cinética del Modelo Biexponencial y cinética de primer orden bifásica Hockey-Stick (HS) modificado, (MHS). Las cinéticas que mejor se ajustaron a las curvas de biodegradación fueron SFO y HS. A continuación, se hará una breve descripción de cada una de ellas.

La cinética SFO asume que el número de moléculas de herbicida es muy pequeño frente al número de microorganismos y enzimas que lo degradan. Como resultado, el cambio en la concentración del herbicida es directamente proporcional a la concentración que queda de él en el sistema, ya que el resto de componentes están en exceso. Supone que la biodegradación está limitada a una cantidad máxima que dependerá de la naturaleza del herbicida y del tipo de suelo. Las desviaciones de la cinética de primer orden se producen porque la disponibilidad del herbicida disminuye con el tiempo, por la variación espacial del proceso de degradación o por la dependencia del proceso de



degradación con la disminución de la actividad microbiana. Sólo se obtiene una constante  $k_1$ . Los diferentes parámetros cinéticos se obtendrán a partir de las siguientes ecuaciones:

$$M = M_0 * e^{-kt} \quad (5)$$

$$DT_{50} = \ln 2/k \quad (6)$$

$$DT_x = \frac{\ln \frac{100}{100-x}}{k} \quad (7)$$

$DT_{50}$  es el tiempo necesario para que se alcance el 50% de Clortolurón biodegradado.

La cinética HS considera que el suelo consiste en dos compartimentos diferentes, uno de degradación rápida y otro más lenta cada uno afectado por una cinética de primer orden. Inicialmente se aplica todo el producto en el compartimento de degradación rápida donde la concentración del herbicida disminuye mediante una cinética de orden 1 con una constante específica de velocidad  $k_1$ , y en un determinado momento llamado punto de ruptura ( $t_b$ ), comienza a transferirse al compartimento de degradación lenta, mediante otro proceso de orden 1 con una constante de  $k_2$ . En este modelo bifásico el herbicida se divide directamente entre los dos compartimentos, sin que exista transferencia de uno a otro. Siendo  $k_1$  mayor que la  $k_2$ , ya que la degradación es más rápida al principio. Los diferentes parámetros cinéticos se obtendrán a partir de las siguientes ecuaciones:

$$M = M_0 * e^{-k_1 t} \quad \text{para } t \leq t_b \quad (8)$$

$$M = M_0 * e^{-k_1 t_b} * e^{-k_2(t-t_b)} \quad \text{para } t > t_b \quad (9)$$

$$DT_x = \frac{(\ln \frac{100}{100-x})}{k_1} \quad \text{sí } DT_x \leq t_b \quad (10)$$

$$DT_x = \frac{(\ln \frac{100}{100-x} - k_1 t_b)}{k_2} \quad \text{sí } DT_x > t_b \quad (11)$$



### **3.2.6.- Estudio de la actividad de la enzima deshidrogenasa de los microorganismos del suelo**

La medición de la actividad enzimática deshidrogenasa se ha utilizado como indicador para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad biológica del suelo. La actividad de la deshidrogenasa nos permite, de manera global, tener una idea de los procesos microbianos que ocurren en el suelo debido a que se encuentran presentes únicamente en sistemas vivos (Gajda y Martyniuk 2005, Gil-Sostres *et al.*, 2005, Paul y Clark 2007). Dicha actividad se determinó por el método de García *et al.* (1993) que se basa en la estimación del idonitrotetrazolio formazano (INTF) formado, cuando el suelo es incubado con 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT) durante 20 horas a 20 °C en oscuridad, haciendo uso de los siguientes reactivos: 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT) al 0,4%, metanol, idonitrotetrazolio formazán (INTF).

Para ello, se pesaron 0,5 g de suelo en tubos de ensayo de vidrio por triplicado, dos muestras y un control. A continuación, se añadió a las muestras en oscuridad, 0,1 ml de INT al 0,4% y 0,2 ml de agua destilada y se taparon con parafilm. En el caso de los controles, se añadió 0,3 ml de agua destilada, en las mismas condiciones que las muestras y se taparon con parafilm. Posteriormente, se incubaron durante 20 horas a temperatura ambiente en completa oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 5 ml de metanol a las muestras y a los controles, y seguidamente, se agitaron energicamente en vortex durante 1 minuto. Después, se filtraron con filtros Whatman grado 6, y los filtrados fueron depositados en tubos de vidrio. La producción del INTF generará un color rojizo que se cuantifica por espectroscopía UV-visible.

La medición de la absorbancia se llevó a cabo en un espectrofotómetro a 490 nm de longitud de onda. Para ello, se preparó una curva de calibrado, tomando alícuotas de cantidades crecientes entre 0 y 10 ml de la disolución de INTF. La curva de calibrado se empleó para transformar las absorbancias que nos proporciona el espectrofotómetro a unidades de concentración (mg/l). El espectrofotómetro utilizado fue un UV-3100PC spectrophotometer suministrado por VWR y que se muestra en la figura 10.



**Figura 10.** Espectrofotómetro (UV-3100PC Spectrophotometer).

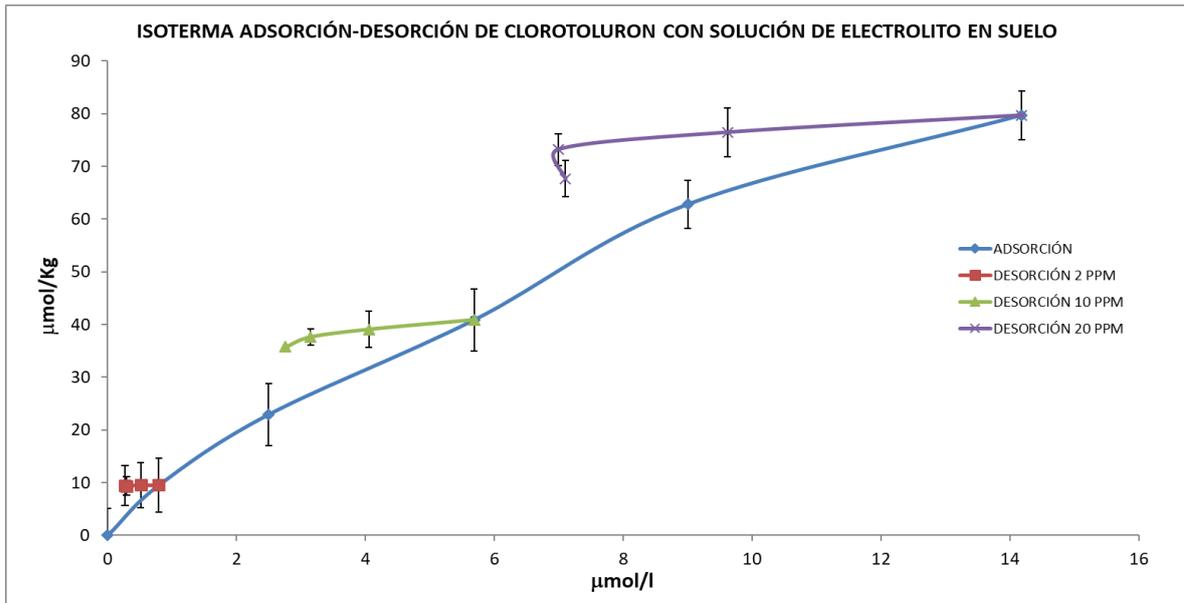
Para dilucidar diferencias significativas entre los tratamientos a lo largo del tiempo se realizó el análisis de la varianza ANOVA de una sola vía con medidas repetidas (Pérez, 2005) mediante el paquete estadístico IBM SPSS V. 24. Dichos resultados serán mostrados a modo de resumen en el anexo I adjunto.



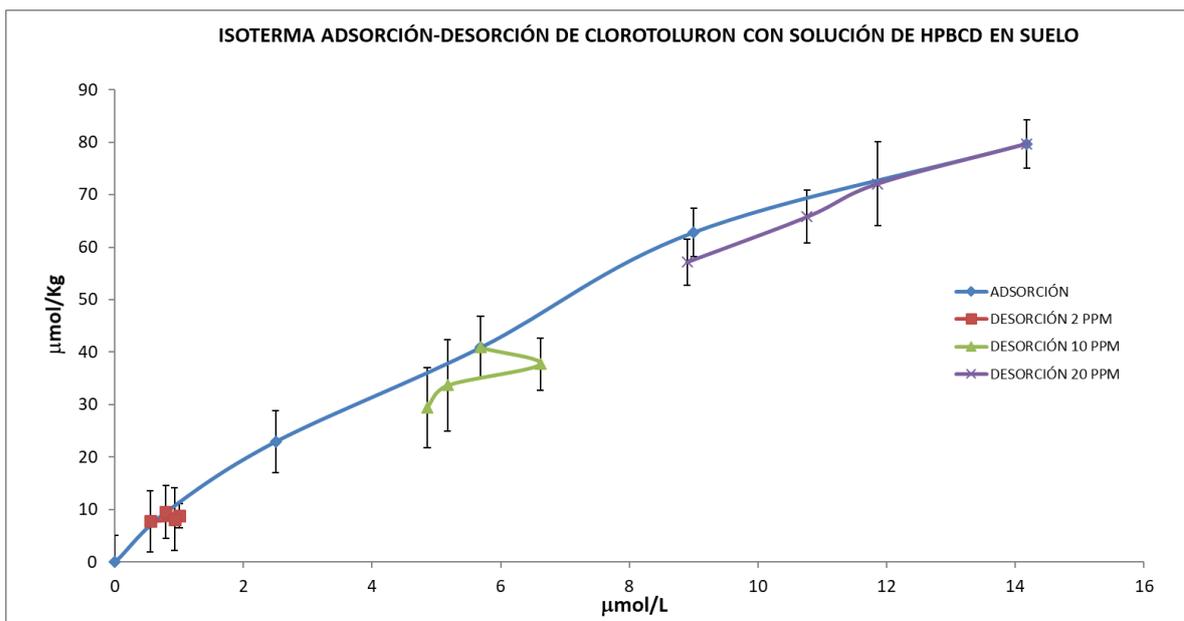
## 4.- RESULTADOS

### 4.1.- ISOTERMAS DE ADSORCIÓN-DESORCIÓN DE CLORTOLURÓN EN SUELO

En las figuras 11 y 12, se presenta la isoterma de adsorción del herbicida Clortolurón en el suelo empleado, así como las isotermas de desorción obtenidas empleando solución  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0,01 M (Fig. 11) o solución de HPBCD (Fig. 12).



