

INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES  
Y AGROBIOLÓGICAS DE SEVILLA.  
C.S.I.C.



FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



**AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES  
DE CLORPIRIFÓS, FENANTRENO Y PIRENO, PARA SU USO  
EN BIORRECUPERACIÓN DE AGUAS Y SUELOS  
CONTAMINADOS.**



ÁNGELA DEL VALLE, LÓPEZ GARCÍA

SEVILLA, JULIO 2018

Grado en Farmacia, Departamento Microbiología y Parasitología.

Trabajo Fin de Grado Experimental.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA



Trabajo Fin de Grado, Grado en Farmacia

**AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE CLORPIRIFÓS,  
FENANTRENO Y PIRENO, PARA SU USO EN BIORRECUPERACIÓN DE AGUAS Y SUELOS  
CONTAMINADOS.**

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla  
Departamento Agroquímica, Microbiología Ambiental y Conservación de suelos.

**LOS TUTORES**

**Dr. D. Jaime Villaverde Capellán**  
Científico Titular CSIC  
(IRNAS-CSIC)  
TUTOR DE CENTRO

**Graduada. D<sup>a</sup>. Alba Lara Moreno**  
Predoctoral FPU  
(IRNAS -CSIC)  
TUTOR COLABORADOR

**PROFESOR TUTOR**

**Dr. D. Francisco Merchán Ignacio**  
Departamento de Microbiología y Parasitología  
Facultad de Farmacia

**Departamento de Microbiología y Parasitología**  
**Trabajo Fin de Grado Experimental**

Ángela del Valle, López García  
**SEVILLA, JULIO 2018**

ÍNDICE.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
RESUMEN.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
1.1. Problemática medioambiental derivada de la presencia de contaminantes orgánicos....	6
1.2. Plaguicidas.....	7
1.2.1. Organofosforados. Clorpirifós.....	7
1.3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs).....	8
1.4. Biodegradación, mineralización, biodisponibilidad, bioaccesibilidad, y envejecimiento..	9
1.4.1. Papel de los consorcios microbianos en la biodegradación.....	11
1.5. Bioestimulación y bioaumentación.....	13
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>15</b>
3.1. Materiales.....	15
3.1.1. Cepas bacterianas aisladas.....	15
3.1.2. Consorcios microbianos.....	15
3.1.3. Plaguicidas.....	17
3.1.4. Hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	17
3.1.5. Solución de nutrientes (SNs).....	17
3.1.6. Medios de cultivos.....	18
3.1.7. Suelo.....	18
3.2. Métodos.....	19
3.2.1. Enriquecimiento de suelos.....	19
3.2.2. Preparación de inóculos de los consorcios microbianos y cepas bacterianas aisladas	19
3.2.3. Determinación de la demanda biológica de oxígeno.....	20
3.2.4. Estudio de mineralización de clorpirifós, fenantreno y pireno en solución y en suelo.....	22
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>24</b>
4.1. Demanda biológica de oxígeno.....	24
4.2. Mineralización de clorpirifós, fenantreno y pireno en solución.....	26
4.3. Mineralización de fenantreno y pireno en suelo.....	29
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>34</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Nomenclatura utilizada para las bacterias aisladas de suelo y solución de clorpirifós contaminada.....	15
<b>Tabla 2.</b> Nomenclatura utilizada para los consorcios microbianos empleados en este trabajo.....	15
<b>Tabla 3.</b> Solución de nutrientes (SNs).....	17
<b>Tabla 4.</b> Medios de cultivos empleados.....	18
<b>Tabla 5.</b> Propiedades físico- químicas del suelo empleado.....	18
<b>Tabla 6.</b> Factor de conversión de valores obtenidos en el experimento de demanda biológica de oxígeno.....	22
<b>Tabla 7.</b> Ensayos de mineralización de clorpirifós, fenantreno y pireno en solución, y en suelo.....	23
<b>Tabla 8.</b> Mg consumidos de oxígeno L <sup>-1</sup> a los diferentes tiempos del ensayo en el oxitop...	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química del insecticida, clorpirifós.....	7
<b>Figura 2.</b> Estructura química de fenantreno.....	8
<b>Figura 3.</b> Estructura química de pireno.....	9
<b>Figura 4.</b> Concepto de biodisponibilidad y bioaccesibilidad de un contaminante en el suelo.....	10
<b>Figura 5.</b> Consorcio microbianos y cepas bacterianas aisladas sembradas en cuadrante en placa petri con medio LB-agar (Luria Bertani).....	16
<b>Figura 6.</b> Preparación de los inóculos de las cepas bacterianas aisladas y los consorcios de microorganismos.....	19
<b>Figura 7.</b> Cabezal del oxitop y cabina termostática.....	21
<b>Figura 8.</b> Respirómetro empleado para los estudios de mineralización de contaminantes y trampa de álcali antes de ser incorporada al matraz erlenmeyer.....	22
<b>Figura 9.</b> Graficas de mg oxígeno consumido L <sup>-1</sup> frente al tiempo de ensayo.....	25
<b>Figura 10.</b> Porcentaje mineralizado de los contaminantes clorpirifós, fenantreno y pireno en solución.....	28-29
<b>Figura 11.</b> Porcentaje mineralizado en suelo de cada PAHs frente al tiempo de ensayo	30

## RESUMEN

**Título:** *Aislamiento de microorganismos degradadores de clorpirifós, fenantreno y pireno para su uso en la biorrecuperación de aguas y suelos contaminados.*

En este Trabajo de Fin de Grado Experimental se ha desarrollado y evaluado una técnica de biorrecuperación de suelos contaminados por clorpirifós, fenantreno y pireno. Estos contaminantes están ampliamente distribuidos en el medioambiente, lo que supone un riesgo para la salud humana.

Con esta técnica de biorrecuperación se pretende conseguir un incremento en la tasa de mineralización de estos contaminantes mediante la inoculación con cepas bacterianas aisladas y consorcios microbianos procedentes de un suelo agrícola, obtenidos a partir de cultivos de enriquecimiento.

La demanda biológica de oxígeno (DBO), es una prueba previa para determinar que el medio contaminado posee las condiciones adecuadas para el desarrollo de las cepas bacterianas aisladas y de los consorcios microbianos empleados en la biorrecuperación, los contaminantes constituyen la única fuente de energía y carbono. Se observó que los medios con clorpirifós y pireno eran propicios para el desarrollo de las cepas B1, B2, B3, B4 y los consorcios C1 y C2, midiendo para ello los mg de oxígeno consumidos L<sup>-1</sup>.

Los estudios de mineralización se llevaron a cabo utilizando respirómetros con soluciones o suspensiones de suelo, en agitación continua.

En el tiempo de ensayo se llegó a observar que en las soluciones contaminadas con fenantreno, e inoculadas con el consorcio microbiano C1, se alcanzó un porcentaje de mineralización del 30%. Cuando se utilizó el consorcio microbiano C1 en las muestras de suelo Andújar (contaminado con fenantreno y pireno), se cuantificó una mineralización del pireno inferior al 20% (inferior a lo alcanzado en solución) y ligeramente superior al 20% en el caso del fenantreno.

**Palabras claves:** clorpirifós, fenantreno, pireno, biodegradación y microorganismos degradadores.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **CLP:** clorpirifós.
- **DBO:** demanda biológica de oxígeno.
- **LB:** medio de cultivo Difco™ LB Broth, Miller Luria-Bertani.
- **MSM:** mineral salts medium.
- **PAHs:** hidrocarburos aromáticos policíclicos.
- **PHE:** fenantreno.
- **PYR:** pireno.
- **SNs:** solución de micronutrientes.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. PROBLEMÁTICA MEDIOAMBIENTAL DERIVADA DE LA PRESENCIA DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS**

Debido al aumento demográfico a escala mundial, en los últimos años, se ha tendido hacia una agricultura intensiva, ya que las plantas constituyen la principal fuente de alimentos en el mundo. El aumento de la productividad se ha desarrollado con la difusión de nuevas variedades de cultivo de alto rendimiento, unido a nuevas prácticas agrícolas que utilizan grandes cantidades de fertilizantes, insecticidas y plaguicidas, así como tractores y otra maquinaria pesada. Los beneficios alcanzados por esta mejora agrícola son indiscutibles, pero han surgido diversos problemas entre los que destacan los daños medioambientales generados, incluyendo la erosión del suelo, la salinización, el anegamiento de suelos muy irrigados, el agotamiento de acuíferos, deforestación, *etc.*, así como la contaminación del medioambiente por el uso excesivo de plaguicidas.

En ocasiones los plaguicidas no alcanzan su objetivo y al llegar a la superficie del suelo pueden sufrir una serie de procesos tales como degradación química y/o biológica, fotodescomposición, *etc.* También pueden producirse pérdidas por escorrentías y lixiviación, pudiendo alcanzar y contaminar las aguas subterráneas, lo que supone un gran riesgo para la salud humana (Rubio-Bellido *et al.*, 2016).

No obstante, hay que reconocer que los plaguicidas, contribuyen significativamente al mantenimiento y protección de los cultivos, siendo indispensables en la agricultura moderna. Sin embargo a pesar de los beneficios, en la sociedad hay una urgente necesidad de optimizar sus usos, no sólo en respuesta a las normativas establecidas sobre contaminación medioambiental, sino también para asegurar el mantenimiento de estos como una herramienta efectiva y valiosa para los agricultores del futuro (Kudsk y Streibig, 2003).

Por otro lado la contaminación de suelos, aguas subterráneas y superficiales por hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) es un tema de gran interés a nivel mundial. Muchos de estos compuestos constituyen una amenaza para la salud humana y el medio ambiente. El suelo es el principal sumidero para la mayoría de los PAHs. Su contaminación puede ser debida a accidentes industriales y a actividades antropogénicas, y constituyen un fuente de contaminación del medioambiente a largo plazo (Wong *et al.*, 2009).



## 1.2. PLAGUICIDAS

Los plaguicidas son compuestos sintéticos extensivamente usados en cultivos para protegerlos de plagas. El uso estimado de plaguicidas en el mundo es de 2 millones de toneladas por año, de los que 45% es usado en Europa, 25% en USA, y 25% en el resto del mundo. El 80 % de los plaguicidas son usados en forma de insecticidas, el 15% son herbicidas y el 2% son fungicidas (Agarwal *et al.*, 2015). Se pueden encontrar residuos de plaguicidas en el aire, suelo, agua superficial y subterránea.

Una familia de estos plaguicidas son los organoclorados (lindano, heptacloro, diclorodifeniltricloroetano (DDT), *etc.*). Estos compuestos tienen una amplia persistencia, tendencia para bioacumularse y un elevado potencial tóxico en organismos no diana. Por ello, este grupo de plaguicidas ha sido reemplazado por los organofosforados (OP), relativamente menos persistentes y efectivos. Aunque los organofosforados se degradan más rápido que los organoclorados, esta clase de plaguicidas tiene una aguda neurotoxicidad debido a su habilidad para inactivar la acetilcolina esterasa (AChE).

