

**INSTITUTO DE RECURSOS  
NATURALES Y AGROBIOLOGIA  
DE SEVILLA (CSIC)**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA**

**REMEDIACIÓN BIOLÓGICA DE SUELOS CONTAMINADOS:  
BIODISPONIBILIDAD DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS  
AROMÁTICOS ASOCIADOS A COLOIDES DEL SUELO Y A  
LIQUÍDOS EN FASE NO ACUOSA**

**Memoria que presenta  
Lahlou Mohammed  
Para aspirar al Título de Doctor**

112 227  
19 de Octubre de 2001  
Negociado de Farmacia  
*[Signature]*

Fdo.: Lahlou Mohammed

*[Signature]*

El Director de la tesis

El Tutor

*[Signature]*

*[Signature]*

Fdo.: José Julio Ortega Calvo

Manuel Megías Guijo

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	9
<b>A. Introducción</b> .....	12
I.- Estructuras de algunos tipos de arcilla dominante en la naturaleza.....	15
II.- Efecto de la arcilla sobre la supervivencia de los microorganismos del suelo. ....	16
III.- Cinética de adsorción de los compuestos hidrófobos.....	18
IV.- Efecto de la materia orgánica sobre el destino de los contaminantes.....	18
V.- Efecto de la composición química del medio sobre la capacidad de adsorción de las arcillas.....	22
VI.- Importancia de los microorganismos en la degradación de los contaminantes....	23
VI.1.- Mecanismos de degradación de los HPAs.....	24
VII.- Envejecimiento de los contaminantes en el ambiente.....	26
VIII.- Papel de los tensioactivos.....	28
IX.- Líquidos en fase no acuosa (NAPLs).....	29
IX.1.- Mecanismos de uso de sustratos secuestrados en NAPLs.....	30
X.- Efecto de los componentes del suelo sobre la adhesión de las bacterias.....	31
<b>B. OBJETIVOS</b> .....	34
<b>C. MATERIALES Y METODOS</b> .....	37
I.- Reactivos.....	38
II.- Suelos.....	38
III.- Componentes de los suelos.....	39
III.1.- Arcillas.....	39
III.2.- Fracciones húmicas.....	39
III.3.- Complejos ácidos húmicos/fúlvicos y arcilla.....	40
III.4.- Agregados de complejos/arcilla y PVA sobre vidrio.....	43
III.5.- Fracción arenosa.....	43
III.6.- NAPLs.....	43

<b>IV.- Bacterias, medios y condiciones de cultivo.....</b>	<b>44</b>
<b>V.- Caracterización de las bacterias.....</b>	<b>46</b>
<b>VI. Adsorción.....</b>	<b>46</b>
VI.1.- Adsorción de fenantreno a suelos.....	46
VI.2.- Adsorción de fenantreno a componentes modelo de suelos.....	47
VI.3.- Adsorción de HPAs a componentes modelo de suelos en presencia de hierro.....	47
VI.3.1.- Isotermas de adsorción.....	48
VI.3.2.- Isotermas de adsorción extendidas y difracción de rayos-X.....	49
VI.3.3.- Coeficientes de distribución.....	49
<b>VII. Desorción.....</b>	<b>49</b>
VII.1.- Experimentos en batch con $^{14}\text{C}$ .....	49
VII.2.- Experimentos en columnas con $^{14}\text{C}$ .....	50
VII.3.- Experimentos en batch con HPLC (efecto del hierro).....	51
<b>VIII. Biodegradación.....</b>	<b>52</b>
VIII.1. Experiencias de mineralización en suelos previamente no contaminados de diferente composición.....	52
VIII.2. Experiencias de mineralización en suelos con NAPLs.....	52
VIII.2.1. Efecto del estado fisiológico de la <i>Clavibacter xyli</i> sobre su capacidad de degradación de fenantreno y de naftaleno en presencia de tensioactivos.....	53
VIII.3. Experiencias de mineralización en suelos contaminados.....	53
VIII.4. Experiencias de mineralización con componentes modelo de suelo.....	54
VIII.5. Ensayos con envejecimiento.....	56
<b>IX. Transporte bacteriano.....</b>	<b>57</b>
<b>D. RESULTADOS .....</b>	<b>60</b>
<b>I.- Efecto de los componentes del suelo sobre la biodisponibilidad de fenantreno .61</b>	<b>61</b>
I.1.- Efecto de la materia orgánica y la fracción arcillosa de los suelos.....	61

I.1.1.- Mineralización de fenantreno por la flora microbiana autóctona.....	61
I.1.2.- Mineralización de fenantreno en suelos inoculados .....	62
I.1.3.- Capacidad de adsorción de fenantreno por los suelos.....	63
I.1.4.- Mineralización en suelo de fenantreno inicialmente adsorbido a partículas modelo.....	63
I.2.-Efecto de los líquidos en fase no acuosa (NAPLs).....	64
I.2.1.- Efecto de un NAPL sobre la movilidad de fenantreno en suelos.....	64
I.2.2.- Influencia del tipo de NAPL sobre la biodisponibilidad de PAH en suelos.....	65
I.2.3.- Efecto de la agitación, de bacterias degradadoras del NAPL y del tensioactivo Triton X-100 sobre la biodegradación de PAH en NAPLs.....	66
I.2.4.- Efecto de la dispersión (superficie) y del volumen del NAPL.....	68
I.2.5.- Estudio comparativo del efecto, a distintas concentraciones, de los tensioactivos Triton X-100 y Tween 80, en combinación con la fuente de carbono de precultivo de la bacteria <i>Clavibacter xyli</i> sobre la biodegradación de fenantreno disuelto en DBP.....	68
<b>II.- Efecto de partículas modelo del suelo sobre la biodisponibilidad de HPA .....</b>	<b>72</b>
II.1. Adsorción-desorción.....	72
II.1.1. Efecto de la materia orgánica presente en las partículas.....	72
II.1.1.1. Efecto de la naturaleza de la fracción húmica en las partículas sobre la adsorción-desorción de fenantreno: estudio comparativo de un ácido húmico y un ácido fúlvico del mismo origen.....	72
II.1.1.2. Determinación de las isotermas de adsorción y coeficientes de distribución en partículas con valores diferentes de fracción de carbono orgánico ( $f_{oc}$ ).....	73
II.1.1.3. Influencia de la $f_{oc}$ sobre la desorción de fenantreno en un sistema estanco (“batch”).....	74
II.1.1.4. Influencia de la $f_{oc}$ sobre la desorción de fenantreno en columnas de suelo.....	74
II.1.1.5. Adsorción-desorción de HPA con partículas de alto $f_{oc}$ : (Ca-SWy)-AHs4 ( $f_{oc}$ = 0.211).....	75
II.1.2. Influencia de la composición catiónica del medio sobre la adsorción de HPA a partículas de arcilla.....	76
II.1.2.1. Isotermas de adsorción.....	76

II.1.2.2. Estudio de difracción de rayos-X.....	77
II.1.2.3. Coeficientes de distribución.....	78
II.1.2.4. Desorción.....	78
II.2.- Biodegradación.....	80
II.2.1. Efectos de componentes modelo del suelo sobre la biodegradación de fenantreno.....	80
II.2.1.1. Biodegradación de fenantreno a una concentración de 0.1 µg/ml .....	80
II.2.1.1.1. Efecto de las arcillas.....	80
II.2.1.1.2. Efecto de los ácidos fúlvicos en solución.....	81
II.2.1.1.3. Efecto de los complejos arcillo-fúlvicos.....	81
II.2.1.2. Biodegradación de fenantreno a una concentración de 1 µg/ml.....	82
II.2.1.2-1. Efecto de las arcillas.....	82
II.2.1.2.2. Efecto de los ácidos fúlvicos en solución.....	83
II.2.1.2.3. Efecto de los complejos arcillo-fúlvicos.....	84
II.2.2. Efecto del contenido en materia orgánica sobre la biodegradación de fenantreno adsorbido a complejos arcillo-húmicos.....	85
II.2.3. Modelización de las curvas de mineralización de fenantreno inicialmente adsorbido a componentes modelo del suelo .....	85
II.2.4. Biodegradación de la fracción resistente a la desorción.....	88
II.2.4.1. Biodegradación de fenantreno con partículas con valores moderados de $f_{oc}$ .....	89
II.2.4.2. Biodegradación de HPA con partículas de alto $f_{oc}$ : (Ca-SWy)-AHs4 ( $f_{oc}$ = 0.211).....	91
II.2.4.3. Estudio comparativo de cinco bacterias degradadoras de fenantreno.....	93
II.2.4.4. Biodegradación de HPA adsorbidos a arcillas en presencia de hierro: Ca-SWy( $Fe^{3+}$ ) y Fe-SWy.....	94
II.2.5. Efecto del envejecimiento sobre la biodegradación de HPA adsorbidos.....	95
II.3. Transporte bacteriano (adhesión).....	96
II.3.1. Características físico-químicas de las bacterias.....	96
II.3.2. Transporte de las bacterias a través de suelo saturado.....	97
II.3.3. Efecto de los componentes del suelo sobre el transporte microbiano.....	98
II.3.4. Influencia del contenido en materia orgánica ( $f_{oc}$ ) de la arena sobre el transporte bacteriano.....	99