**Figura 11.** Isotherma de adsorción-desorción con solución de nitrato cálcico en el suelo estudiado. Las barras verticales corresponden a las desviaciones estándar.



**Figura 12.** Isotherma de adsorción-desorción con solución de HPBCD en el suelo estudiado. Las barras verticales corresponden a las desviaciones estándar.



#### 4.1.1.- Isoterma de adsorción de Clortolurón en suelo

Los datos de la isoterma de adsorción se ajustaron satisfactoriamente a la ecuación (3) de Freundlich, como lo confirman el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) obtenido (Tabla 8).

La capacidad de adsorción del suelo viene dada por el parámetro  $K_f$  de la ecuación de Freundlich. La constante  $K_f$  es la cantidad de herbicida adsorbido para una concentración en el equilibrio de 1  $\mu\text{mol/l}$  y, por tanto, representaría la capacidad de adsorción de un suelo a concentraciones bajas de adsorbato. En nuestro caso, y para nuestro herbicida correspondería a un escenario de aplicación normal sobre suelos agrícolas (0,6 – 5 kg/ ha, Tomlin, 2000), es decir, esta capacidad de adsorción determinada a través de  $K_f$  nos aportaría información sobre el comportamiento del herbicida, cuando este es aplicado para llevar a cabo su función agrícola. En el suelo estudiado  $K_f$  fue de 13,73 (tabla 8).

**Tabla 8.** Parámetros de la ecuación de Freundlich ( $K_f$  y  $n_a$ ), coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) y  $K_f$  normalizada con el contenido de carbono orgánico ( $K_{foc}$ ) correspondientes a la adsorción de Clortolurón sobre el suelo CV.

Tipo de isoterma	$K_f$	$n_a$	$R^2$	$K_{foc}$
Adsorción	13,73	0,6912	0,9497	778,65

Otro parámetro determinado a partir de la ecuación de Freundlich es el coeficiente de Freundlich ( $n$ ), que nos indica la intensidad de la adsorción. El valor obtenido en esta isoterma fue de 0,6912. Valores  $< 1$  indican que cuanto más cantidad de moléculas de Clortolurón se adsorben, menos sitios de afinidad quedan disponibles, por lo que las isotermas empiezan a curvarse, limitándose la cantidad adsorbida, es decir se aproximan más a isotermas tipo L de acuerdo a la clasificación de Giles *et al.* (1974).

El papel de las interacciones hidrofóbicas sobre la adsorción de los herbicidas hidrofóbicos y no polares puede ser comparado normalizando la constante de Freundlich por el contenido en carbono orgánico de la materia orgánica del suelo,  $K_{foc}$  (ecuación 4), pudiéndose concluir que además de ser responsable de la adsorción de Clortolurón, también, esta interacción es fuerte y provoca una difícil desorción del mismo. Mientras más hidrofóbica sea una molécula más alta será la probabilidad para que se reparta desde la fase acuosa a la fase orgánica del medio.  $K_{foc}$  puede ser utilizado como una de las medidas de esta propiedad de los suelos y es independiente de



otras. Cuando las uniones hidrofóbicas son las responsables de la adsorción del herbicida,  $K_{foc}$  debe tomar valores más o menos constantes para distintos suelos, es decir, se trata de un factor que sirve como herramienta para determinar si el factor que más influye en la adsorción de un plaguicida es la materia orgánica del suelo. Según algunos estudios con el herbicida Clortolurón no siempre se obtiene un valor constante de  $K_{foc}$ , lo que indica que además de la materia orgánica del suelo hay otros factores del mismo que también influyen. ElGouzi *et al.* (2012) observaron que suelos con altos contenidos de arcillas daban lugar a valores de  $K_{foc}$  superiores a la mayoría de los suelos. Lo mismo observaron Hiller *et al.* (2008) en suelos con alto contenido en esmectitas, un tipo de mineral de la arcilla. Arfaoui *et al.* (2012), observaron para el herbicida isoproturón, también perteneciente a la familia de las fenilureas, que el contenido en materia orgánica y la relación  $\frac{CO_3^{2-}}{M.O.}$  resultaron ser los dos parámetros más determinantes para su adsorción.

#### 4.1.2.- Isotermas de desorción de Clortolurón en suelo

En la figura 11 se presentan las isotermas de desorción de Clortolurón en el suelo CV empleando soluciones de  $Ca(NO_3)_2$  0,01 M. Se observa que las desorciones con  $Ca(NO_3)_2$  0,01 M para el herbicida Clortolurón presentaron histéresis positiva, indicando que la desorción no era totalmente reversible. En la tabla 9, se muestran los porcentajes de Clortolurón desorbido a diferentes concentraciones iniciales cuando se empleó la solución de  $Ca(NO_3)_2$  0,01 M.

**Tabla 9.** Porcentajes de desorción de Clortolurón del suelo empleando soluciones de  $Ca(NO_3)_2$  y HPBCD como extractantes.

Desorción	$Ca(NO_3)_2$	HPBCD
2 ppm	1,57	18,8
10 ppm	12,5	28,2
20 ppm	15,1	28,3



En la tabla 9 se muestran los porcentajes totales de Clortolurón desorbido a 3 concentraciones iniciales (2, 10 y 20 ppm). Se observa que en general el porcentaje desorbido aumenta conforme aumenta la concentración, lo que indica que la adsorción es más irreversible cuando hay menor cantidad adsorbida, ya que la adsorción se estará produciendo en los sitios donde haya mayor afinidad de adsorción, de los cuales la desorción va a ser más difícil o incluso imposible. Por lo tanto, concentraciones crecientes de Clortolurón en suelos pueden dar lugar a distintos efectos en cuanto a su desorción y persistencia.

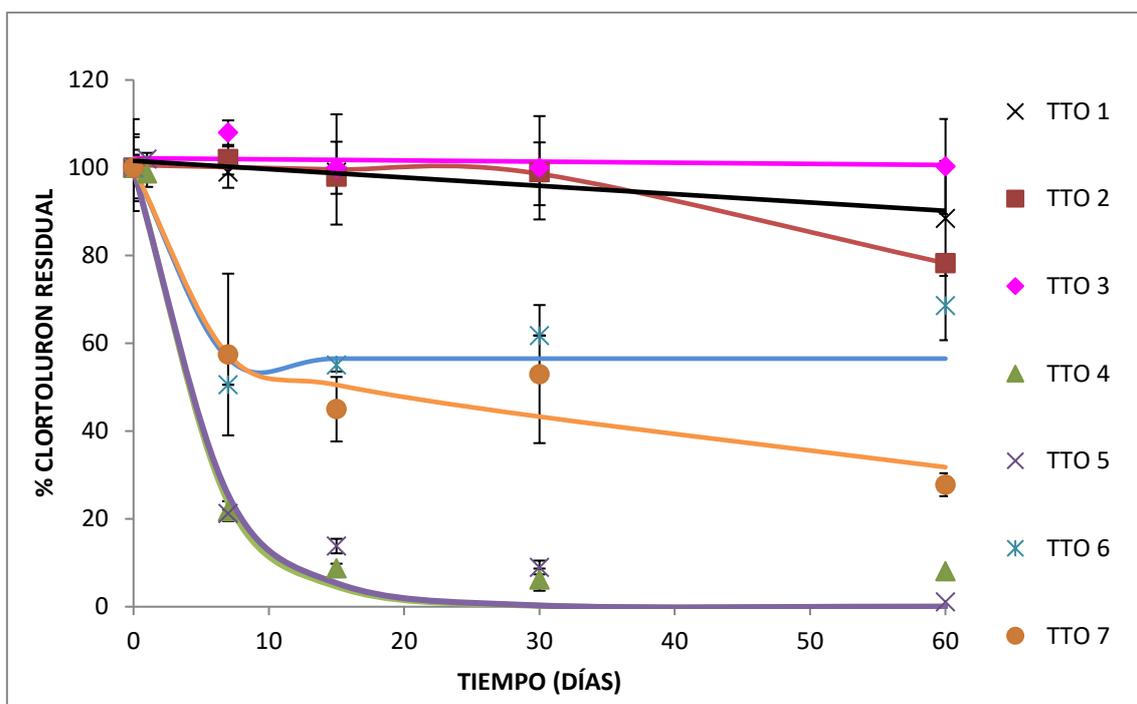
En la figura 12 se muestran las isothermas de adsorción-desorción de Clortolurón empleando la solución de HPBCD 10 veces la concentración molar del herbicida. Estas desorciones se llevaron a cabo para ver si la ciclodextrina ejercía un efecto de extracción del herbicida del suelo. Se observa que en todos los casos existe también histéresis, ya que los resultados de desorción se desvían marcadamente de la isoterma de adsorción, pero se trata de una histéresis negativa, es decir, se desorbe más de la cantidad de Clortolurón de la que sería de esperar según la isoterma de adsorción. En la tabla 9 también se muestran los porcentajes de Clortolurón desorbido a partir de diferentes concentraciones iniciales de Clortolurón cuando se empleó la solución HPBCD x10. El comportamiento observado indicó que el herbicida presenta una mayor tendencia a incorporarse a la solución del suelo en presencia de HPBCD y, por tanto, la capacidad de extracción de esta ciclodextrina hacia el herbicida adsorbido. Similares resultados obtuvieron Pérez-Martínez *et al.* (2000) y Morillo *et al.* (2001) usando como extractante  $\beta$ -ciclodextrina en estudios del herbicida 2,4-D. Los herbicidas poco polares presentan una alta tendencia a permanecer adsorbidos en la superficie del suelo, conduciendo a su inactivación, baja disponibilidad, y, por tanto, contaminación de los suelos, pero si éstos forman complejos de inclusión con las ciclodextrinas en solución y aumentan su solubilidad, será más fácil eliminarlos facilitando la biorrecuperación de suelos contaminados (Villaverde *et al.*, 2005).