### 1.2.1. ORGANOFOSFORADOS. CLORPIRIFÓS

El clorpirifós (figura 1) (O,O-dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-ifosforotioato) es uno de los organofosforados más usados en el control de insectos en las cosechas. La vida media del clorpirifós es normalmente de 10 a 120 días en suelo, pero puede alcanzar hasta 1 año dependiendo del tipo de suelo, dosis de insecticida, clima y otros factores medioambientales.

El clorpirifós sin embargo posee efectos secundarios en la actividad espermática, hepática y renal de humanos. La exposición prenatal a clorpirifós tiene una fuerte relación con el bajo peso en el nacimiento, la microcefalia y retraso en el desarrollo neuronal. Clorpirifós ha sido identificado como un factor ambiental relacionado con el cáncer de mama.

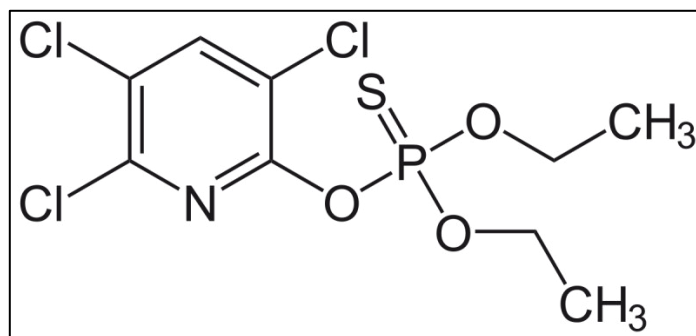


Figura 1. Estructura química del insecticida, clorpirifós.

### 1.3. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAHs)

Los PAHs constituyen una familia de compuestos ampliamente distribuida en el medio ambiente. El interés de conocer su origen y sus niveles ambientales radica fundamentalmente en las propiedades carcinogénicas, mutagénicas y teratogénicas que poseen algunos de estos compuestos (International Agency for Research of Cancer, IARC, 1983), lo que los llevó a ser considerados contaminantes prioritarios por la Agencia Americana para la protección del Medio Ambiente (EPA) y la Unión Europea.

El origen de estos hidrocarburos en el medio ambiente es muy diverso, aunque básicamente se puede diferenciar tres fuentes distintas:

- A) Origen Piroclítico: procedente de la combustión incompleta de la materia orgánica, reciente o fósil, bien por causas naturales (incendios de bosques, erupciones volcánicas, etc.) (ATSDR, 1995; Kim *et al.*, 2003; Wilcke *et al.*, 2005) o antropogénicas (utilización de combustibles fósiles, incineración de residuos, emisiones de vehículos, etc.) (ATSDR, 1995; Mastral *et al.*, 2003; Motelay-Massei *et al.*, 2006), predominando los compuestos no alquilados sobre sus alquilhomólogos.
- B) Origen Petrogénico: producido por vertidos accidentales o intencionados de derivados del petróleo. Además de vertidos puntuales como consecuencia de accidentes.
- C) Origen diagenético: de la materia orgánica sedimentaria, la cual puede sufrir una serie de procesos geoquímicos naturales, como son la descarboxilación, aromatización y desfuncionalización para convertirse en PAHs de origen natural.

Los PAHs son compuestos orgánicos formados por dos o más anillos de benceno fusionados, los cuales difieren en el número y posición del anillo aromático.

Existen dos tipos de PAHs: los de bajo peso molecular que presentan 2 o 3 anillos aromáticos, y los de alto peso molecular que tienen de 4 a 6 anillos aromáticos. Un ejemplo de cada clase de PAHs sería: el fenantreno (figura 2) y pireno (figura 3), respectivamente.

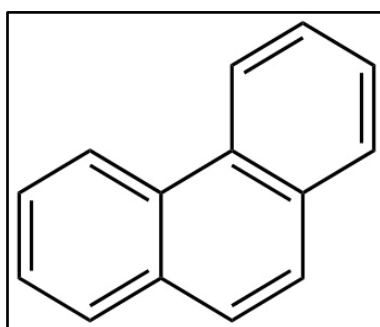


Figura 2. Estructura química de fenantreno.

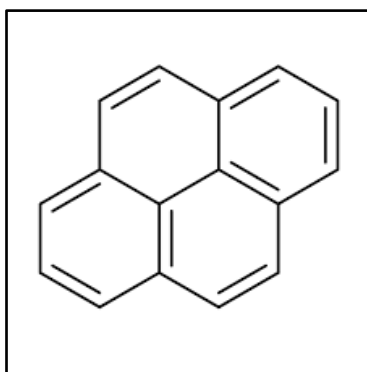


Figura 3. Estructura química de pireno.

#### 1.4. BIODEGRADACIÓN, MINERALIZACIÓN, BIODISPONIBILIDAD, BIOACCESIBILIDAD, Y ENVEJECIMIENTO

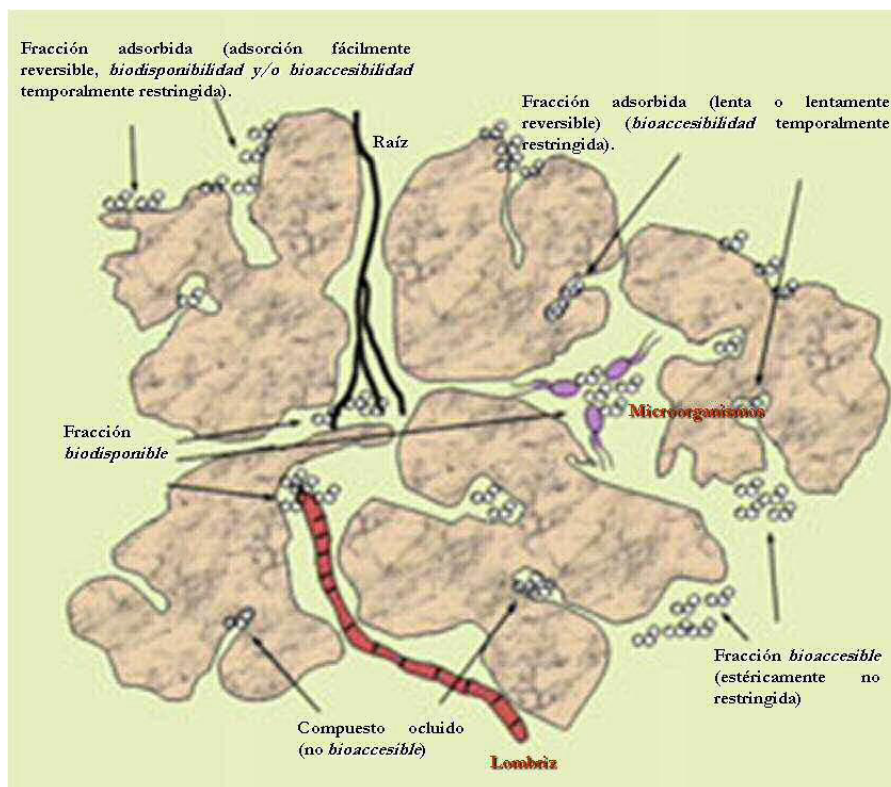
Según la definición de la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos EPA (2009), *la biodegradación* de un compuesto consiste en aquel proceso por el cual los microorganismos transforman o alteran, por acción metabólica, la estructura de dicho compuesto. En este proceso, los contaminantes orgánicos son biotransformados debido a que generalmente los microorganismos pueden utilizarlos para su propio crecimiento como fuente de carbono y energía y, en el caso de que no sean capaces de crecer a partir de ellos, pueden seguir transformándolos si se les aporta un sustrato de crecimiento alternativo o cosustrato (Alexander, 1999). Para el crecimiento de los microorganismos es necesaria la presencia de donadores y aceptores de electrones, una fuente de carbono y diferentes nutrientes (N, P, K, S, Mg, Ca, Mn, Fe, Zn, Cu y elementos traza).

Además de los compuestos naturales, los elementos requeridos para el crecimiento celular pueden ser aportados por muchos contaminantes orgánicos. La mayoría de los contaminantes orgánicos, típicamente alifáticos o aromáticos, contienen diferentes grupos funcionales (-OH, -Cl, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub>, etc). Estos compuestos orgánicos, actuando como donadores de electrones son oxidados durante el metabolismo microbiano para proporcionar energía para el crecimiento celular. Aunque el último metabolito generalmente es un compuesto de naturaleza orgánica, también puede obtenerse CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y/o sales inorgánicas, que es lo que se conoce como *mineralización*.

Uno de los principales factores influyentes en la extensión del proceso de biodegradación es la biodisponibilidad de los compuestos. El término **biodisponibilidad** hace referencia a la disponibilidad total para ser captado por un organismo vivo en su hábitat en un momento determinado (Semple *et al.*, 2004). En el caso de una sustancia tóxica, cuanto más biodisponible sea, mayor será su efecto nocivo sobre los seres vivos (ISO17402:2011)

(Sorensen *et al.*, 2013). La biodisponibilidad está determinada por las propiedades fisicoquímicas del compuesto, principalmente por su solubilidad en líquidos, o su capacidad para adsorberse en sustancias sólidas o para volatilizarse. Sustancias volátiles o fuertemente adsorbidas en partículas sólidas no van a estar al alcance de muchos seres vivos, lo que reduce su potencial de toxicidad.

La asociación de una sustancia a componentes sólidos del suelo como arcillas o materia orgánica, así como su solubilidad en líquidos no acuosos, limita su **bioaccesibilidad**, definiendo bioaccesibilidad de una sustancia tóxica como la disponibilidad de ésta para ser ingerida por un organismo, si éste tiene acceso a dicha sustancia en el momento o en otro periodo de tiempo (Semple *et al.*, 2003). A continuación se muestra la figura 4 donde quedan reflejados estos conceptos de forma esquemática.



**Figura 4.** Concepto de biodisponibilidad y bioaccesibilidad de un contaminante en el suelo.

La mayoría de los reglamentos y procedimientos de evaluación de suelos contaminados aceptados se basan todavía en las concentraciones totales de contaminantes y no tienen en cuenta la posibilidad de que los contaminantes no estén disponibles de forma que puedan afectar negativamente a la salud humana o al medio ambiente (Alexander, 2000). Por ello, es más útil y rentable un enfoque basado en el riesgo que representa la fracción biodisponible del

contaminante en el suelo que necesitará ser eliminado, que en el total de contaminante (Semple *et al.*, 2004).

Además, una baja biodisponibilidad constituye una de las principales limitaciones de la recuperación de suelos y sedimentos contaminados por hidrocarburos y plaguicidas, dado que provoca que las tasas de biodegradación sean más lentas de lo deseado, dando así lugar a la persistencia de los compuestos biodegradables (ISO17402:2011) (Sorensen *et al.*, 2013).

Por otro lado, dado que una baja biodisponibilidad reduce mucho la toxicidad de un compuesto, en algunas ocasiones se recurre a la disminución de la biodisponibilidad como método para remediar un suelo contaminado.