<b>II.3.5.</b> Influencia de la fuente de carbono de pre-cultivo sobre el transporte bacteriano.....	101
<b>II.3.6.</b> Efecto del tensioactivo Triton X-100 sobre el transporte bacteriano.....	102

### **III.- Estudio de suelos contaminados como aproximación a las condiciones reales** .....

<b>III.1.-</b> Estudio del potencial de biodegradación de las bacterias autóctonas.....	103
<b>III.2.-</b> Efecto de un aporte bacteriano exógeno como medida para remediar los suelos que presentan una carencia de bacterias que degradan los hidrocarburos.....	105
<b>III.3.-</b> Efecto de los tensioactivos Triton X-100 y Tween 80 sobre la biodegradación de los hidrocarburos en suelos contaminados.....	106

## **E. DISCUSIÓN**.....

<b>I.- Efecto de los distintos componentes del suelo sobre la biodisponibilidad de fenantreno</b> .....	108
<b>I.1.-</b> Biodegradación de fenantreno en suelos de diferente composición.....	108
<b>I.2.-</b> Capacidad de adsorción de los suelos.....	109
<b>I.3.-</b> Efecto de los líquidos en fase no acuosa (NAPLs) sobre la biodisponibilidad de HPA en suelos.....	111
<b>I.3.1.-</b> Efecto de la identidad y dispersión del NAPL .....	111
<b>I.3.2.-</b> Efecto de tensioactivos biológicos sobre la biodegradación de HPAs en NAPLs.....	112
<b>I.3.3.-</b> Efecto de tensioactivos sintéticos sobre la biodegradación de HPAs en NAPLs.....	112
<b>I.3.4.-</b> Efecto combinado de la fuente de carbono de pre-cultivo de la bacteria y de Triton X-100 o Tween 80 sobre la biodegradación de fenantreno disuelto en el DBP.....	114
<b>I.3.5.-</b> Efecto combinado de la fuente de carbono de pre-cultivo de la bacteria y de Triton X-100 o Tween 80 sobre la biodegradación de naftaleno disuelto en el DBP.....	116
<b>II.- Efecto de partículas modelo del suelo sobre la biodisponibilidad de HPA</b> .....	117
<b>II.1.</b> Mecanismos de adsorción-desorción.....	117

<b>II.1.1. Papel de la materia orgánica.....</b>	<b>117</b>
<b>II.1.2. Papel del hierro en solución.....</b>	<b>120</b>
<b>II.2. Biodegradación de HPA en presencia de partículas modelo.....</b>	<b>122</b>
<b>II.2.1.- Efectos estimulatorios de componentes modelo del suelo sobre la biodegradación de fenantreno en suspensiones bacterianas.....</b>	<b>122</b>
<b>II.2.2.- Biodegradación de la fracción resistente a la desorción.....</b>	<b>124</b>
<b>II.2.3.- Efecto del envejecimiento sobre la biodisponibilidad de fenantreno en presencia del Ca-SWy y del complejo (Ca-SWy)-AHs5.....</b>	<b>128</b>
<b>II.3.- Influencia de los componentes del suelo sobre el transporte de las bacterias degradadoras de HPAs.....</b>	<b>130</b>
<b>III. Biodegradación de HPA en tres tipos de suelos contaminados .....</b>	<b>133</b>
<b>F. CONCLUSIONES.....</b>	<b>136</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>138</b>



## Resumen

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) son contaminantes muy comunes en los suelos. Uno de las vias principales para eliminar tales contaminantes es la degradación por los microorganismos del suelo, que puede ser aumentada a través de las tecnologías de biorremediación. Sin embargo, la degradación microbiana de PAHs en el suelo está limitada por diferentes factores que, en la práctica, hace que a veces la biorremediación no sea tan eficaz como se espera. Uno de estos factores es la biodisponibilidad. La descontaminación del suelo por métodos biológicos puede resultar en concentraciones residuales superiores a los límites estándares legales, que corresponden a compuestos químicos que no son accesibles por los microorganismos. Una de las fracciones residuales más importantes está constituida por los contaminantes adsorbidos a los coloides del suelo, principalmente la materia orgánica y las arcillas, con gran capacidad de adsorción.

Muchos estudios anteriores han demostrado que la materia orgánica del suelo está implicada en la adsorción de los contaminantes orgánicos hidrófobos en los suelos saturados con agua, y que existe una fuerte correlación entre la amplitud de adsorción y el contenido en materia orgánica. La influencia de la fuente y de la composición de las fracciones húmicas y no húmicas sobre la adsorción de los compuestos orgánicos ha sido estudiada anteriormente. La afinidad de los compuestos orgánicos hidrófobos por las arcillas del suelo ha sido generalmente considerada de menos importancia debido a la superficie hidrófila de estas últimas. Sin embargo, la contribución de las superficies de arcilla a la adsorción hidrófoba en los suelos puede ser muy importante, como se ha demostrado en esta tesis.

Hay muy poca información sobre cómo las interacciones entre la materia orgánica y la arcilla afectan la biodegradación de los contaminantes orgánicos hidrófobos. Este estudio se ha realizado para comparar las tasas de biodegradación de una serie de HPAs en sistemas con diferentes propiedades fisico-químicas, para estimar su biodegradabilidad en estado adsorbido.

Esta tesis se ha intentado acercar a distintos problemas clave para el diseño de una técnica de biorremediación. Dado que las sustancias húmicas se encuentran siempre en la naturaleza en asociación con los coloides minerales, nos ha interesado el estudio del efecto de la presencia del ácido humico y del ácido fulvico de distintos orígenes y a distintas concentraciones cuando están asociados a la arcilla sobre la biodisponibilidad de HPAs. En la misma línea de estudio se ha estudiado la velocidad de transporte de fenantreno (HPA representativo de los contaminantes hidrófobos presentes en suelos y aguas contaminadas) en columnas de suelo conteniendo distintos sorbentes modelo para ver el efecto de los componentes del suelo sobre el transporte de este último. Debido a que la mayoría de las bacterias seleccionadas aisladas de suelos contaminados presentan una gran capacidad de degradación de la fracción fácilmente desorbida, se han realizado además una serie de experimentos sobre la capacidad degradadora de la fracción resistente a la desorción por las distintas bacterias.

Los resultados obtenidos varían entre efectos inhibitorios y estimulatorios de la biodisponibilidad dependiendo del sorbente estudiado. Se ha estudiado además el efecto de la composición química del medio, como por ejemplo la presencia de hierro, de calcio o de un medio catiónico complejo, sobre la capacidad de adsorción de algunos componentes modelo del suelo, incluyendo la arcilla y complejos arcillo-ácido humico. Se ha observado que el hierro tiene un efecto inhibitorio sobre la biodisponibilidad de fenantreno y de pireno adsorbido.

El estudio del efecto combinado de los tensioactivos Triton X-100 y Tween 80 y del estado fisiológico de la bacteria *Clavibacter Xyli* S1 sobre su capacidad degradadora ha revelado la importancia de la fuente de carbono y de energía sobre la respuesta de la bacteria a los tensioactivos. De hecho, esta bacteria tuvo una menor resistencia al Triton X-100 cuando la bacteria se precultivó con el naftaleno. Sin embargo, tras precultivar la bacteria con fenantreno, no se observó toxicidad del tensioactivo.