## 4.2.- BIODEGRADACIÓN DE CLORTOLURÓN EN SUELO

Se realizaron experiencias para comprobar si el herbicida Clortolurón se biodegradaba en el suelo CV empleando los 7 tratamientos descritos en el apartado 3.2.5 de Materiales y Métodos. En los tratamientos donde se inoculó el consorcio bacteriano (TTO 4, 5, 6 y 7) éste fue añadido al sistema al inicio de su fase estacionaria de crecimiento (21 h).

La figura 13 muestra las curvas de biodegradación del herbicida Clortolurón quedando representado el ensayo experimental con símbolo y la modelización con una línea. En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos de las modelizaciones de la biodegradación en la cual se expresa el modelo cinético junto con los parámetros característicos del modelo ( $k_1$ ,  $k_2$  y  $t_b$ ), el tiempo de detección al que se degradaría el 50% del herbicida ( $DT_{50}$ ) y el porcentaje de degradación total obtenido.



**Figura 13.** Curvas de biodegradación de Clortolurón en suelo CV con 7 tratamientos. Las barras verticales corresponden a las desviaciones estándar.



**Tabla 10.** Tratamientos de biodegradación de Clortolurón en el suelo CV.

Tratamiento		SNs (1ml)	HPBCD (x10)	Triada (10 <sup>-9</sup> UFC/g)	Triada (10 <sup>-8</sup> UFC/g)
1	Control				
2	Nutrientes (SNs)	✓			
3	SNs + HPBCD	✓	✓		
4	SNs + Consorcio (1)	✓		✓	
5	SNs + HPBCD + Consorcio (1)	✓	✓	✓	
6	SNs + Consorcio (2)	✓			✓
7	SNs + HPBCD + Consorcio (2)	✓	✓		✓

**Tabla 11.** Parámetros cinéticos obtenidos en la modelización de las curvas de biodegradación del herbicida Clortolurón en el suelo CV.

Tratamiento	Modelo cinético	k <sub>1</sub> (días <sup>-1</sup> )	k <sub>2</sub> (días <sup>-1</sup> )	t <sub>b</sub> (días)	DT <sub>50</sub> (días)	Degradación (%)
1	HS	2,6 10 <sup>-3</sup>	4,2 10 <sup>-3</sup>	34	196	11,6
2	HS	6,6 10 <sup>-4</sup>	0,01	38	104	21,7
3	SFO	2,6 10 <sup>-4</sup>	-	-	2715	0,63
4	HS	0,21	4,13	7	3	90,0
5	HS	0,19	4,13	7	4	99,8
6	HS	0,24	-	7	-	43,5
7	HS	0,02	0,01	8	16	68,2

Como se puede observar en la figura 13 la biodegradación del herbicida estudiado en los tratamientos 1, 2 y 3 que no llevan consorcio bacteriano exógeno (triada) muestran que no existe biodegradación a lo largo del tiempo, manteniéndose prácticamente constante durante el tiempo del ensayo. En la tabla 11 se pueden ver los porcentajes de degradación para estos tratamientos donde el porcentaje degradado ha sido de 11,6, 21,7 y 0,63%, respectivamente, aunque los errores en los datos del último día del ensayo (60 días) son muy grandes sobre todo para el tratamiento 2. El tiempo que ha de transcurrir para que se degrade el 50% del herbicida Clortolurón en estas condiciones sería de 196, 104 y 2715 días, respectivamente. Estos tratamientos serán considerados como



controles de este estudio debido a que no ha sido inoculado el consorcio bacteriano quedando reflejado que se debe realizar una biorrecuperación en el suelo CV mediante un tratamiento de bioaumentación con organismos exógenos degradadores específicos (Villaverde *et al.*, 2012) ya que los microorganismos endógenos de este suelo no tienen capacidad de degradar el herbicida.

La figura 13 y la tabla 11 también muestran las curvas de biodegradación del herbicida Clortolurón y los resultados obtenidos de las modelizaciones de la biodegradación con los tratamientos 4, 5, 6 y 7, que sí llevan el bioaumentación con bacterias degradadoras específicas.

Los tratamientos 4 y 6 solo se diferencian en la concentración añadida del consorcio bacteriano,  $10^9$  y  $10^8$  UFC/g, respectivamente. Los porcentajes de degradación para estos tratamientos han sido de 90,0 y 43,5%, respectivamente. El tiempo que ha de transcurrir para que se degrade el 50 % del herbicida Clortolurón en estas condiciones sería de 3 y 25 días, respectivamente. Al aplicar el tratamiento 4 se puede afirmar que las aplicaciones conjuntas de las 3 cepas investigadas a la concentración elevada ( $10^9$  UFC/g) forman un consorcio extraordinario, ya que se acortan los tiempos de biodegradación y, además se consigue eliminar por completo el herbicida del suelo y por tanto su riesgo tóxico. Este resultado no sucede cuando el consorcio bacteriano es inoculado a  $10^8$  UFC/g (TTO 6), lo que indica que este consorcio consigue adaptarse rápidamente a la presencia del herbicida en suelo como única fuente de carbono, pero se necesita 10 veces más de la concentración añadida del consorcio para que se alcance una completa biodegradación.

Existen ciertas discrepancias acerca del uso de los inóculos microbianos degradadores específicos en la recuperación de suelos contaminados, ya que en algunos estudios se ha observado un incremento en la degradación del contaminante (Bento *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005), mientras que en otros se ha observado un efecto negativo en su degradación (Thomassin-Lacroix *et al.*, 2002). Por ejemplo, Towell *et al.* (2011b), estudiaron, en un suelo agrícola, el efecto de la adición de tres inóculos bacterianos degradadores en la degradación de fenildodecano. Cada uno de los inóculos se adicionó al suelo a tres concentraciones distintas. Salvo cuando los inóculos se adicionaron a la concentración más baja de las tres empleadas, obtuvieron que la duración de la fase lag en las curvas de biodegradación era mayor que cuando no se adicionó ningún inóculo. Towell *et al.* (2011a), observaron que, en uno de los tres suelos empleados en su



estudio, la extensión global de degradación alcanzada en el sistema inoculado con un degradador específico resultó ser más baja que la que se obtuvo en ausencia del degradador, concluyendo que se debió a la competencia que existía entre la flora endógena de ese suelo y el degradador específico añadido.

Los tratamientos 5 y 7, como queda reflejado en la tabla 10, se diferencian de los tratamientos 4 y 6 por la adición de HPBCD. Los porcentajes de degradación para TTO 5 y 7 han sido de 99,8 y 68,2%, respectivamente. El tiempo que ha de transcurrir para que se degrade el 50% del herbicida Clortolurón en estas condiciones sería de 4 y 16 días, respectivamente. Los parámetros cinéticos obtenidos en el tratamiento 5 son semejantes al TTO 4, es decir, al degradar el Clortolurón un 99,8% la HPBCD no presenta ningún efecto significativo. En cambio, en el tratamientos 7 si se observa el efecto de HPBCD. La adición conjunta del inóculo y HPBCD hacen que el porcentaje de biodegradación esté por encima del ensayo que no lleva incorporado HPBCD (TTO 6). Se puede deducir que en este caso la adición de HPBCD mejora la degradación del compuesto debido a que se forman complejos de inclusión de HPBCD con el herbicida Clortolurón, y como consecuencia de esto se mejora la biodisponibilidad, bioaccesibilidad y biodegradación del herbicida. En el TTO 5 también se habrán formado los complejos de Clortolurón con HPBCD, pero al ser tan activa la flora bacteriana añadida debido a su alta concentración, el efecto de la HPBCD no se pone de manifiesto. Por esta razón se llevaron a cabo los tratamientos 6 y 7 con una concentración más baja de bacterias para poder observar el efecto de la ciclodextrina.

Otros autores también han observado la mayor biodisponibilidad de distintos contaminantes orgánicos en su biorrecuperación en suelos al utilizar CDs. Garon *et al.* (2004), obtuvieron mejores resultados en la biorrecuperación de suelos con fluoreno al emplear un hongo (*Absidia cylindrospora*) y un agente quelante, maltosil-ciclodextrina (MCD), la cual hizo más biodisponible al fluoreno y mejoró la biodegradación. Bardi *et al.* (2000) demostraron cómo un consorcio bacteriano aislado de un suelo contaminado por petróleo inoculado en suelos pudo acelerar la degradación de dodecano, tetracosano, antraceno y naftaleno con la ayuda de  $\beta$ -ciclodextrina. Villaverde *et al.* (2012), estudiaron el efecto de la adición de HPBCD en la mineralización de Diurón en un suelo inoculado con una cepa degradadora específica de este herbicida. Observaron que el porcentaje final de Diurón mineralizado en el sistema suplementado con HPBCD



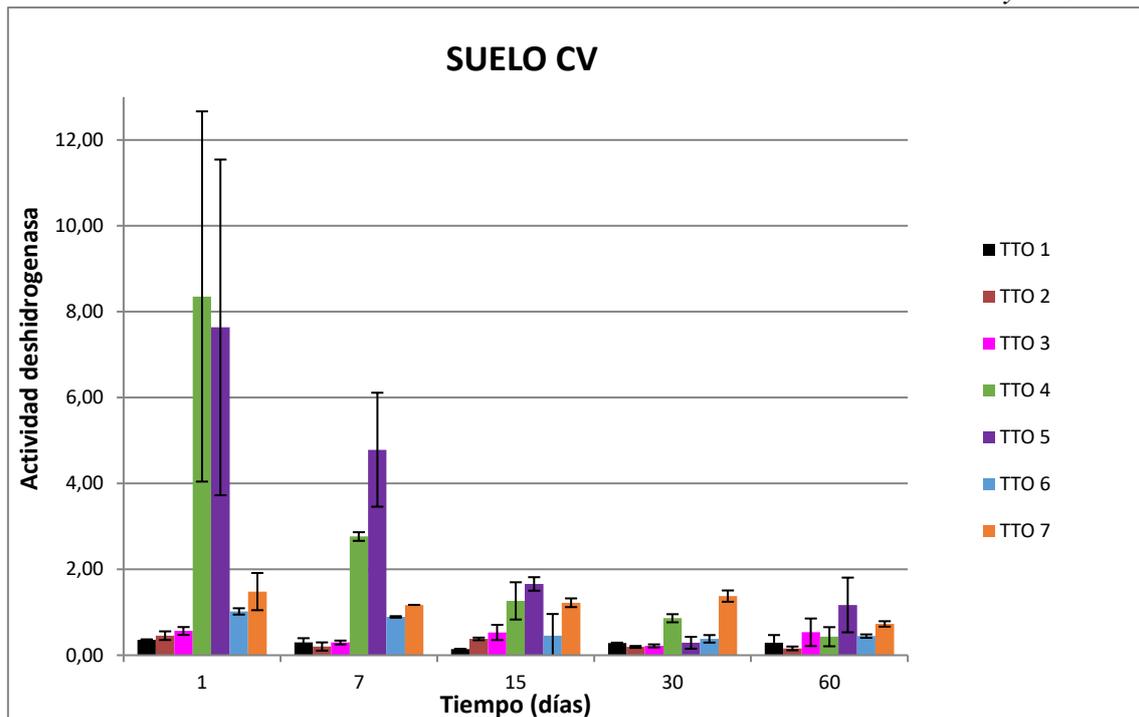
alcanzó una extensión global de mineralización del 98,67% mientras que sin HPBCD sólo se mineralizó un 45,25%.