La incorporación de los compuestos orgánicos a los suelos, implica a menudo dos procesos cinéticamente distintos: un proceso inicial rápido y reversible, seguido de un periodo largo y lento que puede ocurrir en unas semanas, meses o quizás años. Es esta lenta adsorción la que conlleva que una fracción de estos compuestos sea resistente a la desorción. Es en este caso se habla de compuestos envejecidos (Gevao *et al.*, 2003). El envejecimiento es el proceso por el cual la biodisponibilidad de una sustancia tóxica en el suelo disminuye al penetrar en el interior de los agregados del suelo a lo largo del tiempo.

#### **1.4.1. PAPEL DE LOS CONSORCIOS MICROBIANOS EN LA BIODEGRADACIÓN**

Hay documentadas numerosas especies de microorganismos capaces de degradar diferentes contaminantes, siendo los hidrocarburos derivados del petróleo y clorpirifós de los más estudiados.

La capacidad degradadora de un organismo depende del desarrollo de un sistema metabólico que le permita asimilar los compuestos, pero para que esto se produzca, el microorganismo debe enfrentarse a una serie de condicionantes que limitan su actividad:

-Factores medioambientales: temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes en el medio, humedad, aceptores de electrones.

-Factores físico-químicos: concentración del contaminante, estructura y peso molecular, solubilidad, biodisponibilidad (la cantidad/fracción de contaminante que puede ser asimilado y degradado por el microorganismo) y bioaccesibilidad (disponibilidad de una sustancia para ser asimilada por el microorganismo, viene limitada por la solubilidad y/o la capacidad de ser adsorbida por la fracción orgánica de un suelo).

La degradación del compuesto se puede llevar a cabo mediante tres procesos diferentes: i) la respiración aerobia, en el que el aceptor de electrones es el oxígeno, y se obtiene un aporte de

energía elevado; ii) mediante respiración anaerobia, donde se utilizan nitratos, sulfatos,  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Mn}^{4+}$  como aceptores de electrones, proceso más lento que la respiración aerobia y donde el balance neto de energía es relativamente bajo, por lo que en ocasiones se dan relaciones de sintrofismo; iii) por fermentación, proceso en el que la cadena transportadora de electrones no interviene en la obtención de energía, se trata de un sistema catabólico parcial, ya que los productos finales son compuestos orgánicos que no han llegado a degradarse por completo, obteniéndose un rendimiento energético bajo, (Friedrich *et al.*, 2001; Rubio-Bellido *et al.*, 2015).

Las características estructurales y físico-químicas de los contaminantes es otro condicionante a tener en cuenta para que la biodegradación se produzca. De este modo nos encontramos con que los microorganismos tienen una mayor facilidad para degradar hidrocarburos saturados, como los alcanos o cicloalcanos, sin embargo, otros compuestos como hidrocarburos clorados o compuestos nitroaromáticos, son muy difíciles de descomponer y eliminar.

**La biodegradación** a través de microorganismos es el mecanismo más fiable para la transformación y disipación de contaminantes orgánicos, estos son compuestos muy persistentes en el ambiente, debido a sus escasa volatilidad, baja solubilidad en agua y alta afinidad por las partículas del suelo. Sus tiempos de vida media varían entre un mes y un año. La biodegradación mediada por microorganismos se puede llevar a cabo mediante la actuación de cepas microbianas aisladas o cultivos mixtos, los cuales pueden ser consorcios definidos y consorcios no definidos.

- *Conorcios definidos* se caracterizan por ser una combinación de cepas aisladas con capacidades degradadoras conocidas, que son complementarias entre sí (Foght *et al.*, 1998). En los consorcios definidos es posible la formación de metabolitos intermedios que sean tóxicos para la misma cepa o para otras cepas existentes en el mismo (Casellas *et al.*, 1998; Kazunga y Aitken., 2000; Kazunga *et al.*, 2001).

- *Conorcios no definidos* se caracterizan por ser el resultado de procesos directos de enriquecimiento a partir de muestras ambientales con historia previa de contaminación (Venkateswaran *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1997; Budzinski *et al.*, 1998) y por lo tanto no son el resultado de una combinación de cepas previamente aisladas. Es más probable que en un consorcio no definido se hayan seleccionado degradadores de productos finales (*dead-end products*) que se acumulan como resultado de procesos cometabólicos (Grifoll *et al.*, 1995).

## 1.5. BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTO

Cuando la biodegradación no se puede llevar a cabo de forma natural porque los microorganismos no disponen de los elementos esenciales para ello en la zona contaminada, se requiere la intervención de actuaciones encaminadas a estimular la actividad microbiológica. Así, la biodegradación asistida acelera las reacciones de biodegradación facilitando el crecimiento microbiano y optimizando las condiciones medioambientales de la zona donde los microorganismos deben llevar a cabo su función de descontaminación. Para que esta aproximación funcione, el contaminante no debe ser recalcitrante, es decir, los microorganismos deben tener la capacidad genética y fisiológica suficiente para degradar la sustancia.

La estimulación de la actividad microbiana natural, conocida como **bioestimulación**, se realiza mediante el control de parámetros como el potencial redox, las condiciones de humedad, la adición de oxígeno u otros aceptores de electrones (como nitrato o sulfato) y nutrientes tales como el nitrógeno y el fósforo (Thompson *et al.*, 2005; Tyagi *et al.*, 2011). En el caso de que las comunidades microbianas autóctonas no sean capaces de biodegradar compuestos como los plaguicidas y PAHs, se pueden adicionar tanto a los suelos como las aguas microorganismos específicos que sí lo lleven a cabo, proceso conocido como **bioaumentación** (Ghazali *et al.*, 2004; El Fantroussi y Agathos, 2005; Thompson *et al.*, 2005; Mrozik *et al.*, 2010; Tyagi *et al.*, 2011).

## **2. OBJETIVOS**

La selección de los contaminantes sobre los que hemos centrado nuestro trabajo se ha realizado en base a su especial persistencia y toxicidad en suelos y aguas. Los contaminantes elegidos son: clorpirifós, fenantreno y pireno.

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

- 1).** Aislar microorganismos potencialmente degradadores de clorpirifós, fenantreno y pireno, mediante el empleo de técnicas de cultivos de enriquecimiento a partir de suelos contaminados.
  
- 2).** Estudios preliminares relacionados con la DBO a partir de un sistema acuoso contaminado artificialmente e inoculado con las cepas bacterianas aisladas y consorcios microbianos, que potencialmente son biodegradadores de dichos contaminantes, con el fin de obtener una primera aproximación de posibles bacterias capaces de llevar a cabo la mineralización de estos.
  
- 3).** Monitorizar en el laboratorio los procesos de mineralización de clorpirifós, fenantreno y pireno en solución, y en suelo de pireno y fenantreno, empleando para ello los sistemas bacterianos aislados y consorcios microbianos.



### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. MATERIALES

##### 3.1.1. CEPAS BACTERIANAS AISLADAS

Las bacterias aisladas fueron obtenidas de suelos agrícolas a través de cultivos de enriquecimiento y de una solución de clorpirifós contaminada en el laboratorio (Tabla 1).

**Tabla 1.** Nomenclatura utilizada para las bacterias aisladas de suelo y solución de clorpirifós contaminada.

<b>Procedencia</b>	<b>Nomenclatura para cepas</b>
Bacteria aislada en solución de clorpirifós contaminada 1mg L <sup>-1</sup>	B1
Bacteria aislada en solución de clorpirifós contaminada 1mg L <sup>-1</sup>	B2
Bacteria aislada en solución de clorpirifós contaminada 1mg L <sup>-1</sup>	B3
Bacteria aislada de SUELO ALAJAR	B4

##### 3.1.2. CONSORCIOS MICROBIANOS

Los consorcios microbianos se aislaron de suelos agrícolas a través de cultivos de enriquecimiento o por la unión en el laboratorio de cepas bacterianas aisladas previamente.

Dichos consorcios microbianos, serán nombrados en este trabajo tal como se indican en la tabla 2.

**Tabla 2.** Nomenclatura utilizada para los consorcios microbianos empleados en este trabajo.

<b>Procedencia</b>	<b>Nomenclatura para consorcio microbianos</b>
SUELO ANDUJAR	C 1
SUELO FUENTEHERIDOS	C2
Artificial: combinación C2 + B4	C3
Artificial: combinación cepas B1 + B2 + B3	C4

En la figura 5 se muestran los consorcios y cepas aisladas, sembrados en cuadrantes en placas Petri cuyo medio elegido fue LB-agar.

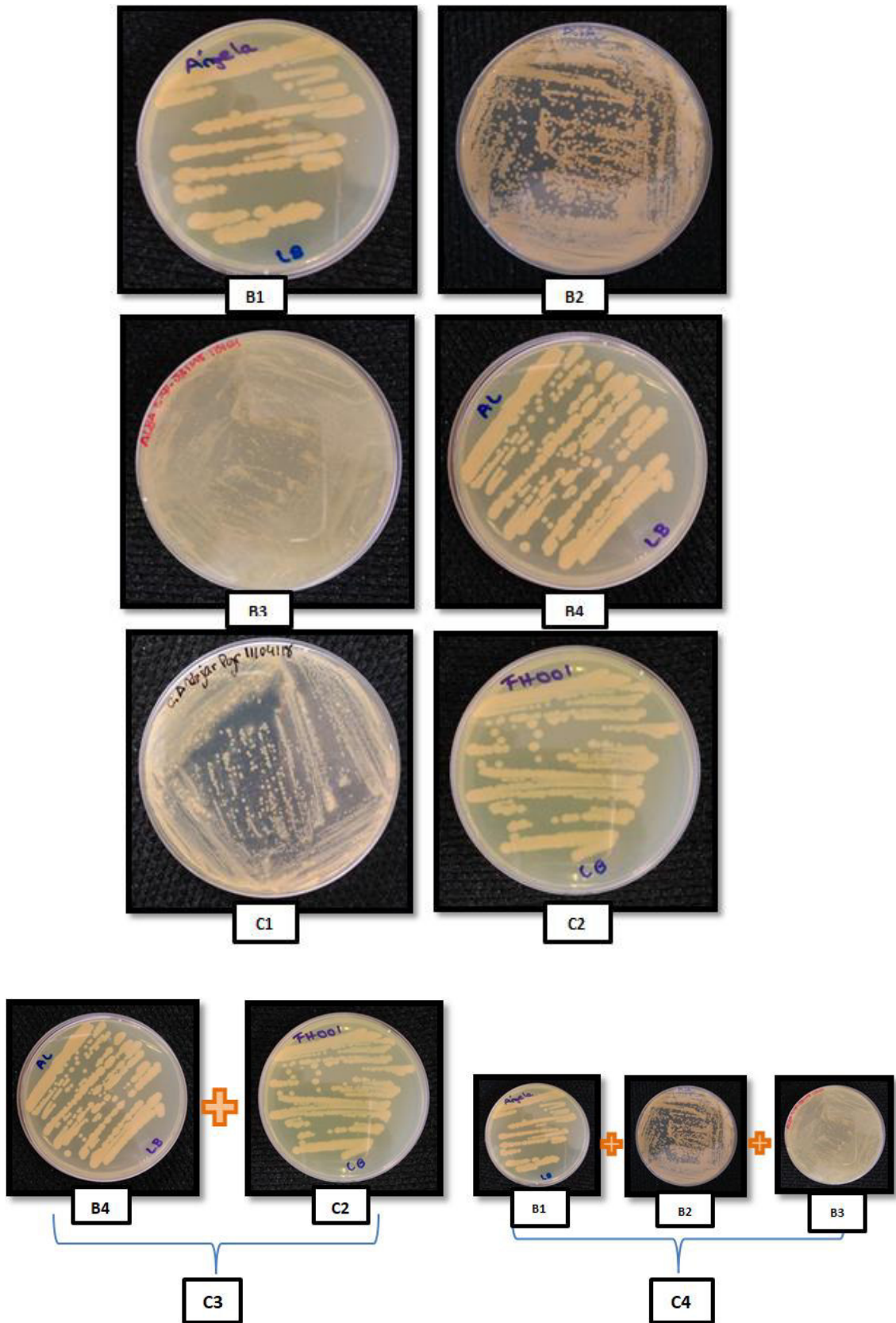


Figura 5. Consorcio microbianos y cepas bacterianas aisladas sembradas en cuadrante en placa petri con medio LB-agar (Luria Bertani).