El transporte bacteriano a través de columnas conteniendo distintos componentes del suelo también ha sido estudiado con el objetivo de seleccionar bacterias que presentaran las mejores cualidades, tales como un mayor capacidad intrínseca de migrar en el suelo o la posibilidad de ser transportada aplicando algún tipo de tensioactivos. Esta mayor posibilidad de migración frente a su capacidad de degradación les permitiría ser utilizadas en la recuperación de sitios contaminados en la sub-superficie, tales como acuíferos.

Por otra parte, se ha ensayado la biodegradación autóctona en dos suelos contaminados de España y en Marruecos. La muestra que presentó un mayor tiempo de contacto con el contaminante mostró un gran capacidad de biodegradación. Se ensayó también la adición de bacterias exógenas y tensioactivos.

Se concluye que el éxito de un técnica de biorremediación dependerá de la composición química y mineral del suelo estudiado, de la naturaleza, la fuente y la concentración de la materia orgánica, de la estructura del compuesto, del microorganismo usado y del efecto del envejecimiento.

# **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, muchos países europeos, al igual que Estados Unidos y Canadá han coincidido en el hecho de afrontar un serio problema de degradación del suelo y de sus aguas subterráneas. Esta situación es el resultado de más de 150 años de actividad industrial, desarrollada con una concienciación ambiental limitada, y que ha provocado que, por ignorancia o falta de recursos, se hayan vertido grandes cantidades de contaminantes al ambiente. Este deterioro ha sido la alarma que ha despertado la preocupación de los dirigentes, obligando a estos últimos a pensar sobre las medidas que hay que plantear para preservar algunos recursos bastante escasos en determinadas ocasiones.

En general, los compuestos orgánicos comúnmente presentes en los emplazamientos contaminados no se encuentran individualmente sino como mezclas simples o complejas. Estas mezclas pueden estar relacionadas con la liberación, el almacenamiento o el transporte de muchos compuestos en aguas superficiales o subterráneas, en sistemas de tratamiento de residuos, y en suelos y sedimentos. El número de los productos químicos encontrados hasta ahora es enorme y los tipos de mezclas son también incalculables. Las concentraciones de los compuestos individuales varían bastante, y pueden ser más de 1 g/l de agua o 1 g/kg de suelo en las zonas sujetas a derrames desde tanques de coches y camiones, a la descarga de residuos industriales o a los escapes desde el almacén o el depósito de los productos industriales. En cambio, las concentraciones pueden ser tan bajas como 1 µg/l de agua o 1 µg/kg de suelo, a cierta distancia del punto del derrame o de almacenamiento. Aunque estas concentraciones son bajas, algunos productos químicos son tóxicos; además, algunos productos químicos a bajas concentraciones son sujetos de bioamplificación y pueden alcanzar niveles que tienen efectos perjudiciales sobre los humanos, los animales y las plantas.

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) son unos de los contaminantes del medio ambiente con mayor presencia en los suelos, poseyendo un gran potencial cancerígeno y mutágeno. Las vías de exposición humana a los HPAs son

la aspiración (la respiración del aire contaminado), la ingestión (bebidas y comida contaminada) y la absorción por la piel. Debido a su naturaleza hidrófoba, los HPAs pueden migrar travesando las membranas lipídicas de la célula y pueden concentrarse en los tejidos grasos. En la actualidad está demostrada su bioacumulación en las plantas (218) y en algunos animales (51,98), evidenciando su transferencia en la cadena alimentaria.

Los HPAs son moléculas que están constituidas de dos o más anillos aromáticos, pudiendo además estar presentes otras estructuras tales como anillos alifáticos (Fig 1). Las características químicas de estas moléculas, tales como la ausencia de grupos polares, hacen que estos compuestos sean muy hidrófobos, lo que se refleja en su baja solubilidad en agua y en la tendencia a adsorberse a la superficie de las partículas orgánicas, o a estar en la fase líquida no acuosa de las zonas contaminadas (34,85). La hidrofobicidad de los HPAs se traduce en valores altos de sus coeficientes de reparto octanol-agua (Kow) (Tabla. 1). Con el aumento del peso molecular, la hidrofobicidad aumenta, provocando una disminución en la concentración en el agua de los HPAs de gran peso molecular.

Una serie de procesos, incluyendo la volatilización, la adsorción a la materia orgánica, la oxidación química, la fotooxidación, la bioacumulación, el lavado y la biodegradación son los mecanismos principales que controlan el destino de los HPAs en el medio ambiente (34,35). Una serie de bacterias, de hongos y de algas pueden metabolizar los HPAs, llevando a cabo

Tabla 1: Pesos moleculares (PM), solubilidades en agua (S), coeficientes de reparto octanol-agua y coeficientes de sorción de algunos HPAs y benceno.

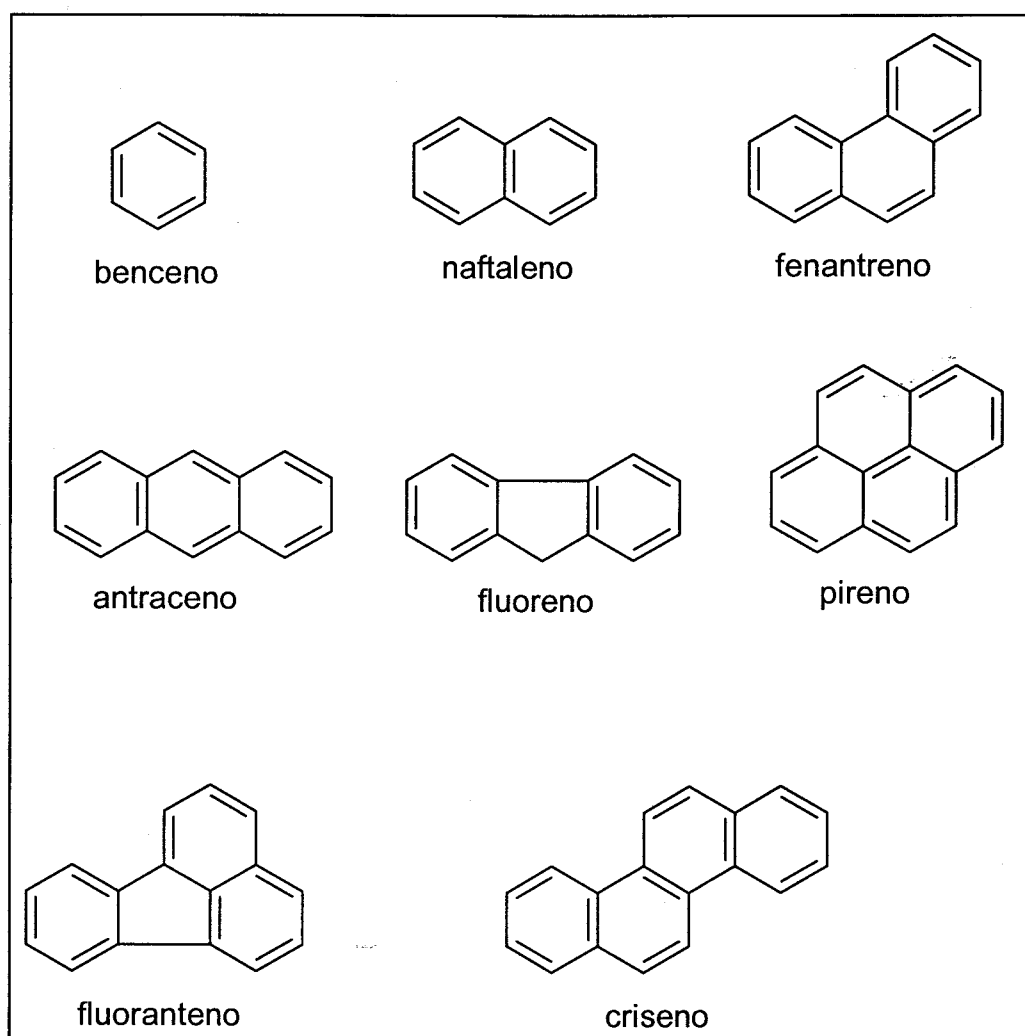
HPA	PM [g/mol]	S [Kg/m <sup>3</sup> ] <sup>d,b</sup>	Koc	Log Kow <sup>c</sup>
Benceno	78	1780 <sup>a</sup>	83 <sup>a</sup>	2.13 <sup>a</sup>
Naftaleno	128	31.7	1300 <sup>a</sup>	3.35
Fluoreno	166	1.98		4.18
Fenantreno	178	1.29	23000 <sup>a</sup>	4.57
Antraceno	178	7.30.10 <sup>-2</sup>	26000 <sup>a</sup>	4.54
Pireno	202	1.35.10 <sup>-1</sup>	84000 <sup>a</sup> 62700 <sup>b</sup>	5.18
Fluoranteno	202	2.60.10 <sup>-1</sup>		5.22
Criseno	228	2.0.10 <sup>-3</sup>		5.79