Lo que se puede deducir de los resultados de biodegradación es que el empleo de bioaumentación con las bacterias degradadoras específicas empleadas en este estudio en los tratamientos de biorrecuperación de Clortolurón son bastante efectivos, incluso hasta obtener una eliminación del 100% del herbicida en el suelo en tan solo 20 días de tratamiento, siempre que se utilice una concentración suficientemente alta de bacterias exógenas aportadas. En este caso, ni siquiera sería necesaria la adición de HPBCD.

#### **4.3.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DESHIDROGENASA**

En la figura 14, se muestra la evolución de la actividad deshidrogenasa en los diferentes tratamientos de biodegradación a lo largo del periodo experimental.

Cuando se comparan entre sí el tratamiento control (TTO1) con el que lleva solo nutrientes añadidos (TTO2) se ve como no existe una gran diferencia entre estos tratamientos y que los mismos no siguen una tendencia clara a lo largo de la incubación, con pequeños ascensos y descensos. Tan solo en el día 15 se observa como estos dos tratamientos tienen valores estadísticamente diferentes. En los tiempos restantes los dos tratamientos tienen valores similares. Hay que tener en cuenta que se analizan reacciones bioquímicas que dependen de organismos vivos, cuya variabilidad depende de factores difícilmente controlables en las condiciones de laboratorio empleadas. No se puede afirmar que existan diferencias entre estos dos tratamientos, y por lo tanto se puede concluir que la solución de nutrientes no ha producido ningún efecto en la deshidrogenasa.



**Figura 14.** Evolución de la actividad enzimática deshidrogenasa para los diferentes tratamientos. Las barras verticales corresponden a las desviaciones estándar.

Algo similar ocurre con el tratamiento 3, el cual lleva una solución de nutrientes + HPBCD. Se puede observar, figura 14, que no se diferencia ni de TTO1 ni de TTO2. De hecho, al realizar un análisis ANOVA de una vía con medidas repetidas, cuyos resultados se muestran en el anexo I, éste indica que los 3 tratamientos son estadísticamente equivalentes de manera global, y por lo tanto la HPBCD y la solución de nutrientes no han modificado significativamente la actividad deshidrogenasa del suelo durante la incubación. Una posible explicación, para todo lo comentado anteriormente, es que las variaciones de la deshidrogenasa son debidas a la situación de estrés a que se somete al suelo tras la alteración del ambiente original al comienzo de la incubación, principalmente por la entrada de contaminantes y la humectación del suelo, lo cual conlleva una sucesión de diversas especies en la comunidad microbiana y por tanto, el consecuente reflejo de esta tendencia irregular en la actividad enzimática del suelo (Baran *et al.*, 2004; Margesin *et al.*, 2000). La adición de nutrientes y HPBCD no parece que provoque una situación de estrés en el suelo.

En la figura 14 se incluyen además los tratamientos en los cuales se aplicó el consorcio bacteriano. Se observa un patrón común en estos tratamientos (TTO4, TTO5, TTO6 y TTO7) en el que los valores son superiores al inicio de la incubación que los que presentan los tratamientos que no han recibido consorcio bacteriano, teniendo los



máximos el día 1 del experimento, lo que parece indicar que la presencia de la contaminación con Clortolurón no ejerce un efecto tóxico para la triada de bacterias que se están empleando para la biorrecuperación de este suelo. Tanto los tratamientos con  $10^9$  UFC/g como los de  $10^8$  UFC/g presentan una actividad deshidrogenasa decreciente conforme aumenta el tiempo de tratamiento. En este sentido, una posible causa de este descenso podría ser la disminución de los nutrientes (Baran *et al.*, 2004), que en este caso sería la concentración disponible de herbicida, ya que es fuente de carbono para la triada de bacterias empleada, coincidiendo con la biodegradación del mismo, como se puede apreciar en el apartado 4.2 biodegradación de Clortolurón en el suelo CV (figura 13),

Comparando los tratamientos TTO4 y TTO5, que llevan el consorcio bacteriano a una concentración de  $10^9$  UFC/g, únicamente diferenciándose entre sí en que el TTO5 lleva la solución de HPBCD, son los que sin lugar a dudas han sufrido un incremento más notable en los valores de la actividad enzimática deshidrogenasa, como puede observarse en la figura 14.

Este incremento de la actividad deshidrogenasa, posiblemente se debe a la capacidad del consorcio de metabolizar alguno de los productos añadidos en los tratamientos del suelo en solución. Así, Cerón y Melgarejo (2005), vieron como existían correlaciones entre las actividades enzimáticas y la fracción de carbono soluble, sugiriendo la existencia de una interacción entre la disponibilidad de compuestos ricos en energía y la actividad biológica del suelo.

Se observa como ambos tratamientos van disminuyendo su valor conforme avanza la incubación, siendo más lento el descenso en TTO5, posiblemente por el uso conjunto de la HPBCD y Clortolurón como nutrientes.

Por lo que se refiere a los tratamientos 6 y 7, que llevan el consorcio bacteriano a concentración de  $10^8$  UFC/g, su actividad deshidrogenasa es lógicamente menor a tiempo 1 que los TTO4 y TTO5 descritos antes, como puede observarse en la figura 14. Posteriormente, el TTO6 sufre un descenso hasta el día 15, igualándose a los tratamientos sin consorcio añadido, y se mantiene constante hasta el final del experimento. El TTO7 tiende a mantener valores más constantes hasta el día 30, disminuyendo posteriormente. Esto se debe posiblemente a la utilización de la HPBCD como nutriente por parte del consorcio, igual que se describió para TTO5.



Si comparamos los TTO4 y TTO5, con los TTO6 y TTO7, en conjunto, diferenciándose únicamente en la cantidad de bacterias aplicadas,  $10^9$  y  $10^8$  UFC/g, se puede observar, figura 14, como existe una diferencia en la actividad enzimática deshidrogenasa al aplicar 10 veces menor cantidad de bacterias a estos últimos. Esto se relaciona con lo descrito por otros autores como Nannipieri (1994) los cuales han encontrado relación entre la actividad enzimática deshidrogenasa y la cantidad de microorganismos viables presentes en el suelo. Además, esta diferencia en la adición del consorcio bacteriano a alta concentración se observa también al llevar a cabo un análisis de la varianza de una sola vía con medidas repetidas (ANOVA), cuyos resultados se muestran en el anexo I. Este análisis muestra que la adición del consorcio a una concentración de  $10^9$  UFC/g afecta a la actividad enzimática, la diferencia es estadísticamente significativa respecto a los tratamientos sin consorcio, sin embargo, según este análisis de la varianza, la dosis baja ( $10^8$  UFC/g) se asemeja más al tratamiento en ausencia de bacterias (TTO2). Por lo tanto, para un efecto positivo de la utilización del consorcio bacteriano, es necesario aplicarlo a la concentración de  $10^9$  UFC/g.

Con respecto a estos resultados, si se asocian a los resultados de biodegradación presentados anteriormente apartado 4.2, se puede obtener una relación entre estos valores de actividad enzimática y los resultados de la biodegradación. De este modo, el TTO6 como se ha comentado estabiliza su valor de actividad enzimática a partir del día 15 y en relación con la biodegradación, a tiempos similares la curva de biodegradación tiende a ser constante. Con lo cual se puede relacionar que esta bajada en la actividad enzimática deshidrogenasa, sea un reflejo de la parada en la biodegradación del compuesto, que puede ser asociado a la falta de suficiente actividad microbiana en el suelo específica para Clortolurón, si se compara con el tratamiento 4 en el que a los 15 días ya queda menos del 10% de herbicida en el suelo.

Por otro lado, si se analiza el TTO7, que es el que lleva una solución de HPBCD, también, se puede relacionar con la biodegradación. Debido a que a tiempos similares a los que la actividad enzimática deshidrogenasa se estabiliza, también se observa como la curva de biodegradación (figura 13) sufre un cambio de pendiente, pero se sigue biodegradando el compuesto. Además, si se observa esta relación con los resultados obtenidos en el apartado 4.1 (isotermas de adsorción-desorción de Clortolurón en suelo), se puede observar como el efecto solubilizador que ejerce la adición de HPBCD, influye sobre la actividad enzimática. Se observa como los microorganismos del suelo



**RECUPERACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO POR EL HERBICIDA CLORTOLURÓN APLICANDO UN CONSORCIO BACTERIANO DEGRADADOR ESPECÍFICO Y CICLODEXTRINAS.**

*Resultados y discusión*

continúan degradando el plaguicida gracias a la capacidad de las HPBCD para solubilizar y facilitar la extracción del herbicida de la fracción coloidal del suelo.



**RECUPERACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO POR EL HERBICIDA CLORTOLURÓN APLICANDO UN CONSORCIO BACTERIANO DEGRADADOR ESPECÍFICO Y CICLODEXTRINAS.**

*Resultados y discusión*



## 5.-CONCLUSIONES

1. De los resultados obtenidos en los estudios de adsorción-desorción de Clorolurón en el suelo CV se concluye que la isoterma de adsorción se ajustó a la ecuación de Freundlich, como se confirma a partir de los coeficientes de correlación calculados. En los estudios de desorción empleando solución de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0,01 M se concluye que las isotermas presentan histéresis positiva, siendo por tanto la adsorción parcialmente irreversible, y la adsorción es más irreversible cuanto menor es la cantidad adsorbida, ya que la adsorción se estará produciendo en los sitios donde haya mayor afinidad de adsorción. Las desorciones de Clortolurón con solución de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0,01 M resultaron ser siempre menos efectivas que con solución de HPBCD, poniendo de manifiesto la capacidad de extracción de esta ciclodextrina hacia el herbicida adsorbido.

2. La atenuación natural del herbicida Clortolurón en el suelo CV no resultó posible. Tampoco se obtuvo su biodegradación al aplicar solución de nutrientes ni la solución de ciclodextrina (HPBCD), lo que podría indicar que el suelo no posee una flora microbiana adecuada para su degradación.

3. La degradación del herbicida Clortolurón mediante el empleo de un consorcio bacteriano degradador específico de otras fenilureas, tal como diurón, dió lugar a una biodegradación del 100% del herbicida en 20 días cuando la concentración de bacterias aplicadas fue de  $10^9$  UFC/g, no observándose efecto alguno de la adición simultánea de ciclodextrina (HPBCD). Sin embargo, la biodegradación solo fue del 50% tras 60 días de tratamiento cuando la concentración de bacterias empleadas fue de  $10^8$  UFC/g. En este caso la adición de HPBCD presentó mejores porcentajes de biodegradación, alcanzándose hasta un 70% de la misma.

4. Con respecto al estudio de la actividad deshidrogenasa del suelo a lo largo del tiempo al aplicar los distintos tratamientos, se observa que el tratamiento control y los que llevan solo nutrientes o ciclodextrina añadidos no presentan diferencias estadísticamente significativas. La aplicación al suelo del consorcio bacteriano a una concentración de  $10^9$  UFC/g ejerce un efecto positivo en la actividad deshidrogenasa del suelo, algo que no ocurre a la dosis más baja ( $10^8$ ), ni con la adición de HPBCD. Con el paso del tiempo, los valores de actividad deshidrogenasa se van igualando en los distintos tratamientos.





## 6.- BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, J., Dorronsoro, C., Galán, E., Gómez, L. (1999). Criterios y estándares para declarar un suelo como contaminado en Andalucía. Public. Universidad de Sevilla. Disponible en <[www.ugr.es/~fjmartin/INFORMES/Criterios%20y%20estandares.pdf](http://www.ugr.es/~fjmartin/INFORMES/Criterios%20y%20estandares.pdf)> [visado Septiembre 2017]
- Arfaoui, A. E., Sayen, S., Paris, M., keziou, A., Couderchet, M., Guillon, E. (2012). Is organic matter alone sufficient to predict isoproturon sorption in calcereous soils?. *Science of the Total Environment* 432, 251-256.
- Baran, S., Bielinska, J.E. & Oleszczuk, P. (2004). Enzymatic Activity in an Airfield Soil Polluted with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Geoderma*, 118: 221–232.
- Bardi, L., Mattei, A., Steffan, S., Marzona, M. (2000). Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with  $\beta$ - ciclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 709 – 713.
- Barriuso, E., Laird, D.A., Koskinen, W.C., Dowdy, R.H. (1994). Atrazine Desorption from Smectities, *Soil Sci. Soc. Amer. J.*, 1994, pp. 1632-1638.
- Borodina, E., Kelly, D.P., Schumann, P., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., Wood, A.P. (2002). Enzymes of dimethylsulfone metabolism and the phylogenetic characterization of the facultative methylotrophs *Arthrobacter sulfonivorans* sp. nov., *Arthrobacter methylotrophus* sp. nov., and *Hyphomicrobium sulfonivorans* sp. nov. *Archives Microbiology*, 177, 173-183.
- Calvet, R. (1989). Adsorption of organic chemicals in soils (Review). *Environmental Health Perspectives*, 83, 145-177.
- Casida, Jr., L.E., Klein, D.A., Santoro, T. (1964). Soil deshydrogenase activity. *Soil Science* 98, 371-376.
- Cerón, L. E. & Melgarejo, L. M. (2005). Enzimas del Suelo: Indicadores de Salud y Calidad. *Acta Biológica Colombiana*, 10 (1): 5–18.
- Coenye, T., Vanlaere, E., Samyn, E., Falsen, E., Larsson, P., Vandamme, P. (2005). *Advenella incenta* gen., sp. nov. A novel member of the Alcaligenaceae isolated



from various clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55 (1), 251-256.

- ElGouzi, S., Mingorance, M.D., Draoui, K., Chtoun, E.H., Peña, A. (2012). Assessment of phenylurea herbicides sorption on various Mediterranean soils affected by irrigation with wastewater. *Chemosphere* 89, 334-339.

- FAO. (1990). Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. (Versión enmendada). Roma.

- FAO. (2017). Food and Agriculture Organization. Disponible en [http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s0e.htm#introducción10\\_2](http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s0e.htm#introducción10_2) [visado Septiembre 2017].

- FOCUS. (2006). Guidance Documento on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration. Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics, EC Document Reference Sanco/10058/2005 version 2.0, 434.

- GAJDA A., MARTYNIUK S. (2005). Microbial Biomass C and N and Activity of Enzymes in Soil under Winter Wheat Grown in Different Crop Management Systems. *Polish Journal of Environmental Studies* 14(2):159-163.

- García, C., Hernández, T., Costa, F., Ceccanti, B., Masciandaro, G. (1993). The dehydrogenase activity of soil as an ecological marker in processes of perturbed system regeneration. En: Gallardo-Lancho, J. (Ed.), *Proceedings of the XI International Symposium of Environmental Biogeochemistry*. Salamanca. 89–100.

- García, I., Dorronsoro, C. (2017). Contaminación por fitosanitarios. Disponible en <http://www.edafologia.net/conta/tema13/evol.htm> [visado Octubre 2017].

- Garon, D., Sage, L., Wouessidjewe, D., Seigle-Murandi, F. (2004). Enhanced degradation of fluorene in soil slurry by *Absidia cylindrospora* and maltosyl-cyclodextrin. *Chemosphere*, 56, 159 – 166.

- Gee, G., Bauder, J.W. (1986). Particle-size analysis hydrometer a simplified method for routine textural analysis and a sensitive test of measurement parameters. *Soil Science Society of America Journal*, 43, 1004-1007



- Giles, C.H., Smith, D., Huitson, A. (1974). A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. I. Theoretical. *J. Colloid Interf. Sci.* 47, 755–765.
- GIL-SOTRES F., TRASAR-CEPEDA C., LEIRÓS M.C., SEOANE S. (2005). Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry* 37(5):877-887.
- Ghosh, W., Bagchi, A., Mandal, S., Dam, B., Roy, P. (2005). *Tetrathio bacter kashmirensis* gen. nov., sp. Nov., a novel mesophilic, neutrophilic, tetrathionate-oxidizing, facultatively chemolithotrophic betaproteobacterium isolated from soil from a temperate orchard in Jammu and Kashmir, India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1779-1787.
- Ghosh, W., Alam, M., Roy, C., Pyne, P., George, A. (2013). Genome implosion elicits host-confinement in *Alcaligenaceae*: evidence from the comparative genomics of *Tetrathio bacter kashmirensis*, a pathogen in the making. *PLoS ONE*, 8 (5), e64856.
- Gómez, E., Gutiérrez, D., & Hernández, A., Hernández, C. Losada, M. y Mantilla, P. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos, 6(9), 76–84.
- Guitán, F., Carballas, T. (1976). *Técnicas de análisis de suelos*. ED. Pcosacro, Santiago de Compostela.
- Henríquez, C., Uribe, L., Valenciano, A., Nogales, R. (2014). Actividad enzimática del suelo -Deshidrogenasa, -glucosidasa, Fosfatasa y Ureasa- bajo diferentes cultivos 1, 38(1), 43–54.
- Hiller, E., Krascenits, Z., Černánský, S. (2008). Sorption of acetochlor, atrazine, 2,4-D, chlorotoluron, MCPA and trifluralin in six soils from Slovakia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 412-416.
- IUPAC. (2017). International Union of Pure and Applied Chemistry. Disponible en < <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/151.htm> > [visado Octubre 2017].
- Jackson, M.L. (1982). *Análisis químico de los suelos*. 4ª Edición. ED. Omega. Barcelona.



- Kennedy A.C., Smith K.L. (1995). Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. In: Collins H.P., Robertson G.P., Klug M.J. (eds) *The Significance and Regulation of Soil Biodiversity*. Developments in Plant and Soil Sciences, vol 63. Springer, Dordrecht.
- Kim, B.Y., Weon, H.Y., Yoo, S.H., Lee, S.Y., Kwon, S.W., Go S.J. (2006). *Variovorax soli* sp. Nov., isolated from greenhouse soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2899-2901.
- March, G. (2014). *Agricultura y plaguicidas: un análisis global*. FADA - Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina.
- Margesin, R., Walder, G. & Schinner, F. (2000). The Impact of Hydrocarbon Remediation (Diesel Oil and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) on Enzyme Activities and Microbial Properties of Soil. *Acta Biotechnology*, 20 (3-4): 313–333.
- Morillo, E., Pérez-Martínez, J.I., Ginés, J.M. (2001). Leaching of 2,4-D from a soil in the presence of  $\beta$ -cyclodextrin: Laboratory columns experiments. *Chemosphere*, 44 (5), 1065-1069.
- Morillo, E., Sánchez-Trujillo, M.A., Moyano, J.M., Villaverde, J., Gómez-Pantoja, E., Pérez-Martínez, J.I. (2012). Enhanced solubilisation of six PAHs by three synthetic cyclodextrins for remediation applications: molecular modeling of the inclusion complexes. *PLOS ONE*, 7 (9): e44137.
- Morillo, E., Undabeytia, T., Cabrera, A., Villaverde, J., Maqueda, C. (2004). Effect of soil type on adsorption-desorption, mobility, and activity of the herbicide norflurazon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 884-890.
- Nannipieri, P. (1994). The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In: Pankhurst, CE; BM Doube; VVSR Gupta & PR Grace (eds.). *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems*. CSIRO, Australia, pp. 238-244.
- Ochoa, V., Hinojosa, B., Gómez-Muñoz, B. & García-Ruiz, R. (2007). Actividades Enzimáticas como Indicadores de Calidad del Suelo en Agroecosistemas Ecológicos. Universidad de Jaén, *Revista electrónica*, i–x.