### 3.1.3. PLAGUICIDAS

Se ha utilizado clorpirifós en polvo (pureza >98%), suministrado por Sigma Aldrich (Madrid, España). El clorpirifós marcado radiactivamente en el anillo aromático se adquirió del instituto de Isótopos Co, Ltd., (Budapest, Hungría), actividad específica, 36 mCi mmol<sup>-1</sup>; pureza química, 99,9%; pureza radioquímica, 100%.

### 3.1.4. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Se han utilizado los siguientes (PAH<sub>s</sub>) adquiridos a Sigma Aldrich (Madrid, España):

Pireno (PYR C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>) en polvo (pureza > 98%) y fenantreno (PHE C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>) en polvo (pureza >98%).

El pireno y el fenantreno marcados radiactivamente en el anillo aromático se adquieren el Instituto de Isótopos Co., Ltd., (Budapest, Hungría).

### 3.1.5. SOLUCIÓN DE NUTRIENTES (SNs)

Para estimular a las cepas bacterianas se empleó una solución de nutrientes, cuya composición se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Solución de nutrientes (SNs).

Nutrientes	µg mL <sup>-1</sup>
Mn Cl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	75,0
Fe SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	37,5
Sn Cl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	25,0
Zn SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	12,5
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> · 18 H <sub>2</sub> O	12,5
CO Cl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	12,5
Ca SO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	10,0
K Br	3,75
K Cl	3,75
Li Cl	2,50

### 3.1.6. MEDIOS DE CULTIVOS

Los medios de cultivos empleados en la obtención de las cepas bacterianas aisladas y los consorcios microbianos, y en la realización de los estudios de mineralización y pruebas para la determinación de la demanda biológica de oxígeno, se muestran a continuación en la tabla 4.

**Tabla 4.** Medios de cultivos empleados.

Componentes	MSM <sup>(1)</sup>	LB <sup>(2)</sup>	LB <sub>agar</sub>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,8 g		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,0 g		
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,6 g		
NaCl		10 g	10 g
Triptona		10 g	10 g
Extracto de levadura		5 g	5 g
Bacto Agar			20g

<sup>(1)</sup>MSM: Mineral salts medium.

Resultado de la mezcla de las siguientes disoluciones:

Disolución I: 2,0 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> más 4,0 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 500 mL de agua destilada.

Disolución II: 1,6 g de MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O más 0,8 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 500 mL de agua destilada.

<sup>(2)</sup> LB: Luria- Bertani médium. Medio 381 de la lista de medios para microorganismos (Leibniz Institute DSMZ- German Collection of Microorganisms and Cell Cultures).

### 3.1.7. SUELO

El suelo empleado para el experimento de mineralización en suelo de la presente memoria, fué un suelo denominado ANDUJAR, obtenido de la localidad de Andujar (*Sur-Este de España 38°01'39"N, 4°03'58"W*). La muestra se cogió de la capa más superficial (0-20cm), se secó al aire y se trituró haciéndose pasar por un tamiz de malla de 2mm. En la tabla 5 se representa las propiedades físico- químicas de este suelo.

**Tabla 5.** Propiedades físico- químicas del suelo empleado.

Suelo	pH	MO (%)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup> (%)	Clasificación Textural
ANDUJAR	8,14	8,11	74,8	14,8	10,4	23,2	Arenosa

## 3.2. MÉTODOS

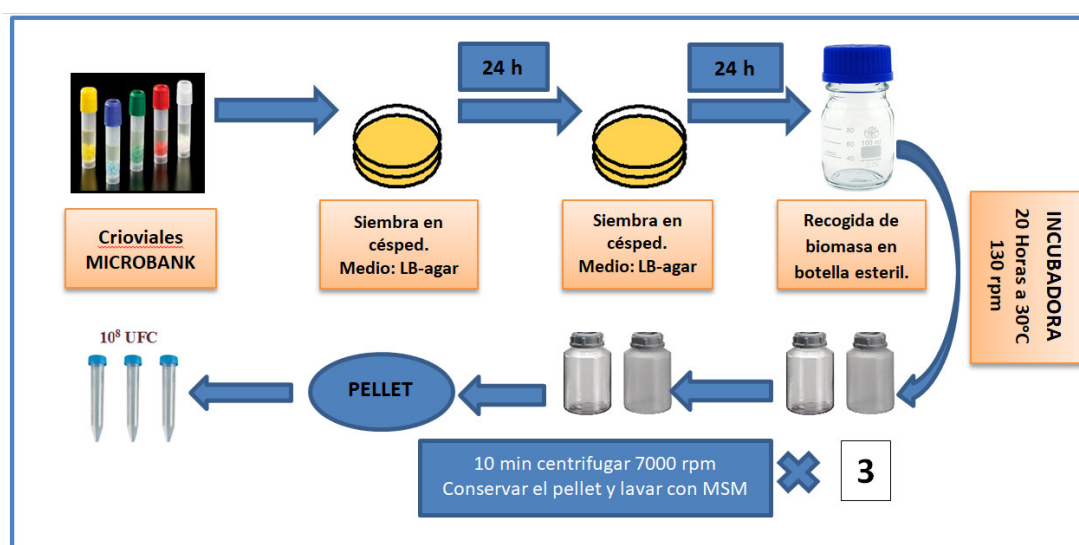
### 3.2.1. ENRIQUECIMIENTO DE SUELOS

En el caso de la cepa bacteriana B4 y consorcios microbianos C1 y C2 (tabla 1 y 2), se aislaron de suelos que habían sido sometidos a una aplicación continuada de contaminantes: clorpirifós, fenantreno y pireno. La cepa bacteriana y consorcios microbianos aislados se obtuvieron a partir de la técnica de cultivos de enriquecimiento de cada suelo.

En primer lugar se preparó una suspensión en recipientes estériles de 250 mL con 10 g de cada suelo en 50 mL de medio MSM suplementado con clorpirifós, fenantreno y pireno ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y con una solución de nutrientes (SNs). Cada 15 días se recogían 10 mL de la suspensión y se añadían en 40 mL de medio MSM enriquecido con los contaminantes ( $40 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y SNs. Este proceso se repitió 4 veces. A los 60 días, una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de este cultivo se inoculó en placas Petri con medio LB-agar y posteriormente se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  durante 1 semana para finalmente, con asa de siembra estéril, introducir la biomasa a conservar en crioviales.

### 3.2.2. PREPARACIÓN DE INÓCULOS DE LOS CONSORCIOS MICROBIANOS Y CEPAS BACTERIANAS AISLADAS

Se preparan inóculos a partir de los consorcios microbianos y cepas bacterianas aisladas, que fueron previamente seleccionadas mediante cultivos de enriquecimiento para ser posteriormente conservadas en crioviales a  $-80^\circ\text{C}$  en congelador, (Revco Elite Plus, Clarkson Laboratory & Supply Inc. USA). El proceso de preparación de inóculos se muestra en la figura 6.



**Figura 6.** Preparación de los inóculos de las cepas bacterianas aisladas y los consorcios de microorganismos.

De los crioviales se usó una esfera porosa que sirve de soporte para las bacterias y que a su vez se encuentran sumergidas en un líquido crioprotector, para sembrar en placas de Petri con medio LB- agar cada uno de los microorganismos conservados. Las placas se incubaron 24 horas a 30°C, excepcionalmente 48 horas en el caso del C2 y la B3. Se cogieron colonias aisladas de las placas en el caso de las cepas bacterianas aisladas, y biomasa representativa de todas las colonias presentes, en el caso de los consorcios microbianos, y se volvieron a sembrar de nuevo en placas Petri en cuadrante, y se incubaron de nuevo en estufa a 30° C durante 24 y 48 horas. Con biomasa suficiente de cada una de las placas Petri se inocularon botellas con 100 mL de medio LB y 100 mg L<sup>-1</sup> (10 mg) de cada contaminante. Estas botellas se incubaron a 30°C en agitación (130 rpm) durante 20 horas, tiempo suficiente para que las bacterias alcancen la fase estacionaria de crecimiento.

Una vez pasado este tiempo, se recuperaron las células bacterianas crecidas en los medios por centrifugación durante 10 minutos a 7000 rpm. Al pellet de células se le añadieron 50 mL del medio MSM, en vistas a lavar las células de posibles metabolitos que pudiesen haber en el cultivo debido a los productos que se van formando con el metabolismo bacteriano, recuperando de nuevo las células tras centrifugación. Esta fase se repite una segunda vez. Finalmente, se desechó de nuevo con cuidado el sobrenadante y se conservó solo el pellet. Se resuspendió el pellet en medio MSM, hasta alcanzar una concentración equivalente a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> por comparación con la escala de Mac Farland. La suspensión bacteriana se conservó en tubos a 4°C hasta el momento de utilizarlos para inocular nuevos medios.

### 3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA BIOLÓGICA DE OXÍGENO

El ensayo de la demanda biológica de oxígeno (DBO), concierne la determinación de la degradación de sustancias orgánicas por microorganismos. La determinación de la DBO será posible al medir indirectamente dióxido de carbono y el cambio indirecto de presión. El dióxido de carbono obtenido va a reaccionar con hidróxido de sodio, formando carbonato de sodio. De esta manera el dióxido de carbono que se encuentra en fase gaseosa, al ser convertido en carbonato de sodio provoca un descenso de esta fase y por lo tanto un descenso de presión que será medido por el cabezal oxitop.