<sup>a</sup> Karickhoff et al., 1979(110); <sup>b</sup> Means et al., 1980(138); <sup>c</sup> Miller & Wasik(141), 1985;

<sup>d</sup>Dzombak & Luthy, 1984(53).

su mineralización, especialmente los HPAs de bajo peso molecular, o su transformación parcial mediante cometabolismo, particularmente los HPAs de gran peso molecular (34,35,75,220).

Fig 1: estructura química de algunos HPAs y el benceno.



### I.- Estructuras de algunos tipos de arcilla dominante en la naturaleza

Las arcillas son laminas de silicatos que están organizados como laminas empaquetadas de una manera mas o mënos regular. En las arcillas de tipo 1:1 cada lamina está formada por condensación de una hoja tetrahédrica de  $\text{Si}(\text{O},\text{OH})_4$  con una hoja octahédrica de  $\text{Al}_2(\text{OH})_6$ , como en la caolinita. La halloysita, que se encuentra de una manera abundante en los suelos que derivan de la ceniza volcánica, tienen la misma estructura basica pero las láminas en la forma hidratada, están separadas por una capa de moléculas de agua. Además, la halloysita generalmente se presenta como partículas

tubular y esferoidal mientras que la caolinita generalmente adopta una morfología plana. En las arcillas de tipos 2:1, las hojas tetrahédricas gibbsíticas están localizadas entre dos hojas octahédricas digidas hacia el exterior. Tal estructura se encuentra en la montmorillonita y la illita.

Los minerales de arcilla son los adsorbentes dominantes de los compuestos orgánicos en los subsuelos y los sedimentos que contienen menos de 1% de carbono orgánico. La arcilla puede contribuir significativamente a la adsorción de los compuestos orgánicos no iónicos a las superficies de los suelos. En una arcilla de tipo 1:1, tal como la caolinita, donde las laminas se mantienen fuertemente juntas, existe una superficie más pequeña por lo que hay menos capacidad de adsorción que las arcillas de tipo 2:1, ocurriendo la adsorción sobre su superficie externa. En una arcilla de tipo 2:1, tal como la montmorillonita, la estructura de la arcilla puede expandirse; tales arcillas pueden adsorber los compuestos orgánicos sobre las superficies internas y externas. Con estas dilataciones de la arcilla, las moléculas orgánicas, los nutrientes inorgánicos y el agua pueden penetrar entre las láminas del mineral. Por tanto, la disponibilidad de las superficies externa e interna de algunos minerales de arcilla es siempre de gran importancia.

La presente tesis doctoral se ha centrado en el estudio de la montmorillonita, debido a su abundancia en la naturaleza y su gran superficie (entre 600 y 800 m<sup>2</sup>/g (8)), lo que causa una notable influencia sobre el destino de los contaminantes orgánicos en los suelos.

## **II.- Efecto de la arcilla sobre la supervivencia de los microorganismos del suelo.**

El estudio de la influencia del medio ambiente sobre la composición y la actividad de la población microbiana del suelo es uno de los principales objetivos de la bioquímica de la ecología de los microorganismos. La síntesis de una envoltura alrededor de las células bacterianas (202) puede ofrecer protección contra las fluctuaciones extremas en el microambiente, y de esta manera aumentar la supervivencia bacteriana. El efecto protector de las arcillas, especialmente la montmorillonita, se ha manifestado en la capacidad de los microbios del suelo a resistir a la desecación, la exposición a una presión hipertónica, y la irradiación ultravioleta (13,14,62,198). Por ejemplo, Bushby and Marshall (25,26) han encontrado que las estirpes de *Rhizobium* de crecimiento rápido no sobreviven en un suelo arenoso seco y a 70°C, aunque esto no ocurre cuando el suelo se modifica previamente añadiendo 5 %



w/w de montmorillonita o illita. En los suelos suplementados con arcilla, las bacterias aparecen rodeadas de una envoltura de arcilla, capaz de controlar la tasa del movimiento de agua al interior y al exterior de las células durante la presencia de la humedad o la sequedad. Al contrario, una estirpe de *Rhizobium* de crecimiento lento, introducida en el mismo suelo arenoso, muestra su resistencia a la desecación y ausencia de la influencia de la arcilla sobre su supervivencia. La resistencia de la segunda estirpe a la desecación se puede explicar por la gran capacidad de producción de polisacáridos extracelulares en las condiciones deshidratantes. Estos últimos, como la arcilla, tienen una gran afinidad por el agua (172).

Además de su capacidad protectora de las células bacterianas, las arcillas pueden actuar como un agente que permite de cimentar las partículas del suelo. Por tanto, la adición de la arcilla a los suelos, especialmente aquellos con una textura frágil, puede alterar la reorganización espacial de las partículas y la distribución del tamaño de los poros dentro de los agregados. Tal modificación de la arquitectura del agregado beneficia a la población bacteriana, por el aumento de la proporción de los poros de un cierto rango de tamaño, en los cuales los depredadores de las bacterias están excluidos.

Aunque la adhesión de los microorganismos al suelo puede ser beneficiosa por el hecho de que están cerca de los nutrientes que están adsorbidos a la arcilla y a las superficies minerales, estos substratos potenciales pueden no estar rápidamente disponibles (64). Por tanto, la descomposición de los compuestos orgánicos de bajo peso molecular puede ser facilitada o inhibida por adsorción a las superficies de arcilla. Además, las superficies de la arcilla podrían acumular sustancias que son tóxicas para los microorganismos (antibióticos, pesticidas, etc.). De la misma manera, la adsorción de enzimas extracelulares por las arcillas y los minerales (24,200) puede limitar el crecimiento microbiano en el suelo. Por estas razones las arcillas pueden tener un efecto inhibitorio sobre la actividad microbiana (132,195). En efecto, por encima de una cierta concentración, la adición de las arcillas a los sistemas siempre conduce a una reducción en la actividad microbiana (132). Esto es generalmente atribuido a la difusión del oxígeno y de los nutrientes, que queda restringida para la célula cuando está envuelta por las partículas de arcilla (66,126).

### **III.- Cinética de adsorción de los compuestos hidrófobos.**

La adsorción está considerada como un proceso que disminuye la concentración del sustrato disponible a los microorganismos en el suelo. La adsorción es habitualmente tratada como un rápido equilibrio, un proceso relativamente reversible, pero los estudios han demostrado que la adsorción está compuesta de dos fases: con una etapa inicial rápida (de menos de una hora hasta varias horas), que se realiza principalmente en las zonas hidrófobas a la superficie del suelo, seguida por una lenta etapa larga (días) y en la que ocurre la difusión del soluto a los sitios de adsorción interna, que controla la segunda tasa (ref liv, intro,p11). Por tanto, la cinética de adsorción parece estar controlada por la difusión dentro de las partículas de los sedimentos y los suelos (223).

La biodegradación de compuestos adsorbidos también se ha demostrado en muchas ocasiones estar constituida de dos fases: una rápida y una lenta (119). La predicción de la tasa de biodegradación del compuesto adsorbido a partir de la tasa de desorción espontánea (119) no puede ser siempre buena, debido a la existencia de casos donde las tasas de degradación han superado las tasas de desorción (resultados de esta tesis).