- Osgerby, J.M. (1970). Sorption of un-ionised pesticides by soils. In Sorption and transport processes in soils. SCI Monograph No. 37, pp. 63-78.
- Paul E.A., Clark F.E. (2007). Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press. 275 p.
- Pérez-Martínez, J.I., Ginés, J.M., Morillo, E., Moyano, J.R. (2000). <sup>1</sup>H- Nuclear magnetic resonance and phase solubility studies of the stoichiometries in 2,4-D:  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins inclusion complexes. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 37, 171-178.
- RAE. (2017a). Real Academia de la Lengua Española. Disponible en <<http://dle.rae.es/srv/search?m=30&w=herbicida>> [visado Septiembre 2017].
- RAE. (2017b). Real Academia de la Lengua Española. Disponible en <<http://dle.rae.es/srv/search?m=30&w=biodegradaci%C3%B3n>> [visado Octubre 2017].
- Rubio-Bellido, M., Morillo, E., Villaverde, J. (2016). Effect of adition of HPBCD on diuron adsorptio-desorption, transport and mineralization in soils with different properties. Geoderma 196.
- Rubio-Bellido, M., Villaverde, J., Madrid, F., Morillo, E. (2014). Assisted attenuation of a soil contaminated by diuron using hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and organic amendments. Science of theTotal Environment.
- Rubio-Bellido, M. (2014). BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR DIURÓN. ESTIMACIÓN DE SU RIESGO TÓXICO. Public. Universidad de Sevilla. Disponible en <<http://digital.csic.es/handle/10261/153283>> [visado Octubre 2017]
- Sabroso, M., Pastor, A. (2004). Guía sobre suelos contaminados. Public. CEPYME ARAGON. Disponible en <[http://www.conectapyme.com/files/medio/guia\\_suelos\\_contaminados.pdf](http://www.conectapyme.com/files/medio/guia_suelos_contaminados.pdf)> [visado Octubre 2017]
- Sheng, G., Johnton, C.T., Teppen, B.J., Boyd, S.A. (2001). Potencial contributions of smectite clays and organic matter to pesticide retention in soils". Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 2899-2907.



- Skujins, J. (1973). Deshydrogenase: An indicator of biological activities in arid soils. *Bulletin of Ecological Research Communications (Stockholm)* 17, 235-241.
- Sopena, F., Laiz, L., Morillo, E., Sanchez-Trujillo, M.A., Villaverde, J., Jurado, V., Saiz-Jimenez, C. (2014). Phenanthrene Biodegradation by *Pseudomonas xanthomarina* Isolated from an Aged Contaminated Soil. *Clean - Soil, Air, Water*, 42, (6) 785-790.
- Sorensen, S.R., Albers, C.N., Aamand, J. (2008). Rapid Mineralization of the Phenylurea Herbicide Diuron by *Variovorax* sp. Strain SRS16 in Pure Culture and within a Two-Member Consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2332-2340.
- Suddaby, L. A., Beulke, S., Beinum, W. Van, Oliver, R. G., Kuet, S., & Brown, C. D. (2016). Chemosphere Long-term experiments to investigate irreversibility in sorption of pesticides to soil. *Chemosphere*, 162, 40–47.
- Tejada, M. (2009). Chemosphere Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate + diflufenican herbicides. *Chemosphere*, 76(3), 365–373.
- Thomassin-Lacroix, E.J.M., Eriksson, M., Reimer, K.J., Hohn, W.W. (2002). Bioestimulation and bioaugmentation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 551-556.
- Tomlin, C.D.S. (2000). Ed. Diurón. *The pesticide manual Handbook* 12th ed. British Crop Protection Council. Surrey, UK, 276-277.
- Towell, M.G., Bellarby, J., Paton, G.I., Coulon, F., Pollard, Simon J.T., Semple, K.T. (2011a). Mineralisation of target hydrocarbons in three contaminated soils from former refinery facilities. *Environmental Pollution*, 159, 515-523.
- Towell, M.G., Paton, G.I., Semple, K.T. (2011b). The biodegradation of cable oil components: Impact of oil concentration, nutrient addition and bioaugmentation. *Environmental Pollution*, 159, 3777-3783.
- Trevors, J.T., Mayfield, C.I., Inness, W.E. (1982). Measurement of electron transport system (ETS) activity in soil. *Microbial Ecology*, 8: 163–168.



- Villaverde, J., Maqueda, C., Morillo, E. (2005). Improvement of the desorption of the herbicide norflurazon from soils via complexation with  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5366 – 5372.
- Villaverde, J., Posada-Baquero, R., Rubio-Bellido, M., Laiz, L., Saiz-Jimenez, C., Sánchez-Trujillo, M.A., Morillo, E. (2012). Enhanced mineralization of diuron using a cyclodextrin-based bioremediation technology. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9941-9947.
- J. Villaverde, M. Rubio-Bellido, F. Merchán, E. Morillo. (2017). Bioremediation of diuron contaminated soils by a novel degrading microbial consortium. *Journal of Environmental Management* 188, 379-386.
- Walkley, A., Black, I.A. (1934). An examination of the Degtajereff method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*. 37, 29-38.
- Wauchope R.D., Yeh S., Linders J.B., Kloskowski R., Tanaka K., Rubin B., Katayama A., Kördel W., Gerstl Z., Lane M., Unsworth J. (2002). Pesticide sorption parameters: theory, measurements, uses, limitations and reliability. *Pest Management Science*, 58, 419-455.
- Widehem, P., Aït-Aïssa, S., Tixier, C., Sancelme, M., Veschambre, H., Truffaut, N. (2002). Isolation, characterization and diuron transformation capacities of a bacterial strain *Arthrobacter* sp. N2. *Chemosphere*, 46, 527-534.



**RECUPERACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO POR EL HERBICIDA CLORTOLURÓN APLICANDO UN CONSORCIO BACTERIANO DEGRADADOR ESPECÍFICO Y CICLODEXTRINAS.**

*Bibliografía*



## ANEXO I: ESTUDIO ESTADÍSTICO

### Factores dentro de sujetos

Medida: AE

Tiempo	Variable dependiente
1	AE1
2	AE7
3	AE15
4	AE30
5	AE60

### Factores inter-sujetos

TRATA	Etiqueta de valor	N
1	CI	2
2	CL+SNS	2
3	CL+SNS+HP	2
4	CL+SNS+B9	2
5	CL+SNS+B9+HP	2
6	CL+SNS+B8	2
7	CL+SNS+B8+HP	2

### Estadísticos descriptivos

TRATA	Media	Desviación estándar	N	
AE1	CI	,36100	,008485	2
	CL+SNS	,45550	,101116	2
	CL+SNS+HP	,56500	,091924	2
	CL+SNS+B9	8,35550	4,311230	2
	CL+SNS+B9+HP	7,63550	3,909593	2
	CL+SNS+B8	1,02050	,074246	2
	CL+SNS+B8+HP	1,48250	,433456	2
	Total	2,83936	3,774810	14
AE7	CI	,29750	,099702	2
	CL+SNS	,20300	,096167	2
	CL+SNS+HP	,29650	,044548	2
	CL+SNS+B9	2,76450	,101116	2



	CL+SNS+B9+HP	4,78650	1,327239	2
	CL+SNS+B8	,89250	,017678	2
	CL+SNS+B8+HP	1,17250	,000707	2
	Total	1,48757	1,680135	14
AE15	CI	,14650	,002121	2
	CL+SNS	,38050	,030406	2
	CL+SNS+HP	,53050	,177484	2
	CL+SNS+B9	1,26600	,434164	2
	CL+SNS+B9+HP	1,66050	,157685	2
	CL+SNS+B8	,45450	,505581	2
	CL+SNS+B8+HP	1,22300	,101823	2
	Total	,80879	,580044	14
AE30	CI	,28250	,010607	2
	CL+SNS	,19350	,021920	2
	CL+SNS+HP	,21700	,035355	2
	CL+SNS+B9	,86100	,094752	2
	CL+SNS+B9+HP	,29000	,138593	2
	CL+SNS+B8	,38200	,087681	2
	CL+SNS+B8+HP	1,37700	,131522	2
	Total	,51471	,430528	14
AE60	CI	,28950	,180312	2
	CL+SNS	,15850	,044548	2
	CL+SNS+HP	,53450	,320319	2
	CL+SNS+B9	,43150	,222739	2
	CL+SNS+B9+HP	1,17050	,637103	2
	CL+SNS+B8	,44600	,039598	2
	CL+SNS+B8+HP	,72950	,062933	2
	Total	,53714	,384585	14

### Pruebas multivariante

Efecto		Valor	F	Gl de hipótesis	gl de error
Tiempo	Traza de Pillai	,979	46,671	4,000	4,000
	Lambda de Wilks	,021	46,671	4,000	4,000
	Traza de Hotelling	46,671	46,671	4,000	4,000
	Raíz mayor de Roy	46,671	46,671	4,000	4,000
Tiempo * TRATA	Traza de Pillai	2,284	1,552	24,000	28,000
	Lambda de Wilks	,000	5,709	24,000	15,164
	Traza de Hotelling	136,500	14,219	24,000	10,000
	Raíz mayor de Roy	119,622	139,559	6,000	7,000