Se emplearon botellas de vidrio, previamente esterilizadas, especiales para el experimento. Para cada experimento se dispuso de un ensayo control y el inoculado por duplicado. Se añadió 147,6 mL de agua miliQ previamente esterilizada en autoclave, 16,4 mL de MSM, 164  $\mu$ L de SNs, 1 mL del inoculo bacteriano, más una cantidad de contaminante, que en el caso de clorpirifós alcanzó una concentración de 1 mg L<sup>-1</sup>, y de pireno 0,2 mg L<sup>-1</sup>. En el caso del pireno se parte de una solución pireno:metanol 20 mg L<sup>-1</sup>, se toma 3 mL, y se añaden a la solución final. Por otro lado para las pruebas con clorpirifós, se partió de una solución clorpirifós: metanol de 1000 mg L<sup>-1</sup>, puesto que cogemos 0,164 mL, para alcanzar la concentración final de 1mg L<sup>-1</sup>. Siempre se tiene en cuenta que la concentración en metanol esté por debajo del 1% en la solución final puesto que sobrepasando este porcentaje puede ocasionar la muerte de los microorganismo. Se depositó la mezcla en la botella, en la cual se introdujo un imán para mantener la solución en agitación continúa.

Se cerraron las botellas con el cabezal oxitop (figura 7), donde se introdujo la sosa. En dichos cabezales quedaron registrados automáticamente los valores de mg de oxígeno consumido L<sup>-1</sup>. Las botellas se mantuvieron durante 7 días en unas cabinas termostáticas (figura 7), con una temperatura constante de 20°.



**Figura 7.** Cabezal del oxitop y cabina termostática.

Los valores obtenidos en el cabezal oxitop, deben ser multiplicados por un factor de conversión para obtener los valores reales de DBO, estos factores están sujetos al volumen del ensayo, tabla 6.

**Tabla 6.** Factor de conversión de valores obtenidos en el experimento de demanda biológica de oxígeno.

Cantidad de muestra usada [mL]	Factor(*)
432	1
365	2
250	5
164	10
97	20
43,5	50
22,7	100

\*La cantidad de muestra usada es de 164 ml por tanto el factor a usar es 10.

### 3.2.4. ESTUDIOS DE MINERALIZACIÓN DE CLORPIRIFÓS, FENANTRENO Y PIRENO EN SOLUCIÓN Y EN SUELO

Para llevar a cabo los ensayos de mineralización se utilizaron respirómetros, que consisten en un cuerpo principal, formado por un matraz de vidrio de 250 mL de capacidad, en cuyo interior se añadieron el contaminante a estudiar, clorpirifós, fenantreno y pireno, no marcado y marcado  $^{14}\text{C}$  en el anillo aromático junto con 50 mL de medio MSM, más el tratamiento a evaluar en cada experimento (solución de micronutrientes (1 mL SNs) y 1 mL del inóculo microbiano a estudiar).

En la parte superior del matraz se colocó un tapón envuelto en cinta de teflón con una trampa de álcali suspendida (1 mL de NaOH 0,5N) (Figura 8), la cual será la encargada de atrapar la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  (Reid *et al.*, 2001).



**Figura 8.** Respirómetro empleado para los estudios de mineralización de contaminantes y trampa de álcali antes de ser incorporada al matraz erlenmeyer.

En primer lugar, se añadieron a los respirómetros aproximadamente 450 Bq (25000 dpm) del contaminante marcado  $^{14}\text{C}$  en el anillo aromático, así como contaminante no marcado en



cantidad necesaria, tanto al experimento de mineralización en solución como en suelo. La concentración del contaminante no marcado fue de 50 mg kg<sup>-1</sup> en mineralización en suelo y 10mg L<sup>-1</sup> en solución. El substrato marcado y el no marcado se añadieron disueltos en metanol, dejándolos evaporar antes de añadir el resto de componentes del tratamiento (SNs y/o consorcios microbianos y/o cepas aisladas) para que no interfiriera en la mineralización. En el caso de la mineralización en suelo se añadieron el marcado y no marcado a 25% del suelo para no destruir la flora endógena, el resto de suelo hasta alcanzar los 10g se agregó una vez evaporado el metanol. Finalmente, se homogeneizó bien el medio y los substratos, mediante agitación manual suave.

Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de 25°C. Periódicamente, la solución de la trampa de sosa se retiró y se reemplazó por una nueva. La solución de NaOH retirada (1mL) se mezcló con 3 mL de líquido de centelleo (ÚLTIMA GOLD™, PerkinElmer, Inc., USA) y dicha mezcla se mantuvo en oscuridad durante al menos 24 horas para la disipación de la quimioluminiscencia. La radiactividad se midió con un contador de centelleo líquido modelo III Beckman LS5000TD. En la tabla 7 se representan los ensayos de mineralización.

**Tabla 7.** Ensayos de mineralización de clorpirifós, fenantreno y pireno en solución, y en suelo.

EXP	SNs 1mL	MSM 50mL	C1	C2	B1	B2	B3	B4	CLP*	PHEN*	PYR*	S*
1	SI	SI							SI			
2	SI	SI	SI						SI			
3	SI	SI								SI		
4	SI	SI	SI							SI		
5	SI	SI							SI			
6	SI	SI					SI		SI			
7	SI	SI				SI			SI			
8	SI	SI			SI				SI			
9	SI	SI							SI			
10	SI	SI		SI					SI			
11	SI	SI						SI	SI			
12	SI	SI		SI				SI	SI			
13	SI	SI							SI			
14	SI	SI			SI	SI	SI		SI			
15	SI	SI									SI	
16	SI	SI	SI								SI	
17	SI	SI	SI							SI		SI
18	SI	SI	SI								SI	SI

CLP\*, clorpirifós. PHEN\*, fenantreno. PYR\*, pireno. S\*, suelo.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. DEMANDA BIOLÓGICA DE OXÍGENO.**

En primer lugar se realizó un experimento previo, para comprobar que las cepas bacterianas (B1, B2, B3 y B4) y consorcios microbianos aislados de los suelos (C1 y C2), llevaban a cabo la degradación de los contaminantes clorpirifós y pireno en solución. Los contaminantes constituyen la única fuente de carbono y energía para los sistemas bacterianos. Los consorcios microbianos y cepas bacterianas aisladas fueron inoculados una vez alcanzaron la fase estacionaria de su crecimiento (20 horas).

La figura 9, muestra las curvas donde se representa los mg de oxígeno consumidos en una solución frente al tiempo, la cual contenía los contaminantes clorpirifós y pireno en una concentración de 1 y 0,2 mgL<sup>-1</sup> respectivamente, inoculado con las distintas cepas bacterianas y consorcios microbianos aislados. Al aumentar la masa bacteriana, se produce un mayor consumo de oxígeno, que se traduce en una mayor producción de CO<sub>2</sub>, que reacciona con el hidróxido de sodio produciendo un aumento en la producción de carbonato de sodio, dando un ligero descenso de la fase gaseosa y una presión negativa que quedará registrado en el cabezal oxitop, por lo que las bacterias han llevado a cabo degradación/mineralización del contaminante puesto que era el único aporte de carbono y fuente de energía. Se ha tenido en cuenta para la toma de datos que el cabezal tiene un límite superior de cuantificación de 400 mg L<sup>-1</sup> de oxígeno. Tras estos resultados obtenidos en los que se compara el ensayo control (sin bacterias) y las muestras inoculadas, se observa como en todas estas últimas se produce una degradación del contaminante. En el caso de las pruebas con las cepas bacterianas aisladas B1 (muestra 1), B2 (muestra 2), B3 (muestra 3) y B4 (muestra 4), se observa en todas ellas una demanda de oxígeno por parte de los microorganismos, lo que implica que se llevó a cabo la mineralización, alcanzándose para el clorpirifós en las pruebas con B1, B3 y B4 la saturación del cabezal oxitop (consumo de O<sub>2</sub> superior a 400 mg L<sup>-1</sup> de oxígeno). Por otro lado, en el caso de los consorcios microbianos C1 y C2 en pruebas con clorpirifós (muestra 5 y 6), y el C1 con pireno (muestra 7) observamos también niveles altos de mg de oxígeno consumido. En el caso del C1 con clorpirifós se alcanzó la saturación del cabezal. De estos datos (figura 9 y tabla 8) podemos concluir que se ha producido la mineralización de los contaminantes.

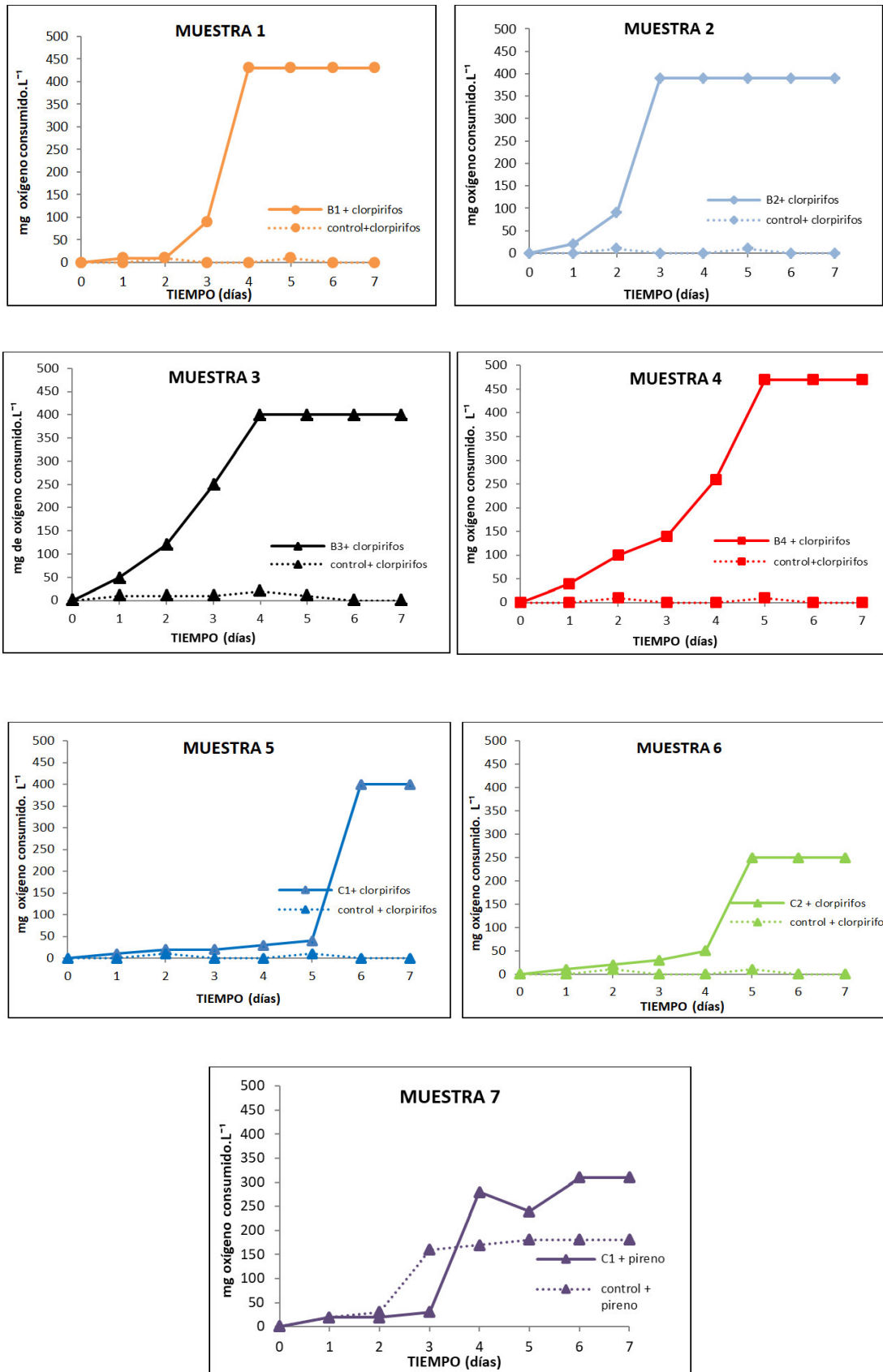


Figura 9. Graficas de mg oxígeno consumido L<sup>-1</sup> frente al tiempo de ensayo.