#### **IV.- Efecto de la materia orgánica sobre el destino de los contaminantes.**

En muchos ambientes acuáticos y terrestres, la materia orgánica (MO) natural está dominada por las sustancias húmicas (SH) en forma de ácidos fulvicos (AF, solubles en agua a pH ácido y básico) y ácidos húmicos (AH, insoluble a pH ácido). Estas sustancias son macromoléculas orgánicas naturales de gran peso molecular, con peso molecular medio del orden de 1.000 dalton o más, y con aromaticidad y funcionalidad variable. Cuando se adsorben a las superficies minerales, las SH pueden captar y por tanto inmovilizar metales traza, radionucleidos, y contaminantes orgánicos no iónicos (27,183), y pueden también alterar las propiedades de la superficie mineral de la arcilla (205) y las cinéticas de floculación (121). La determinación de las formas físicas y las formas de las SH adsorbidas es esencial para el desarrollo de modelos realísticos de la dinámica de los contaminantes, particularmente respecto a el reparto de los contaminantes orgánicos hidrófobos (44,137,166,179). Los materiales orgánicos heterogéneos dominan la materia orgánica en muchos medios acuáticos y siempre forman una capa sobre las superficies minerales.

Aunque las características de las sustancias húmicas pueden variar bastante dependiendo del origen del material, generalmente es aceptado que los ácidos húmicos tienen un gran contenido fenólico, una gran aromaticidad, gran contenido en carbono, un gran peso molecular y menos oxígeno que los ácidos fulvicos (111).<sup>1</sup> Las proporciones elementales en oxígeno y en carbono han sido usadas como una indicación de la polaridad de la sustancia húmica (136). Una mayor proporción de O/C podría indicar una mayor polaridad y por consecuencia una mayor solubilidad en agua, pero lo contrario de esta relación se puede ver entre el O/C y la adsorción de las sustancias húmicas en las superficies minerales. Los ácidos húmicos tienen un mayor peso molecular que los ácidos fulvicos, pero los pesos moleculares de las sustancias húmicas de origen terrestre son generalmente más grandes que los de origen acuático (38). No es sorprendente que los ácidos fulvicos constituyan la sustancia húmica típicamente dominante en el medio acuático (123).

La variabilidad de la materia orgánica del suelo (MOS) en la naturaleza, especialmente con respecto a la polaridad y del contenido del carbono aromático, parece ser significativa en el control de la reactividad con los compuestos orgánicos hidrófobos (COH) (114). La diagenesis y la maduración de la MOS provocan cambios en la cantidad relativa de los grupos funcionales que contienen los oxígenos y la proporción atómica H/O o O/C. Se ha propuesto que las conclusiones respecto al grado de condensación como una primera aproximación para describir la afinidad de la materia orgánica del suelo para la adsorción de los COH (77). Se debe prestar atención al origen de la MOS (i.e, algas, lignina, petróleo, etc.) y a cómo los orígenes químicos y las diferencias influyen sobre la adsorción. Las diferencias en la adsorción de los compuestos orgánicos en las diferentes fracciones de la MO (ácidos fulvicos, húmicos y húmina) son bien conocidas (70,71).

El impacto ambiental de los compuestos orgánicos sintéticos sobre los suelos y las aguas naturales está muy condicionado por la cantidad y el tipo de ácido húmico(128) presente en los sistemas. La importancia del pH y de la fuerza iónica sobre las interacciones entre los compuestos policíclicos aromáticos y los ácidos húmicos está bien establecida. El significado de la estructura física de algunos ácidos húmicos disueltos en sus interacciones con los compuestos orgánicos sintéticos ha sido atribuido al secuestro en una "trampa" constituida por los vacíos estructurales (178,181), la superficie de adsorción (79), y el reparto del soluto no iónico al interior hidrófobo de estructuras similares a micelas (42,216).

Se ha estudiado recientemente el efecto de las propiedades moleculares de las SH disueltas sobre la adsorción de compuestos orgánicos sintéticos presentes en aguas residuales de origen industrial y municipal (106) (107). El peso molecular de las SH es responsable de la asociación y el transporte de contaminantes orgánicos no polares(38,40) y ligeramente polares (pesticidas) (163,164). A expensas de su importante papel ambiental, las estructuras moleculares y conformacionales de las SH están muy lejos de ser aclaradas. Una creencia común es que son moléculas de cadena larga, en espiral, que pueden estar ligeramente asociadas de una manera cruzada (194). El modelo en espiral al azar (72) describe las macromoléculas humicas como más enrolladas densamente a gran concentración, bajo pH y alta fuerza iónica. En cambio, se comportan como polímeros lineales y flexibles a pH neutro, baja fuerza iónica y baja concentración.

Los trabajos realizados por Schlautman y Morgan (178) han evaluado la interacción de tres diferentes HPAs con un solo tipo de AH y han soportado un modelo de la materia humica como una estructura de tipo vacío con zonas específicas con afinidad por los solutos hidrófobos. Estos resultados implican que la inhibición de la biodegradación está causada solamente por el tipo de asociación del HPA dentro de la materia del suelo. Se ha sugerido que el estado físico de un compuesto puede influir notablemente sobre su biodisponibilidad (131,133,151). A partir de las evidencias teóricas y experimentales se ha concluido que la afinidad por la asociación de un contaminante con la materia orgánica de un suelo (expresada como el coeficiente de reparto normalizado con el carbono orgánico,  $K_{oc}$ ) es una función de la hidrofobicidad del compuesto, que es expresada mediante el coeficiente de reparto

Tabla. IV: Correlación entre los coeficientes de adsorción ( $K_d$  y  $K_{oc}$ ), coeficiente de distribución octanol-agua ( $K_{ow}$ ) y solubilidad en agua ( $S$ , mg/l;  $S'$ ,  $\mu$ Mol/l) de los compuestos orgánicos.  $R^2$ , coeficiente de regresión.

Ecuación	$R^2$	Referencias
$K_{oc} = 0.63 K_{ow}$	0.96	Karickhoff et al., 1979
$\log K_{oc} = 1.00 \log K_{ow} - 0.21$	1.00	Karickhoff et al., 1979
$K_{oc} = 0.482 K_{ow}$	?	Means et al., 1980
$\log K_{oc} = 0.72 \log K_{ow} - 0.317$	0.98	Means et al., 1980
$\log K_d = 0.72 \log K_{ow} + \log OC + 0.49$ (a)	0.95	Schwarzenbach & Westfall, 1981 (185)
$\log K_{oc} = 0.82 \log K_{ow} + 0.1923$	0.96	Chin & Weber, 1989(38)
$\log K_{oc} = 4.040(\pm 0.038) - 0.557(\pm 0.012) \log S'$	0.988	Chiou et al., 1979(44)
$\log K_{oc} = -0.82 \log S + 4.070$	1.00	Chiou et al., 1979
$\log K_{oc} = -0.54 \log S' + 0.44$	0.94	Karickhoff et al., 1979
$\log K_{oc} = 0.686 \log S + 4.273$	0.93	Means et al., 1980

octanol-agua,  $K_{ow}$  (53,210,212) (Tabla. IV). Como los HPAs están caracterizados por valores de  $K_{ow}$  extremadamente altos y las presiones de vapor bajas (28), la MO es un excelente sorbente de estos compuestos (42,136).

El transporte y el reparto de los HPAs depende en gran medida de la interacción de estos compuestos con la MO natural del suelo y los coloides móviles, los cuales están ampliamente compuestos de sustancias humicas. Además, la biodisponibilidad de estos contaminantes para los microorganismos degradadores está fuertemente relacionada con la capacidad de adsorción de los sedimentos y la MO (36,151). El retraso y la migración de la pluma de contaminantes en las zonas contaminadas se puede calcular a partir de una ecuación de dispersión – advección, usando un coeficiente de asociación ( $K_{oc}$ ), que estima la división del contaminante entre las fases.  $K_{oc}$  se define como la proporción entre la concentración de soluto en la fase del carbono orgánico sólido y la concentración del soluto en la fase acuosa, y está expresada en mililitros de la solución por gramo de carbono orgánico (ml/g de C). Los valores de  $K_{oc}$  pueden variar entre zonas poco distanciadas dentro del dominio contaminado. Algunas causas potenciales de estas variaciones son la fuente y el origen de la MO, la composición química de la solución en las aguas subterráneas, y la presencia de constituyentes inorgánicos en los sedimentos y los suelos. Muchos autores han sugerido que el coeficiente de asociación de una sustancia humica específica puede ser influida por las propiedades tal como su aromaticidad, la presencia de algunos grupos funcionales, su estructura o su configuración (42,71).