**Pruebas multivariante**

Efecto		Sig.	Eta parcial al cuadrado
Tiempo	Traza de Pillai	,001	,979
	Lambda de Wilks	,001	,979
	Traza de Hotelling	,001	,979
	Raíz mayor de Roy	,001	,979
Tiempo * TRATA	Traza de Pillai	,132	,571
	Lambda de Wilks	,000	,866
	Traza de Hotelling	,000	,972
	Raíz mayor de Roy	,000	,992

**Prueba de esfericidad de Mauchly**

Medida: AE

Efecto inter sujetos	W de Mauchly	Aprox. Chi-cuadrado	gl	Sig.	Épsilon Greenhouse-Geisser
Tiempo	,000	49,013	9	,000	,280

**Pruebas de efectos dentro de sujetos**

Medida: AE

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F
Tiempo	Esfericidad asumida	53,553	4	13,388	12,064
	Greenhouse-Geisser	53,553	1,118	47,899	12,064
	Huynh-Feldt	53,553	2,321	23,073	12,064
	Límite inferior	53,553	1,000	53,553	12,064
Tiempo * TRATA	Esfericidad asumida	107,547	24	4,481	4,038
	Greenhouse-Geisser	107,547	6,708	16,032	4,038
	Huynh-Feldt	107,547	13,926	7,723	4,038
	Límite inferior	107,547	6,000	17,924	4,038
Error(Tiempo)	Esfericidad asumida	31,072	28	1,110	
	Greenhouse-Geisser	31,072	7,826	3,970	
	Huynh-Feldt	31,072	16,247	1,912	
	Límite inferior	31,072	7,000	4,439	



**Pruebas de efectos dentro de sujetos**

Medida: AE

Origen		Sig.	Eta parcial al cuadrado
Tiempo	Esfericidad asumida	,000	,633
	Greenhouse-Geisser	,008	,633
	Huynh-Feldt	,000	,633
	Límite inferior	,010	,633
Tiempo * TRATA	Esfericidad asumida	,000	,776
	Greenhouse-Geisser	,036	,776
	Huynh-Feldt	,004	,776
	Límite inferior	,045	,776
Error(Tiempo)	Esfericidad asumida		
	Greenhouse-Geisser		
	Huynh-Feldt		
	Límite inferior		

**Pruebas de contrastes dentro de sujetos**

Medida: AE

Origen	Tiempo	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tiempo	Lineal	43,549	1	43,549	31,568	,001
	Cuadrático	9,817	1	9,817	4,755	,066
	Cúbico	,178	1	,178	,235	,643
	Orden 4	,010	1	,010	,041	,846
Tiempo * TRATA	Lineal	81,183	6	13,530	9,808	,004
	Cuadrático	21,142	6	3,524	1,707	,250
	Cúbico	4,819	6	,803	1,061	,463
	Orden 4	,403	6	,067	,282	,928
Error(Tiempo)	Lineal	9,657	7	1,380		
	Cuadrático	14,450	7	2,064		
	Cúbico	5,299	7	,757		
	Orden 4	1,666	7	,238		



### Pruebas de contrastes dentro de sujetos

Medida: AE

Origen	Tiempo	Eta parcial al cuadrado
Tiempo	Lineal	,819
	Cuadrático	,405
	Cúbico	,032
	Orden 4	,006
Tiempo * TRATA	Lineal	,894
	Cuadrático	,594
	Cúbico	,476
	Orden 4	,195
Error(Tiempo)	Lineal	
	Cuadrático	
	Cúbico	
	Orden 4	

### Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error

	F	df1	df2	Sig.
AE1	.	6	7	.
AE7	.	6	7	.
AE15	.	6	7	.
AE30	.	6	7	.
AE60	.	6	7	.

### Pruebas de efectos inter-sujetos

Medida: AE

Variable transformada: Media

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado
Intersección	107,201	1	107,201	125,701	,000	,947
TRATA	86,054	6	14,342	16,817	,001	,935
Error	5,970	7	,853			



## Medias marginales estimadas

### 1. Gran media

Medida: AE

Media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
1,238	,110	,977	1,499

## Modelo lineal general

### 2. TRATAMIENTO

#### Estimaciones

Medida: AE

TRATA	Media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
CI	,275	,292	-,415	,966
CL+SNS	,278	,292	-,412	,969
CL+SNS+HP	,429	,292	-,262	1,119
CL+SNS+B9	2,736	,292	2,045	3,426
CL+SNS+B9+HP	3,109	,292	2,418	3,799
CL+SNS+B8	,639	,292	-,051	1,330
CL+SNS+B8+HP	1,197	,292	,506	1,887

#### Comparaciones por parejas

Medida: AE

(I) TRATA	(J) TRATA	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza para diferencia	
					Límite inferior	Límite superior
CI	CL+SNS	-,003	,413	,995	-,979	,974
	CL+SNS+HP	-,153	,413	,721	-1,130	,823
	CL+SNS+B9	-2,460	,413	,001	-3,437	-1,484
	CL+SNS+B9+HP	-2,833	,413	,000	-3,810	-1,857
	CL+SNS+B8	-,364	,413	,408	-1,340	,613
	CL+SNS+B8+HP	-,922	,413	,061	-1,898	,055
CL+SNS	CI	,003	,413	,995	-,974	,979
	CL+SNS+HP	-,151	,413	,726	-1,127	,826
	CL+SNS+B9	-2,458	,413	,001	-3,434	-1,481
	CL+SNS+B9+HP	-2,830	,413	,000	-3,807	-1,854



**RECUPERACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO POR EL HERBICIDA CLORTOLURÓN APLICANDO UN CONSORCIO BACTERIANO DEGRADADOR ESPECÍFICO Y CICLODEXTRINAS.**

*Anexo I*

	CL+SNS+B8	-,361	,413	,411	-1,337	,616
	CL+SNS+B8+HP	-,919	,413	,061	-1,895	,058
CL+SNS+HP	CI	,153	,413	,721	-,823	1,130
	CL+SNS	,151	,413	,726	-,826	1,127
	CL+SNS+B9	-2,307	,413	,001	-3,284	-1,330
	CL+SNS+B9+HP	-2,680	,413	,000	-3,656	-1,703
	CL+SNS+B8	-,210	,413	,626	-1,187	,766
	CL+SNS+B8+HP	-,768	,413	,105	-1,745	,208
	CL+SNS+B9	CI	2,460	,413	,001	1,484
CL+SNS		2,458	,413	,001	1,481	3,434
CL+SNS+HP		2,307	,413	,001	1,330	3,284
CL+SNS+B9+HP		-,373	,413	,397	-1,349	,604
CL+SNS+B8		2,097	,413	,001	1,120	3,073
CL+SNS+B8+HP		1,539	,413	,007	,562	2,515
CL+SNS+B9+HP		CI	2,833	,413	,000	1,857
	CL+SNS	2,830	,413	,000	1,854	3,807
	CL+SNS+HP	2,680	,413	,000	1,703	3,656
	CL+SNS+B9	,373	,413	,397	-,604	1,349
	CL+SNS+B8	2,470	,413	,001	1,493	3,446
	CL+SNS+B8+HP	1,912	,413	,002	,935	2,888
	CL+SNS+B8	CI	,364	,413	,408	-,613
CL+SNS		,361	,413	,411	-,616	1,337
CL+SNS+HP		,210	,413	,626	-,766	1,187
CL+SNS+B9		-2,097	,413	,001	-3,073	-1,120
CL+SNS+B9+HP		-2,470	,413	,001	-3,446	-1,493
CL+SNS+B8+HP		-,558	,413	,219	-1,534	,419
CL+SNS+B8+HP		CI	,922	,413	,061	-,055
	CL+SNS	,919	,413	,061	-,058	1,895
	CL+SNS+HP	,768	,413	,105	-,208	1,745
	CL+SNS+B9	-1,539	,413	,007	-2,515	-,562
	CL+SNS+B9+HP	-1,912	,413	,002	-2,888	-,935
	CL+SNS+B8	,558	,413	,219	-,419	1,534



### Pruebas univariadas

Medida: AE

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado
Contraste	17,211	6	2,868	16,817	,001	,935
Error	1,194	7	,171			

### 3. Tiempo

#### Estimaciones

Medida: AE

Tiempo	Media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1	2,839	,590	1,445	4,234
2	1,488	,135	1,168	1,807
3	,809	,072	,638	,980
4	,515	,024	,459	,571
5	,537	,078	,352	,722

#### Comparaciones por parejas

Medida: AE

(I) Tiempo	(J) Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza para diferencia Límite inferior
1	2	1,352	,681	,087	-,258
	3	2,031	,617	,013	,572
	4	2,325	,587	,005	,936
	5	2,302	,531	,003	1,046
2	1	-1,352	,681	,087	-2,961
	3	,679	,170	,005	,276
	4	,973	,151	,000	,615
	5	,950	,201	,002	,475
3	1	-2,031	,617	,013	-3,490
	2	-,679	,170	,005	-1,081
	4	,294	,061	,002	,150
	5	,272	,114	,048	,003
4	1	-2,325	,587	,005	-3,713
	2	-,973	,151	,000	-1,330
	3	-,294	,061	,002	-,438



	5		-,022	,074	,770	-,197
5	1		-2,302	,531	,003	-3,559
	2		-,950	,201	,002	-1,426
	3		-,272	,114	,048	-,540
	4		,022	,074	,770	-,152

### Comparaciones por parejas

Medida: AE

95% de intervalo de confianza para  
diferencia

(I) Tiempo	(J) Tiempo	Límite superior
1	2	2,961
	3	3,490
	4	3,713
	5	3,559
2	1	,258
	3	1,081
	4	1,330
	5	1,426
3	1	-,572
	2	-,276
	4	,438
	5	,540
4	1	-,936
	2	-,615
	3	-,150
	5	,152
5	1	-1,046
	2	-,475
	3	-,003
	4	,197

### Pruebas multivariante

	Valor	F	Gl de hipótesis	gl de error	Sig.	Eta parcial al cuadrado
Traza de Pillai	,979	46,671	4,000	4,000	,001	,979
Lambda de Wilks	,021	46,671	4,000	4,000	,001	,979
Traza de Hotelling	46,671	46,671	4,000	4,000	,001	,979
Raíz mayor de Roy	46,671	46,671	4,000	4,000	,001	,979