**Tabla 8.** Mg consumidos de oxígeno L<sup>-1</sup> a los diferentes tiempos del ensayo en el oxitop.

ENSAYOS	T0*	T1*	T2*	T3*	T4*	T5*	T6*	T7*
1Control	0	0	10	0	0	10	0	0
1Inoculado	0	10	10	90	430	430	430	430
2Control	0	0	10	0	0	10	0	0
2Inoculado	0	20	90	390	390	390	390	390
3Control	0	10	10	10	20	10	0	0
3Inoculado	0	50	120	250	400	400	400	400
4Control	0	0	10	0	0	10	0	0
4Inoculado	0	40	100	140	260	470	470	470
5Control	0	0	10	0	0	10	0	0
5Inoculado	0	10	20	20	30	40	400	400
6Control	0	0	10	0	0	10	0	0
6Inoculado	0	10	20	30	50	250	250	250
7Control	0	20	30	160	170	180	180	180
7Inoculado	0	20	20	30	280	240	310	380

\* mg L<sup>-1</sup> de oxígeno consumidos de oxígeno.

#### 4.2. MINERALIZACIÓN DE CLORPIRIFÓS, FENANTRENO Y PIRENO EN SOLUCIÓN

Se han realizado experimentos con el fin de comprobar que las cepas seleccionadas, bien por separado, en parejas o formando un consorcio, eran capaces de mineralizar los contaminantes. Los inóculos fueron añadidos al sistema tras alcanzar su fase estacionaria de crecimiento (20 horas). En la figura 10 se muestran las curvas de mineralización en presencia de clorpirifós, fenantreno y pireno en medio MSM suplementado con 10 mg L<sup>-1</sup> de contaminante y 1 ml de SNs tal como se describe en el apartado 3.2.4. de Materiales y Métodos e inoculadas con las cepas bacterianas aisladas B1, B2, B3 y B4, y los consorcios microbianos C1, C2, C3 y C4.

El consorcio C1 en solución de fenantreno (E) sigue un modelo estandar de curva de mineralización con tres estadios o fases claramente diferenciadas, fase lag (o fase de aclimatación), en la que los microorganismos inoculados en el medio se adaptan a la presencia del contaminante que se ha adicionado. La fase lag se prolonga hasta que el porcentaje mineralizado es >5%, en este caso hasta los 12 días. A continuación hay un incremento en la tasa de mineralización, representada por la fase exponencial de la curva, y después la actividad catabólica alcanza un plateau que suele deberse a una falta de nutrientes o a los efectos

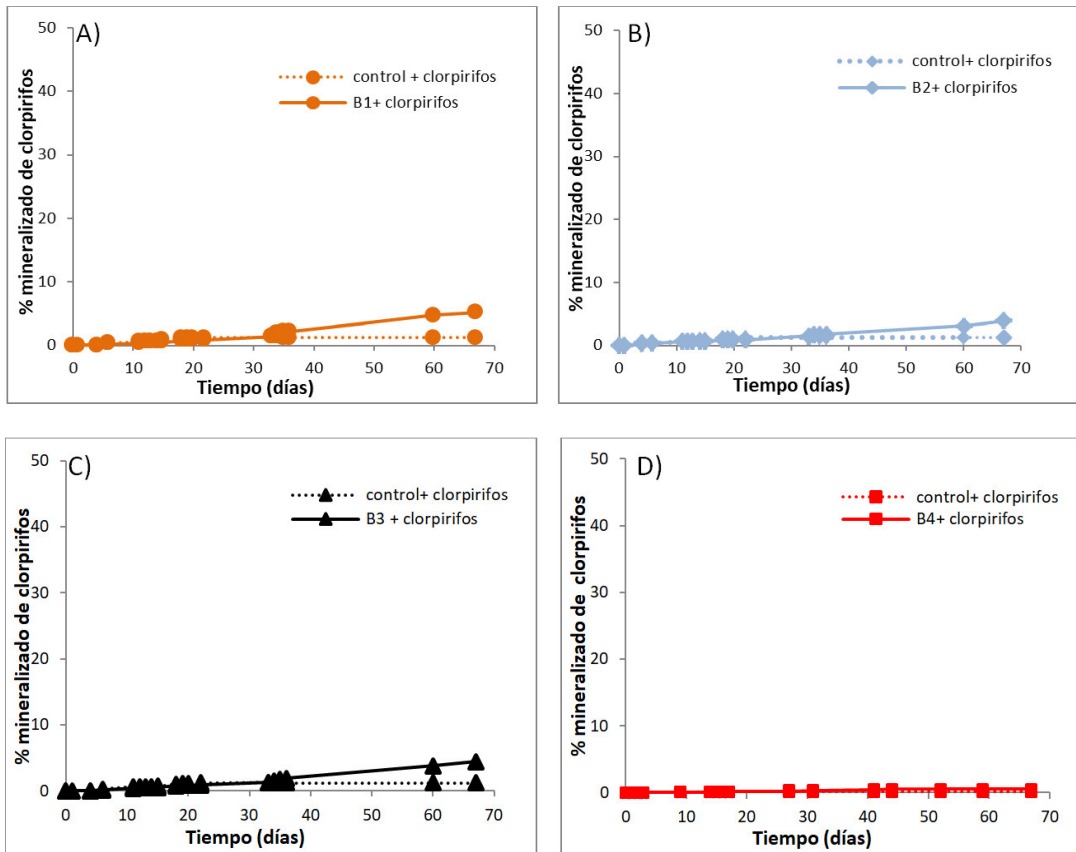
tóxicos tanto del compuesto como de sus metabolitos presentes en solución (Alexander, 1999), que podría ser más tóxicos que el propio compuesto original. Cabría destacar que en esta muestra la extensión global de mineralización es de entorno al 30%. Este porcentaje de mineralización observado corrobora que, efectivamente, el consorcio no sólo es degradador específico del fenantreno, sino que además es capaz de llegar a mineralizarlo de una manera significativa. Esto hace pensar que llega un momento en el que el consorcio microbiano ya no es capaz de mineralizar más, y las curvas de mineralización han alcanzado una meseta, siendo la tasa de mineralización en esta etapa menor que en la fase exponencial para todos los consorcios microbianos y cepas bacterianas aisladas. Una explicación a esta desaceleración en la mineralización del contaminante para el consorcio microbiano y a no llegar a mineralizar el 100% de fenantreno, podría ser que el fenantreno biodisponible que aún queda en solución se esté biodegradando dando lugar a metabolitos que sean tóxicos para estos consorcios microbianos (Villaverde *et al.*, 2017). Los efectos de los plaguicidas en las comunidades microbianas de los suelos son importantes para la aprobación de éstos para ser usados en agricultura, pero las relaciones entre ambos no se predicen fácilmente. Ciertos plaguicidas pueden favorecer el crecimiento de los microorganismos de suelos, en cambio, otros pueden originar efectos negativos o ningún efecto en situaciones reales (Lo, 2010).

En el resto de cepas bacterianas y consorcios inoculados en la solución con cada uno de los contaminantes en el caso del A) B1 en solución de clorpirifós, B) B2 en solución de clorpirifós, C) B3 inoculada en solución de clorpirifós, D) B4 en solución de clorpirifós, E) C1 en fenantreno, F) C1 en pireno, G) C1 en clorpirifós, H) C2 en clorpirifós, I) C3 en solución de clorpirifós y J) C4 en solución de clorpirifós, en todos ellos se observa un porcentaje de mineralización inferior al 10%, sin presentar modelos estandares de curvas de mineralización con tres estadios o fases claramente diferenciadas, al igual que con cada uno de los ensayos control (sin inocular) que también se realizó. Es decir ninguna de las cepas bacterianas fueron capaces de mineralizar por si solas los contaminantes. Numerosos consorcios han sido usados para la mineralización de diferentes contaminantes orgánicos obteniendo mejores resultados que mediante la adición de cepas de microorganismos aislados (Hudcova *et al.*, 2011; Pino y Penuela, 2011; Ngigi *et al.*, 2011; Mikesková *et al.*, 2012), poniendo especial atención en el desarrollo y optimización de los consorcios microbianos para que puedan sobrevivir y que sean biológicamente activos cuando se inoculan en suelos y tienen que competir con la flora endógena.

Todos los consorcios necesitan un periodo de adaptación al medio y activar su actividad metabólica para comenzar a degradar dicho contaminante. La variación del tiempo de adaptación de los microorganismos potencialmente degradadores de cada flora endógena

vendrá determinada por diversos factores: proliferación, fabricación de enzimas específicas, adaptación genética, pudiendo ser causado también por crecimiento de otras poblaciones microbianas, presencia de grupos tóxicos y/o aparición de nuevos genotipos que no sean capaces de degradar el producto de partida (Alexander, 1999).

Estos resultados que en principio entraron en contradicción con aquellos observados mediante la técnica de medición de la respiración de estas mismas cepas, pero empleando el oxitop, tendría su explicación en que la producción de CO<sub>2</sub> determinada mediante esta técnica procedería de la mineralización de los carbonos presentes en la cadena lateral de una molécula y no del carbono que conforma el anillo aromático y por lo tanto, no siendo detectado al emplear el insecticida marcado <sup>14</sup>C en su anillo en los respirómetros. El anillo aromático suele ser el responsable principal de la persistencia que muestran la mayoría de contaminantes orgánicos del medioambiente. De hecho los principales metabolitos detectados en el medioambiente conservan el anillo aromático, como el 3,5,6-tricloro-2-piridinol y el 2,3,5-tricloro-6-metoxipirideno (IUPAS, pesticide properties database).