#### **V.- Efecto de la composición química del medio sobre la capacidad de adsorción de las arcillas.-**

Tradicionalmente, la adsorción de los compuestos orgánicos hidrófobos (COH) se ha relacionado principalmente a la fracción orgánica. No obstante, en los 10 últimos años se ha reconocido el papel de los componentes minerales (83,95,100,127), porque su contribución sobre la adsorción puede ser significativa con sorbentes con un bajo contenido en carbono orgánico (30,120). La influencia real de este proceso sobre la biodisponibilidad de los COH está por determinar.

Diversos minerales adsorben los COH, tales como los hidrocarburos aromáticos en la esmectita (100) y a los óxidos de aluminio y del hierro (127), los nitroaromáticos sobre algunos minerales de la arcilla (100) y HPA a diversos óxidos y minerales de arcilla. Se ha sugerido que diversos mecanismos intervienen en la adsorción, tales como la accesibilidad a microporos (95), las interacciones no específicas (127), la competencia del solvente (agua) (127) y las interacciones hidrófobas (83,100). Particularmente, en los minerales de arcilla cargados y dilatables la contribución de las interacciones hidrófobas han sido claramente demostradas para los hidrocarburos aromáticos y nitroaromáticos (83,100), debido a la existencia de zonas hidrófobas en las superficies siloxano entre laminas (83,100) (30,31,120). El tamaño y la disponibilidad de la superficie hidrófoba de la esmectita depende de la carga de la lamina (100) (30,31,120) y del intercambio cationico entre laminas (83) (30,31).

La arcilla esmectita, debido a su abundancia en el suelo y en el sedimento y su gran superficie interna conteniendo las zonas hidrófobas, es un adsorbente potencial de HPA, lo que puede causar problemas en el diseño de las técnicas de biorremediación.

## **VI.- Importancia de los microorganismos en la degradación de los contaminantes.**

Visto el coste alto de las técnicas fisicoquímicas de remediación de los suelos contaminados, tal como la incineración, la extracción con solventes, la extracción en fase sólida y la oxidación química a través del uso de oxidantes fuertes como el gas ozono (22) el peróxido de hidrógeno, o el reactivo de Fenton ( $H_2O_2 + FeSO_4$ ) (122,159,160), se han orientado los estudios a buscar soluciones alternativas.

El conjunto de información disponible sugiere que el mayor agente que causa las transformaciones biológicas en suelos, sedimentos, agua residuales, aguas subterráneas y de superficie y muchas otras zonas son los microorganismos que habitan estos ambientes. En efecto, frecuentemente los microorganismos son los únicos agentes que transforman los compuestos químicos sintéticos a productos inorgánicos, proceso que es conocido como mineralización.

Alexander ha postulado que deben cumplirse varias condiciones para que la biodegradación pueda tener lugar en un ambiente: 1/ Debe estar presente un organismo con los enzimas necesarios para realizar la biodegradación. 2/ El compuesto químico debe ser accesible al organismo que tiene los enzimas necesarios. La inaccesibilidad puede ocurrir si el substrato se encuentra en un microambiente distinto al del organismo,

en un solvente no miscible con agua, o adsorbido a superficies sólidas. 3/ Si el enzima inicial que provoca la degradación es extracelular, los enlaces químicos sobre los que actúa el enzima deben estar expuestos para que la catálisis tenga lugar. Pero esto no siempre ocurre debido a la adsorción de muchas moléculas orgánicas. 4/ Si los enzimas que catalizan la degradación inicial son intracelulares, la molécula debe penetrar la superficie de la célula hasta la zona interna donde el enzima actúa. Alternativamente, los productos de una reacción extracelular deben penetrar en la célula para que la transformación prosiga. 5/ Si la población de bacterias o de hongos que actúan sobre los compuestos sintéticos es inicialmente pequeña, las condiciones ambientales deben permitir la proliferación de los microorganismos potencialmente activos (Alexander 1973, III, p6,1)

En muchos trabajos se han considerado los diferentes estados físicos en los que puede encontrarse un substrato a la hora de su biodegradación. Por ejemplo, Ogram et al. (151) han estudiado la degradación del herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético en los suelos, y han encontrado que las bacterias adheridas y suspendidas son capaces de degradar solamente los compuestos en solución, estando el compuesto adsorbido protegido de la biodegradación. El compuesto aromático naftaleno, adsorbido a una variedad de sorbentes naturales y sintéticos, es mineralizado por dos bacterias distintas a través de distintos mecanismos: Para una bacteria, la adsorción ha limitado a la vez la tasa y la amplitud de mineralización de naftaleno, en acuerdo con los valores que predicen las concentraciones de naftaleno en la fase acuosa en equilibrio, mientras que la otra bacteria ha presentado una tasa y amplitud de mineralización que excede los valores predichos, provocando un aumento de las tasas de desorción de naftaleno a partir de los sorbentes estudiados(80,81). Harms y Zehnder han propuesto (85), basandose en resultados de la biodegradación de 3-chlorodibenzofurano adsorbido, que las bacterias adheridas son capaces de realizar la degradación más eficazmente que las bacterias suspendidas, mediante la creación de gradientes de concentración más acentuados dentro de las partículas, que favorecen la difusión hacia el exterior de los sorbentes. La importancia de la adhesión microbiana a la fuente de compuesto químico que se degrada ha sido demostrada no solamente para compuestos adsorbidos sino también para compuestos químicos sólidos (203) y líquidos (147), así como disueltos en fases líquidas no acuosas (NAPLs) (154).

#### **VI.1.- Mecanismos de degradación de los HPAs.**

Muchos microorganismos poseen la capacidad de degradar HPAs. El metabolismo aeróbico por las bacterias degradadoras de HPAs comienza por la incorporación del oxígeno molecular en el anillo bencénico gracias a enzimas llamados dioxigenasas, para formar cis-dihidrodiol, los cuales se convierten en intermediarios dihidroxilados mediante deshidrogenasas (32,34) Fig. VI.1. Los intermediarios como el catecol pueden reaccionar siguiendo dos