#### 4. TRATA \* Tiempo

Medida: AE

TRATA	Tiempo	Media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
CI	1	,361	1,560	-3,329	4,051
	2	,298	,358	-,549	1,144
	3	,147	,191	-,306	,599
	4	,283	,063	,134	,431
	5	,290	,207	-,199	,778
CL+SNS	1	,456	1,560	-3,234	4,145
	2	,203	,358	-,643	1,049
	3	,381	,191	-,072	,833
	4	,194	,063	,045	,342
	5	,159	,207	-,330	,647
CL+SNS+HP	1	,565	1,560	-3,125	4,255
	2	,297	,358	-,550	1,143
	3	,531	,191	,078	,983
	4	,217	,063	,069	,365
	5	,535	,207	,046	1,023
CL+SNS+B9	1	8,356	1,560	4,666	12,045
	2	2,765	,358	1,918	3,611
	3	1,266	,191	,814	1,718
	4	,861	,063	,713	1,009
	5	,432	,207	-,057	,920
CL+SNS+B9+HP	1	7,636	1,560	3,946	11,325
	2	4,787	,358	3,940	5,633
	3	1,661	,191	1,208	2,113
	4	,290	,063	,142	,438
	5	1,171	,207	,682	1,659
CL+SNS+B8	1	1,021	1,560	-2,669	4,710
	2	,893	,358	,046	1,739
	3	,455	,191	,002	,907
	4	,382	,063	,234	,530
	5	,446	,207	-,043	,935
CL+SNS+B8+HP	1	1,483	1,560	-2,207	5,172
	2	1,173	,358	,326	2,019
	3	1,223	,191	,771	1,675
	4	1,377	,063	1,229	1,525
	5	,730	,207	,241	1,218



## Pruebas post hoc

### TRATAMIENTO

#### Comparaciones múltiples

Medida: AE

(I) TRATA	(J) TRATA	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
					Límite inferior	Límite superior	
DMS	CI	CL+SNS	-,00280	,412995	,995	-,97938	,97378
		CL+SNS+HP	-,15330	,412995	,721	-1,12988	,82328
		CL+SNS+B9	-2,46030	,412995	,001	-3,43688	-1,48372
		CL+SNS+B9+H	-2,83320	,412995	,000	-3,80978	-1,85662
		P					
		CL+SNS+B8	-,36370	,412995	,408	-1,34028	,61288
		CL+SNS+B8+H	-,92150	,412995	,061	-1,89808	,05508
	P						
	CL+SNS	CI	,00280	,412995	,995	-,97378	,97938
		CL+SNS+HP	-,15050	,412995	,726	-1,12708	,82608
		CL+SNS+B9	-2,45750	,412995	,001	-3,43408	-1,48092
		CL+SNS+B9+H	-2,83040	,412995	,000	-3,80698	-1,85382
		P					
		CL+SNS+B8	-,36090	,412995	,411	-1,33748	,61568
		CL+SNS+B8+H	-,91870	,412995	,061	-1,89528	,05788
	P						
	CL+SNS+HP	CI	,15330	,412995	,721	-,82328	1,12988
		CL+SNS	,15050	,412995	,726	-,82608	1,12708
		CL+SNS+B9	-2,30700	,412995	,001	-3,28358	-1,33042
		CL+SNS+B9+H	-2,67990	,412995	,000	-3,65648	-1,70332
		P					
CL+SNS+B8		-,21040	,412995	,626	-1,18698	,76618	
CL+SNS+B8+H		-,76820	,412995	,105	-1,74478	,20838	
P							
CL+SNS+B9	CI	2,46030	,412995	,001	1,48372	3,43688	
	CL+SNS	2,45750	,412995	,001	1,48092	3,43408	
	CL+SNS+HP	2,30700	,412995	,001	1,33042	3,28358	
	CL+SNS+B9+H	-,37290	,412995	,397	-1,34948	,60368	
	P						
	CL+SNS+B8	2,09660	,412995	,001	1,12002	3,07318	
	CL+SNS+B8+H	1,53880	,412995	,007	,56222	2,51538	
P							



**RECUPERACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO POR EL HERBICIDA CLORTOLURÓN APLICANDO UN CONSORCIO BACTERIANO DEGRADADOR ESPECÍFICO Y CICLODEXTRINAS.**

*Anexo I*

CL+SNS+B9+H	CI	2,83320	,412995	,000	1,85662	3,80978
P	CL+SNS	2,83040	,412995	,000	1,85382	3,80698
	CL+SNS+HP	2,67990	,412995	,000	1,70332	3,65648
	CL+SNS+B9	,37290	,412995	,397	-,60368	1,34948
	CL+SNS+B8	2,46950	,412995	,001	1,49292	3,44608
	CL+SNS+B8+H	1,91170	,412995	,002	,93512	2,88828
	P					
CL+SNS+B8	CI	,36370	,412995	,408	-,61288	1,34028
	CL+SNS	,36090	,412995	,411	-,61568	1,33748
	CL+SNS+HP	,21040	,412995	,626	-,76618	1,18698
	CL+SNS+B9	-2,09660	,412995	,001	-3,07318	-1,12002
	CL+SNS+B9+H	-2,46950	,412995	,001	-3,44608	-1,49292
	P					
CL+SNS+B8+H	CI	,92150	,412995	,061	-,05508	1,89808
	CL+SNS	,91870	,412995	,061	-,05788	1,89528
	CL+SNS+HP	,76820	,412995	,105	-,20838	1,74478
	CL+SNS+B9	-1,53880	,412995	,007	-2,51538	-,56222
	CL+SNS+B9+H	-1,91170	,412995	,002	-2,88828	-,93512
	P					
P	CL+SNS+B8	,55780	,412995	,219	-,41878	1,53438
	CL+SNS	-,00280	,039406	1,000	-3,68395	3,67835
	CL+SNS+HP	-,15330	,050735	,877	-1,19244	,88584
	CL+SNS+B9	-2,46030	,581890	,964	-147,81514	142,89454
	CL+SNS+B9+H	-2,83320	,498590	,911	-125,43677	119,77037
	P					
Tamhane	CL+SNS+B8	-,36370	,075153	,739	-3,22266	2,49526
	CL+SNS+B8+H	-,92150	,083271	,368	-5,00334	3,16034
	P					
	CL+SNS	,00280	,039406	1,000	-3,67835	3,68395
	CL+SNS+HP	-,15050	,036868	,914	-3,19429	2,89329
	CL+SNS+B9	-2,45750	,580845	,965	-153,21995	148,30495
P	CL+SNS+B9+H	-2,83040	,497370	,914	-131,67402	126,01322
	P					
	CL+SNS+B8	-,36090	,066581	,898	-12,10106	11,37926
	CL+SNS+B8+H	-,91870	,075626	,624	-15,43822	13,60082
	P					
	CL+SNS+HP	,15330	,050735	,877	-,88584	1,19244
P	CL+SNS	,15050	,036868	,914	-2,89329	3,19429
	CL+SNS+B9	-2,30700	,581724	,972	-148,50472	143,89072



**RECUPERACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO POR EL HERBICIDA CLORTOLURÓN APLICANDO UN CONSORCIO BACTERIANO DEGRADADOR ESPECÍFICO Y CICLODEXTRINAS.**

*Anexo I*

	CL+SNS+B9+H P	-2,67990	,498396	,924	-126,24834	120,88854
	CL+SNS+B8	-,21040	,073854	,959	-3,45505	3,03425
	CL+SNS+B8+H P	-,76820	,082101	,481	-5,42371	3,88731
CL+SNS+B9	CI	2,46030	,581890	,964	-142,89454	147,81514
	CL+SNS	2,45750	,580845	,965	-148,30495	153,21995
	CL+SNS+HP	2,30700	,581724	,972	-143,89072	148,50472
	CL+SNS+B9+H P	-,37290	,764474	1,000	-16,71643	15,97063
	CL+SNS+B8	2,09660	,584360	,979	-131,50377	135,69697
	CL+SNS+B8+H P	1,53880	,585459	,995	-127,25463	130,33223
CL+SNS+B9+H P	CI	2,83320	,498590	,911	-119,77037	125,43677
	CL+SNS	2,83040	,497370	,914	-126,01322	131,67402
	CL+SNS+HP	2,67990	,498396	,924	-120,88854	126,24834
	CL+SNS+B9	,37290	,764474	1,000	-15,97063	16,71643
	CL+SNS+B8	2,46950	,501470	,934	-106,97925	111,91825
	CL+SNS+B8+H P	1,91170	,502751	,971	-102,32036	106,14376
CL+SNS+B8	CI	,36370	,075153	,739	-2,49526	3,22266
	CL+SNS	,36090	,066581	,898	-11,37926	12,10106
	CL+SNS+HP	,21040	,073854	,959	-3,03425	3,45505
	CL+SNS+B9	-2,09660	,584360	,979	-135,69697	131,50377
	CL+SNS+B9+H P	-2,46950	,501470	,934	-111,91825	106,97925
	CL+SNS+B8+H P	-,55780	,099067	,487	-2,64305	1,52745
CL+SNS+B8+H P	CI	,92150	,083271	,368	-3,16034	5,00334
	CL+SNS	,91870	,075626	,624	-13,60082	15,43822
	CL+SNS+HP	,76820	,082101	,481	-3,88731	5,42371
	CL+SNS+B9	-1,53880	,585459	,995	-130,33223	127,25463
	CL+SNS+B9+H P	-1,91170	,502751	,971	-106,14376	102,32036
	CL+SNS+B8	,55780	,099067	,487	-1,52745	2,64305



### Subconjuntos homogéneos

		AE		
		N	Subconjunto	
Duncan	TRATA		1	2
	Cl	2	,27540	
	CL+SNS	2	,27820	
	CL+SNS+HP	2	,42870	
	CL+SNS+B8	2	,63910	
	CL+SNS+B8+HP	2	1,19690	
	CL+SNS+B9	2		2,73570
	CL+SNS+B9+HP	2		3,10860
	Sig.		,076	,397