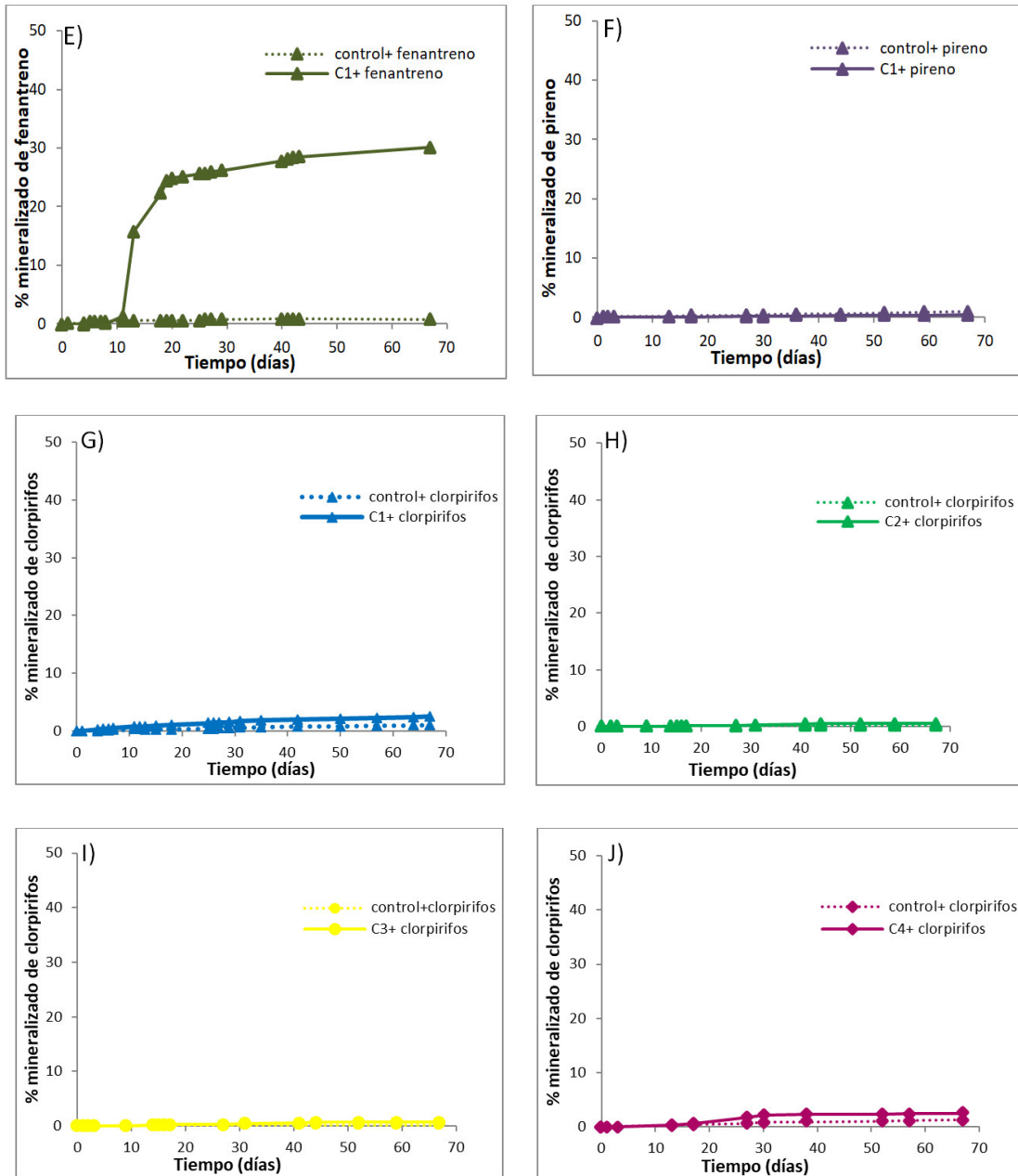


Figura 10. Porcentaje mineralizado de los contaminantes clorpirifós, fenantreno y pireno en solución.

### 4.3. MINERALIZACIÓN DE FENANTRENO Y PIRENO EN SUELO

La biorrecuperación medioambiental se refiere a un proceso de mejora del medio ambiente, en el cual los microorganismos juegan un papel fundamental. Muchos microorganismos pueden adaptar su maquinaria metabólica y formar consorcios bacterianos para alimentarse de contaminantes indeseables alcanzando la biodegradación de estos (Bonaventura y Johson, 1997).

Una vez seleccionado el consorcio bacteriano degradador de fenantreno y pireno, como es el C1, se comienza a investigar el efecto de la inoculación con dicho consorcio bacteriano en

suelo Andujar, previamente esterilizado, con el objetivo de evaluar su capacidad de mineralizar ambos contaminantes en él, dónde la biodisponibilidad del contaminante podría verse reducida por los fenómenos de adsorción sobre las partículas del mismo.

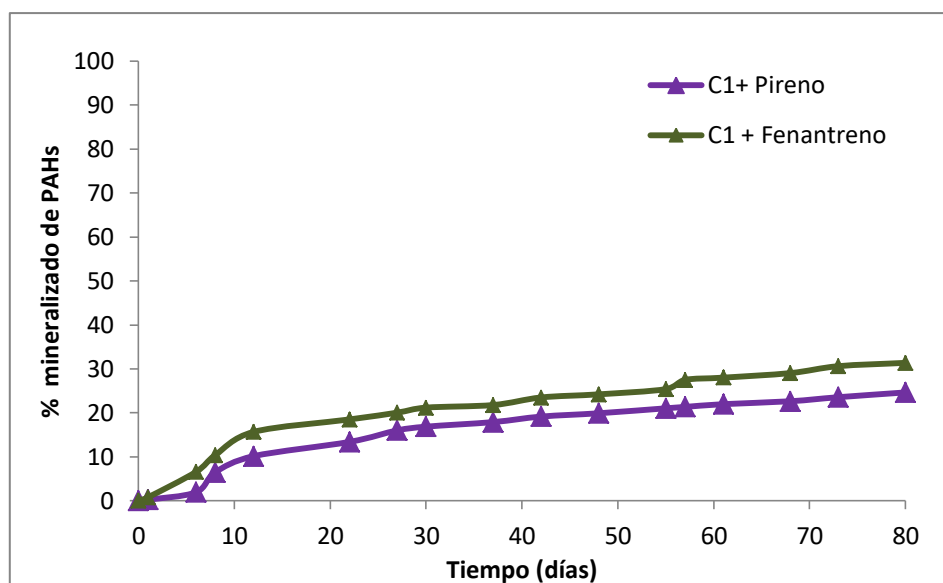


Figura 11. Porcentaje mineralizado en suelo de cada PAHs frente al tiempo de ensayo.

En la figura 11 se muestran los porcentajes de mineralización del fenantreno y pireno frente al tiempo, llevados a cabo por el C1. Las curvas de mineralización obtenidas, en el caso del **pireno**, presenta tres fases, que como anteriormente explicamos en el apartado 4.2. Mineralización de clorpirifós, fenantreno y pireno en solución, sería una primera fase lag, de adaptación de los microorganismos la cual en este caso tendría una duración de aproximadamente 7 días, seguida de una fase exponencial y ya por último una fase plateau, alcanzándose un porcentaje de mineralización cercano al 20%. En el caso del fenantreno hay que puntualizar que no se observaría fase lag, y en este caso la mineralización alcanzada sería superior al 20%.

Este consorcio microbiano se aplica a un suelo, que no está en condiciones reales (ya que está previamente esterilizado). En el caso de mineralización del fenantreno en solución se ha alcanzado un porcentaje cercano al 30%, las propiedades físico-químicas de los suelos influyen en la adsorción, y por lo tanto, en su fracción biodisponible potencialmente biodegradable. La degradación microbiana es el principal mecanismo de disipación de muchos compuestos orgánicos presentes en el suelo (Grant *et al.*, 2002). La extensión y la velocidad de degradación microbiana están controladas por la biodisponibilidad de los contaminantes, que se define como la fracción libre que está disponible para atravesar la membrana celular de los organismos presentes en el medio en un momento determinado (Semple *et al.*, 2004). Ello puede limitar la capacidad de los microorganismos presentes, en nuestro caso al consorcio



microbiano, para degradar los contaminantes retenidos en los mismos, dando lugar a un aumento en su persistencia, así como también al riesgo derivado de su prolongado efecto en el medio ambiente. Es por esto que la mineralización es inferior que en el caso de la solución.

En el caso del **pireno** en suelo si se observa la aparición de una fase lag, la cual no puede ser explicada por la propia adaptación del consorcio como lo confirmó el experimento en solución, y por lo tanto, la explicación se encontraría en la cantidad de pireno absorbido sobre las partículas del suelo que provocarían una reducción en la fracción biodisponible del contaminante, es decir un menor número de moléculas de pireno estarían disponibles para ser atacadas por las enzimas excretadas por las cepas degradadoras específicas, lo que daría una disminución en la velocidad de degradación del contaminante (Mathews *et al.*, 2002) ya que esta velocidad viene determinada por la concentración de sustrato disponible. Partiendo de esta conclusión, se puede explicar como estas fases lag son debidas principalmente a la solubilidad del contaminantes, es decir a la menor cantidad del contaminante solubilizado.

Por otro lado Barles *et al.*, (1979) comprobaron como tras la inoculación de un suelo contaminado con Paratión, con un cultivo degradador específico de este, constituido por una cepa de *Pseudomonas stutzeri* y otra de *Pseudomonas aeruginosa*, la biodegradación de este compuesto aumento hasta el 25% de la cantidad del insecticida añadida, mientras que la flora endógena del mismo suelo no había degradado más del 10% del insecticida. (White *et al.*, 1999), observaron que si suelos en los que la mineralización de PHE por la flora endógena del mismo era pequeña cuando eran inoculado con un degradador específico de este contaminante (*Pseudomonas cepa R*), la cantidad de sustrato envejecido degradado aumentaba. Justificaron este resultado afirmando que la actividad de la población microbiana de un suelo, incluso sin que exista en el medio competencia con otros microorganismos por los nutrientes, puede reducirse considerablemente aunque el sustrato esté disponible y permanezca en el medio.

En el caso del **pireno** se observó un efecto contrario, ya que el pireno biodegradado fue superior en presencia del suelo respecto al ensayo en solución, donde todo el pireno estaba biodisponible. Este hecho se debe al efecto cometabólico que pudiese haber provocado la presencia de materia orgánica disuelta, haciendo que la actuación sobre la misma como fuente de carbono estimulase la actuación de una ruta biodegradadora del pireno (Rubio- Bellido *et al.*, 2016).