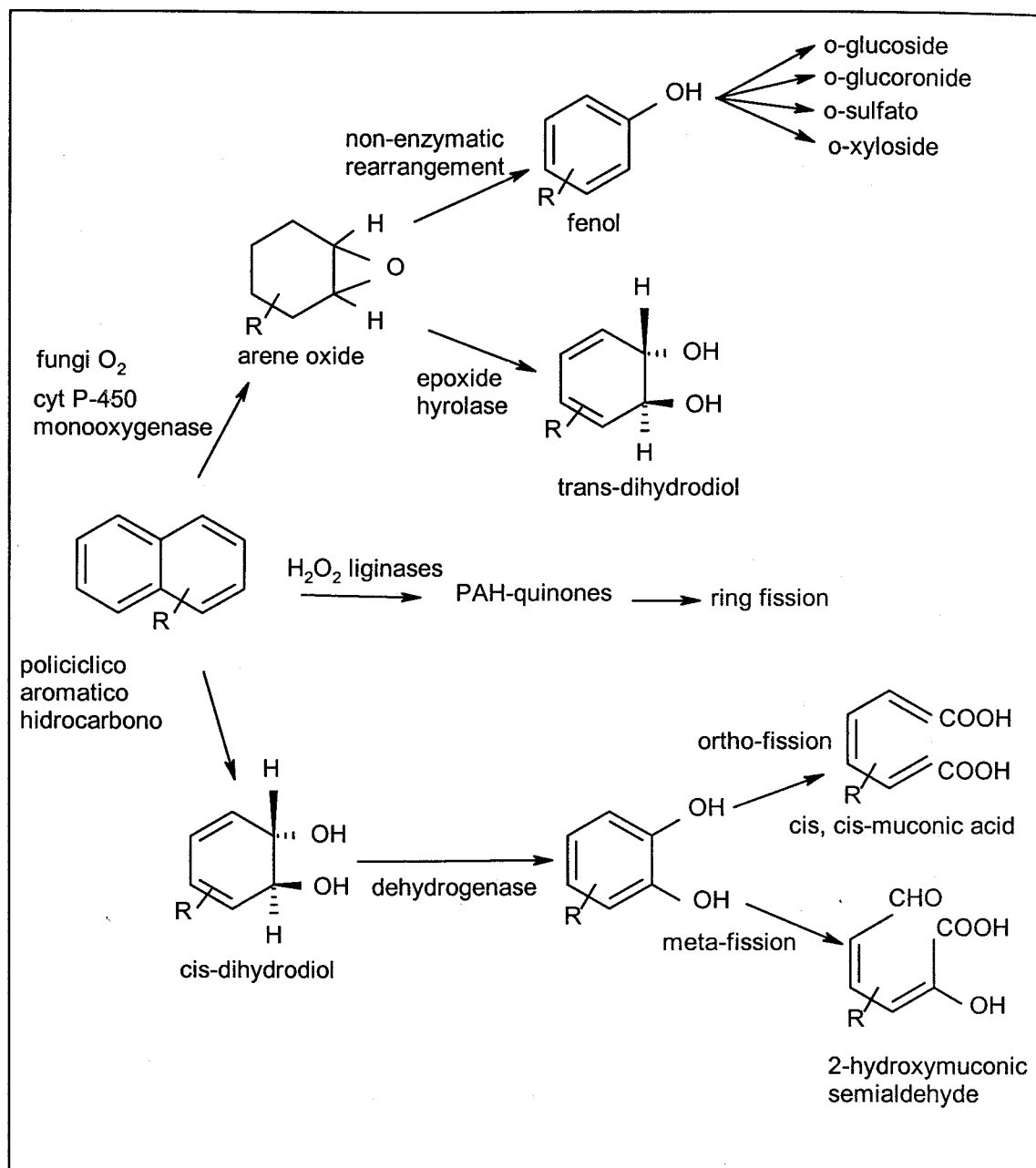
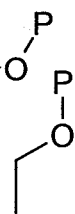


Fig. VI.1: Vías metabólicas de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (Cerniglia, 1992).

rutas: En una ruta, la ruptura del anillo bencénico por las dioxigenasas, a través del camino *intradiol* u *orto*, lo cual implica la ruptura del enlace entre los átomos de

carbono conteniendo los grupos hidroxilo, para conducir al ácido cis, cis-muconico; en la ruta *extradiol* o *meta* se rompe el enlace entre un átomo de carbono con un grupo hidroxilo y un átomo de carbono adyacente (60). Posteriormente, tienen lugar muchas reacciones consecutivas para realizar la mineralización completa de los HPAs de bajo peso molecular, produciéndose agua y dióxido de carbono (34,115). Todavía no se ha logrado determinar las etapas oxidativas de algunos HPAs de gran peso molecular, como el criseno y el benzo(a)pireno. También hay que recordar que algunos de los HPAs de gran peso molecular no se pueden usar como fuente de carbono y de energía, sino que se transforman mediante cometabolismo (74,89). Además de la biodegradación aerobia, la biodegradación anaerobia también existe (46,140), aunque se considera de menor importancia.

La participación de los hongos en la degradación de los HPAs se realiza en la fase inicial con monooxigenasas asociadas al citocromo P-45, que permiten la oxidación de los HPAs a óxidos de areno, los cuales pueden ser transformados a trans-dihidrodiol por la enzima epoxidohidrolasa. Los epóxidos formados sufren reorganizaciones no enzimáticas para formar finalmente fenoles. Los metabolitos de HPA formados por los hongos pueden no ser tóxicos pero también pueden ser cancerígenos o mutágenos, que pueden ser detoxificados mediante la formación de conjugados con glucosa, gluconato, sulfato o xilosa. Además los hongos ligninolíticos o de la podredumbre blanca, tales como *Phanerochaete chrysosporium*, son capaces de producir enzimas extracelulares, como por ejemplo peroxidasas de la lignina, que pueden oxidar los HPAs para formar quinonas (12,32,34).

## VII.- Envejecimiento de los contaminantes en el ambiente.

Los compuestos orgánicos que persisten en el suelo sufren un proceso, poco comprendido todavía, que resulta en la disminución de su disponibilidad para los microorganismos (87,113,192). Esta reducción de la disponibilidad dependiente del tiempo resulta aparentemente de un proceso por el cual las moléculas se vuelven secuestradas, aunque los compuestos pueden también ser recuperados por extracción vigorosa mediante solventes. El secuestro también se manifiesta en una disminución de la disponibilidad para los organismos superiores.

El secuestro con el aumento del tiempo se ha observado con muchos insecticidas (5), 4-nitrofenol (87), los HAPs fenantreno, pireno, antraceno y fluoreno (199), y 1,2-

dibromoetano (192). Un vez secuestrados, los compuestos orgánicos se vuelven menos tóxicos para los insectos (54) y las plantas (20), menos disponible para la biodegradación (87,113,192), más resistentes a la extracción mediante métodos energéticos (87) (192), y menos fácilmente asimilados por las lombrices.

Muchos mecanismos se han descrito para el envejecimiento de los productos químicos en los suelos y sedimentos. El término envejecimiento no incluye a las reacciones que alteran la estructura de las moléculas; por ejemplo, la polimerización o los enlaces covalentes a las sustancias húmicas. El reparto al interior de la materia húmica puede ser importante en la adsorción de los productos químicos no iónicos y podría ser un mecanismo para su envejecimiento en los suelos y sedimentos (41,45). La adsorción de la fracción resistente o envejecida de los compuestos orgánicos puede resultar a partir de la lenta difusión de estas moléculas al interior de algunos componentes de la MO sólida de los suelos (23). Una segunda hipótesis para el envejecimiento sugiere que los productos químicos difunden lentamente dentro de los poros pequeños en los agregados del suelo y son así atrapados (192). La difusión de los productos químicos desde de estos microporos puede retrasarse por el camino tortuoso a través de los poros y por el reparto del producto químico entre el agua y la MO de las paredes de los poros (223). En otros trabajos se propone que la adsorción de los compuestos no iónicos en el suelo puede resultar más de la adsorción a las superficies que del reparto dentro de la MO del suelo (143), y que la formación de los compuestos envejecidos puede implicar fuertes interacciones adsorptivas, más que difusión al interior de los agregados o de la MO. En definitiva, tanto la adsorción, la difusión como el reparto son capaces de reducir la biodegradación.

La concentración de un producto químico disponible para la biodegradación en el suelo también puede reducirse por la oxidación y la reducción química, la fotólisis, los enlaces covalentes a los constituyentes del suelo, y la polimerización. Estas reacciones abióticas, incluyendo la fotólisis, la hidrólisis, y la oxidación, no son mecanismos importantes de degradación de los compuestos policíclicos aromáticos, tales como fenantreno, en los suelos (188).

### **VIII.- Papel de los tensioactivos.**

Es generalmente aceptado que el bajo nivel de biodisponibilidad (i.e., lenta liberación del contaminante desde las fases sólidas a la fase acuosa) es uno de los

principales factores implicados en la lenta biodegradación de los compuestos orgánicos hidrófobos en el suelo (139). Una posible vía para aumentar la biodisponibilidad de los compuestos orgánicos hidrófobos es la aplicación de (bio)tensioactivos, moléculas que consisten de una parte hidrófila y una parte hidrófoba. Debido a esta propiedad, estas moléculas tienden a concentrarse a las superficies y en las interfases, disminuyendo la tensión superficial e interfásica.

Debido a la interacción directa de los tensioactivos con los microorganismos, parece que la compatibilidad conformacional o estérica de los tensioactivos con los enzimas y los lípidos de la membrana celular es un factor metabólico importante. Una primera característica de los tensioactivos es su capacidad de formar agregados llamados micelas. La formación de estas micelas ocurre cuando se sobrepasa la concentración micelar crítica (CMC). Las micelas suponen una reorganización de las moléculas del tensioactivo, y se forman disponiéndose los grupos hidrófobos en el interior, que crean una pseudofase termodinámicamente favorable al hidrocarburo (HC), mientras que en el exterior está la zona hidrófila (176). Por debajo de la CMC, los tensioactivos en solución existen solamente como moléculas individuales o monómeras.