Existen diferentes conclusiones acerca del uso de inóculos microbianos degradadores específicos en la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos, ya que en algunos estudios se ha observado un incremento en la degradación del contaminante, mientras que en

otros se ha observado un efecto negativo en su degradación (Jobsen *et al.*, 1974; Goldstein *et al.*, 1985; Capelli *et al.*, 2001; Bento *et al.*, 2005); por ejemplo (Towell *et al.* (2011b)), estudiaron, en un suelo agrícola no contaminado, el efecto de la adición de tres inoculos bacterianos degradadores en la mineralización de  $^{14}\text{C}$ - fenildodecano. Cada uno de los inoculos se adicionó al suelo a tres concentraciones distintas. Salvo cuando los inóculos se adcionaron a la concentración mas baja de las tres empleadas, obtuvieron que la duración de la fase lag en las curvas de mineralización fue mayor cuando no se adicionó ningún inóculo. En todos los caso la tasa máxima de mineralización de  $^{14}\text{C}$  aumentó tras la adición de los inóculos. (Bento *et al.*, 2005), estudiaron el efecto de la bioaumentación en la degradación de gasoleo en dos muestras de suelo observando en uno de los suelos una degradación optima tras la adición de un consorcio microbiano degradador específico, mientras que este tratamiento no tuvo un efecto significativo en el otro suelo en la degradación del gasoleo en el suelo procedente de Hong Kong.

## 5. CONCLUSIONES

Las conclusiones que derivan de estos estudios son las siguientes:

1. Los consorcios microbioanos C1, C2 y cepa bacteriana B4, se consiguieron aislar de los suelos ANDUJAR, FUENTEHERIDOS Y ALAJAR respectivamente, mediante la técnica de cultivos de enriquecimiento de cada suelo. Por otro lado las cepas B1, B2 y B3, fueron obtenidas de una solución contaminada de clorpirifós en el laboratorio.
2. En el experimento de la demanda biológica de oxígeno (DBO), se comprobó que los consorcios microbianos C1,C2 y cepas bacterianas B1, B2, B3 y B4, eran capaces de sobrevivir, empleando los contaminantes (clorpirifós y pireno) como única fuente de carbono y de aporte de energía. Las cepas bacterianas aisladas potencialmente degradadoras de clorpirifós, mostraron capacidad de biodegradación de los carbonos presentes en la cadena lateral del insecticida pero no del anillo aromático.
3. El consorcio C1 consiguió mineralizar fenantreno en solución, confirmándose que los consorcios microbianos poseen mayor capacidad para degradar, que las cepas bacterianas aisladas.
4. Una vez demostrado la capacidad de C1 para mineralizar fenantreno en solución, se ha estudio la mineralización en suelo del fenantreno, detectándose un porcentaje de mineralización mucho menor que en solución, debido posiblemente a que los contaminantes podrían quedar absorbidos sobre las partículas del suelo viéndose su biodisponibilidad fuertemente reducida. Por el contrario en el caso del pireno la biodegradación se vió favorecida en el suelo respecto a la observada en solución, probablemente debido a un efecto cometabólico por parte de la materia orgánica disponible en el propio suelo.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Agarwal A, Prajapati R, Singh OP, Raza SK, Thakur LK. Pesticide residue in water – a challenging task in India. *Environ Monit Assess.* 2015; 187: 1-21.

Alexander M. Aging bioavailability and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ Sci Technol.* 2000; 34(20): 4259-4265.

Alexander M. Biodegradation and bioremediation. 2<sup>o</sup> ed. USA: Elsevier; 1999.

ATSDR. Toxicological profiles for Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Government Printing Office: 1995.

Barles RW, Daughton CG, Hsieh DPH. "Accelerated Parathion degradation in soil inoculated with acclimated bacteria under field conditions". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology.* 1979; 8: 647-660.

Bento FM, Camargo FAO, Okeke BC, Frankenberger WT. "Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation". *Bioresource Technology.* 2005; 96: 1049-1055.

Bonaventura C y Johnson FM. "Healthy environments for healthy people: bioremediation today and tomorrow". *Environmental Health Perspectives.* 1997; 105(1): 5-20.

Budzinski H, Raymond N, Nadalig T, Gilewicz M, Garrigues P, Bertr JC *et al.* Aerobic biodegradation of alkylated aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *Org Geochem.* 1998; 28: 337-348.

Casellas M, Grifoll M, Sabaté J, Solanas AM. Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorine by a consortium. *Can J Microbiol.* 1998; 44: 734-742.

Capelli S M, Busalmen JP, de Sanchez S R. "Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria". *International Biodeterioration & Biodegradation.* 2001; 47: 233-238.

El Fantroussi S, Agathos SN. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. *Curr Opin Microbiol.* 2005; 8(3): 268-275.

Foght J, Semple K, Gauthier C, Westlake DWS, Blenkinsopp S, Sergy G *et al.* Development of a standard bacterial consortium for laboratory efficacy testing of commercial freshwater oil spill bioremediation agents. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 1998; 21: 322-330.

Friedrich W, Ralf R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotech.* 2001; 12(3): 259-276.

Ghazali FM, Zaliha RN, Rahman A, Salleh AB, Basri M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Int Biodeter Biodegr.* 2004; 54: 61-61.

Gevao B, Jones KC, Semple KT, Craven A, Burauel P. Nonextractable pesticide residues in soil. *Environ Sci Technol.* 2003; 37(7): 138A-144A.

Goldstein RM, Mallory LM, Alexander M. "Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation". *Applied and Environmental Microbiology.* 1985; 50: 977-983.

Grant RJ, Daniell TJ, Betts WB, "Isolation and identification of synthetic pyrethroid- degrading bacteria". *Journal of Applied Microbiology.* 2002; 92: 534-540.

Grifoll M, Selifonov SA, Gatlin CV, Chapman PJ. Actions of a versatile fluorine-degrading bacterial isolated on polycyclic aromatic compounds. *Appl Environ microbiol.* 1995; 61: 3711-3723.

Hudcova T, Halecky M, Kozliak E, Stiborova M, Paca J. "Aerobic degradation of 2,4-dinitrotoluene by individual bacterial strains and defined mixed population in submerged cultures". *Journal of Hazardous Material.* 2011; 192: 605-613.

ISO 17402:2011. Calidad del suelo. Requisitos y directrices para la selección y aplicación de métodos de evaluación de la biodisponibilidad de contaminantes en suelo y en materiales del suelo (ISO17402:2008) (Ratificada por AENOR en agosto de 2011).

IARC. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical in humans, Polynuclear aromatic compounds. Part. 1, Chemical, Environmental and Experimental Data. Lyon: OMS; 1983.

Jobsen A, McLaughlin M, Cook FD, Westlake DWS. "Effects of amendments on the microbial utilization of oil applied to soil". *Applied Microbiology.* 1974; 27: 166-177.

Kazunga C, Aitken MD, Gold A, Sangaia R. Fluoranthene-2,3-and-1,5-diones are novel products from the bacterial transformation of fluoranthene. *Environ Sci Technol.* 2001; 35: 917-922.

Kazunga C, Aitken MD. Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 1917-1922.

Kim EJ, Oh JE, Chang YS. Effects of forest fire on the level and distribution of PCDD/Fs and PAHs in soil. *Sci. Total Environ.* 2003; 311: 177-189

Kudsk P, Streibig JC. "Herbicides, a two edged sword" (Review). *Weed Research.* 2003; 43(2): 90-102.

Lo CC. Effect of pesticides on soil microbial community. *J Environ Sci Heal.* 2010; 45: 348-359.

Mastral AM, López JM, Callén M-S, Garcia T, Murillo R, Navarro MV. Spatial and temporal PAH concentrations in Zaragoza, Spain. *Sci. Total Environ.* 2003; 307: 114-124.

Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. Ed. "Bioquímica". Tercera Edición. Núñez de Balboa, 120, Madrid: Pearson Education; 2002.

Mikesková H, Novotný C, Svobodová K. "Interspecific interactions in mixed microbial cultures in a biodegradation perspective". *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2012; 95: 861-870.

Motelay-Massei A, Garban B, Phagne-Larcher K, Chevreuril M, Ollivon D. Mass balance for polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban watershed of Le Havre (France): Transport and fate of PAHs from the atmosphere to the outlet. 2006; 40: 1995-2006.

Mrozik A, Piotrowska-Seget Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol Res.* 2010; 165: 363-375.

Ngigi A, Getenga Z, Boga H, Ndalut P. "Biodegradation of phenylurea herbicide diuron by microorganism from long-term-treated sugar-cultivated soils in Kenya". *Toxicological & Environmental Chemistry.* 2011; 93: 1623-1635.

Pino M, Penuela G. "Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site". *International Biodeterioration & Biodegradation.* 2011; 65: 827-831.

Reid BJ, Mcleod CJ, Lee PH, Morris AW, Stokes JD, Semple KT. A simple <sup>14</sup>C-respirometric method for assessing microbial catabolic potential and contaminant bioavailability. *FEMS*

Microbiol Lett. 2001; 196: 141-146.

Rubio- Bellido M, Madrid F, Morillo E, Villaverde J. Assisted attenuation of a soil contaminated by diuron using hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and organic amendments. Science of the total environment. 2015; 502: 669-705.

Rubio-Bellido M, Morillo E, Villaverde J. Effect of addition of HPBCD on diuron adsorption-desorption, transport and mineralization in soils with different properties. Geoderma. 2016; 265: 196-203.

Semple KT, Doick KJ, Jones KC, Burauel P, Craven A, Harms H. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. Environ Sci Technol. 2004; 38: 228A-231A .

Semple KT, Morriss AW, Paton GI. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. Eur J Soil Sci. 2003; 54: 809-818.

Sorensen SR, Juhler RK, Aamand J. Degradation and mineralisation of Diuron by *Sphingomonas* sp. SRS2 and its potential for remediating at a realistic  $\mu\text{g L}^{-1}$  Diuron concentration. Pest Manag Sci. 2013; 69(11): 1239-1244.

Sugiura K, Ishihara M, Shimauchi T, Harayama S. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. Environ Sci Technol. 1997; 31: 45-51.

Thompson IP, Van der Gast CJ, Ciric L, Singer AS. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. Environ Microbiol. 2005; 7(7): 909-915.

Towell MG, Paton GI, Semple KT. "The biodegradation of crude oil components: Impact of oil concentration, nutrient addition and bioaugmentation". Environmental Pollution. 2011b; 159: 3777-3783.

Tyagi M, Da Fonseca MM, de Carvalho CCCR . Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. Biodegradation. 2011; 22: 231-241.

Venkateswaran K, Hoaki T, Maruyama T. Microbial degradation of resins fractionated from Arabian light crude oil. Can J Microbiol. 1995; 41: 418-424.

White JC, Hunter M, Pignatello J J, Alexander M. "Increase in bioavailability of a aged phenanthrene in soils by competitive displacement with pyrene". *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1999; 18: 1728-1732.

Villaverde J, Rubio-Bellido M, Merchan F, Morillo E. Biorremediation of diuron contaminated soils by a novel degrading microbial consortium. *Journal of Environmental Management*. 2017; 188: 379-386.

Wilcke W, Krauss M, Safronov G, Fokin AD, Kaupenjohann M. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils of the Moscow región – Concentrations, temporal trends, and small-scale distribution. *J. Environ. Qual.* 2005; 34: 1581-1590.

Wong F, Robson M, Diamond ML, Harrad S, Truong J. Concentrations and chiral signatures of POPs in soils and sediments: A comparative urban versus rural study in Canada and UK. *Chemosphere*. 2009; 74: 404-411.