También es bien conocido que los tensioactivos pueden ser tóxicos para las bacterias. Aunque los tensioactivos no iónicos son generalmente menos tóxicos que los tensioactivos iónicos, las bacterias gram-negativas son generalmente menos sensibles que las bacterias gram-positivas. Las diferentes respuestas pueden ser debidas a la diferente compatibilidad entre los tensioactivos y la envoltura celular (176).

### **IX.- Líquidos en fase no acuosa (NAPLs).**

Muchos contaminantes no existen en la fase acuosa o adsorbidos a los sólidos, sino en líquidos que no son miscibles en agua. Estos líquidos se llaman líquidos en fase no acuosa (NAPLs). Estos últimos son muy conocidos debido a los derrames o los escapes de los tanques de aceite, de las gasolinas, de las refinerías o de los petroleros, o al descuido durante la descarga de los petroleros en las aguas marinas. Los NAPLs se pueden encontrar en la superficie de las aguas contaminadas, en los sedimentos marinos, en las costas de las playas y en los suelos contaminados. En muchas zonas contaminadas los residuos peligrosos contienen solventes industriales, y estos solventes orgánicos se mueven y entran en las aguas subterráneas adyacentes, frecuentemente convirtiéndolas en no potables.

Casi todos los trabajos realizados sobre fisiología microbiana y metabolismo de los substratos orgánicos se han centrado sobre moléculas que están en solución acuosa, suponiendo siempre que la fracción de un compuesto que no está disuelto en el agua no es fácilmente accesible para la utilización. La observación de los sitios contaminados indican que los NAPLs son siempre extremadamente persistentes, y el mismo comportamiento suele darse con los compuestos que se encuentran en su interior.

Un número de factores influyen en la biodegradación de los constituyentes de los NAPLs: (1) la capacidad intrínseca de la microflora en la zona para transformar los constituyentes, (2) la tasa de reparto de los constituyentes de los NAPLs hacia la fase acuosa. Tales tasas de reparto dependen de la identidad del NAPL (29), (3) la viscosidad del NAPL (37)- es probable que la viscosidad afecte a la tasa de biodegradación debido a la disminución de la difusión desde el NAPL hacia el agua, (4) la toxicidad del NAPL, (5) la superficie de la interfase entre el NAPL y la fase acuosa, (6) la presencia de otros componentes que son degradados más fácilmente que el compuesto específico que nos interesa, y (7) una concentración umbral de equilibrio en la acuosa que pueda permitir el crecimiento de las especies. Además, si el compuesto que nos interesa puede ser transformado solamente por cometabolismo, entonces el compuesto puede ser fácilmente transformado si el NAPL tiene los constituyentes que puedan soportar el crecimiento de las especies cometabolizantes (2).

### **IX.1.- Mecanismos de uso de substratos secuestrados en NAPLs.**

Alexander ha enumerado los mecanismos que puedan explicar cómo los microorganismos usan los compuestos en NAPLs o metabolizan los solventes orgánicos con una baja solubilidad en agua (2). Estos mecanismos se centran en cómo los compuestos químicos se transfieren desde el ambiente que rodea al microorganismo hasta la superficie celular, en el transporte a través de la membrana celular, y, finalmente, en la llegada a las zonas intracelulares de actividad enzimática. Los tres mecanismos citados por (2) son: (a) solamente se utilizan los compuestos químicos que están en el agua, por lo que la degradación podría depender de la tasa de reparto espontánea hacia la fase acuosa. Los estudios realizados para confirmar que la tasa de biodegradación puede ser predicha a partir de la tasa de reparto al agua han mostrado resultados diferentes entre unos que soportan la idea (17,73,197) y otros que la niegan (18,58,59,158) (b) El organismo excreta productos que transforman el NAPL en

pequeñas gotas de tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$ , y estas últimas, con el sustrato en su interior, son asimiladas por el organismo. Debido al pequeño tamaño de las gotas o partículas, este proceso es algunas veces llamado pseudosolubilización. El proceso implica la excreción por el organismo de tensioactivos que facilitan la pseudosolubilización. (c) las células entran en contacto directo con el NAPL, en superficies sobre las cuales la población crece, y el producto químico en o cerca del punto de contacto con el organismo pasa a través de la superficie celular al interior del citoplasma. Este último mecanismo se ha demostrado en estudios con bacterias que usan el sustrato solamente por contacto directo, utilizando Triton X-100, que suele inhibir la adhesión de las bacterias a la interfase agua- NAPL, provocando la inhibición de la degradación del sustrato(56,154). Otros autores (112,175) han indicado la existencia de algunas especies que poseen otro mecanismo para degradar el sustrato: la existencia de finas estructuras o fimbrias que pueden permitir al microorganismo transportar el compuesto insoluble al interior de la célula para ser metabolizado.

Como mecanismos para aumentar la biodegradación de los productos químicos en los NAPLs se han mencionado muchos tratamientos: El uso de los tensioactivos que suelen incrementar la tasa de el reparto o permitir un gran superficie interfásica, que no solamente favorece la transferencia de masa desde el NAPL, sino también permite un gran colonización microbiana, la mezcla/aireación intensa, el aporte de nutrientes inorgánicos, la inoculación de bacterias y la prevención de la toxicidad de los NAPLs.

#### **X.- Efecto de los componentes del suelo sobre la adhesión de las bacterias.**

En la subsuperficie, por ejemplo en los suelos y en los medios acuosos, muchos microorganismos se encuentran en el estado adherido (48,211). Esto es debido a la abundancia de las superficies presentes y a la fuerte tendencia de los microorganismos de adherirse y de crecer en contacto con las superficies. En el suelo, con una población típica de  $10^7$  a  $10^8$  células por gramo y suponiendo que estos organismos se encuentran en microcolonias, la distancia media típica entre las microcolonias individuales es de 100  $\mu\text{m}$  (16). Para las microcolonias que poseen la capacidad de degradar un cierto contaminante, la distancia medias entre ellas, y, como consecuencia, la distancia a la fuente de sustrato, puede ser incluso mayor. Por tanto, el consumo de los nutrientes y la fuente del carbono alrededor de las colonias debe ser compensada por un re-provisionamiento de sustrato a partir de fuentes relativamente lejanas. Esto es

aplicable particularmente a los altamente hidrófobos HPAs, cuya fuerte adsorción reduce su biodisponibilidad y limita su transferencia. Las tecnologías de biorremediación están dirigidas hacia la movilización de nutrientes y microorganismos en las zonas contaminadas con HPAs para superar esta limitación (2).

A pesar de su importancia significativa en biorremediación, se desconocen los factores que controlan la movilidad de los microorganismos degradadores. Muchos estudios de laboratorio sobre el transporte bacteriano en el ambiente no se han centrado en microorganismos seleccionados en base a su capacidad catabólica, sino sobre bacterias del suelo (15,21), sobre bacterias entéricas (190), o sobre microorganismos acuáticos (182,213). Los estudios de transporte empleando bacterias capaces de destruir contaminantes orgánicos específicos son escasos (52,68). La capacidad de degradar los HPAs no parece estar restringida a ciertos géneros bacterianos (50). Es concebible, no obstante, que las bacterias sean capaces de hacer más biodisponibles los contaminantes hidrófobos si poseen componentes de la superficie celular específicos para la solubilización del sustrato o un conjunto de propiedades fisicoquímicas celulares externas que faciliten la adhesión a las fuentes de los compuestos químicos. La preferencia de algunas bacterias del suelo por las superficies hidrófobas puede explicar por qué distintas bacterias degradadoras de HPA se han aislado cuando se utilizan membranas hidrófobas, en lugar del método de enriquecimiento acuoso convencional, para enriquecer y recuperar las bacterias del suelo (9).

Cuando las bacterias se aplican a las superficies del suelo, estas suelen penetrar solamente algunos centímetros (129) (174), debido a la baja movilidad de las bacterias en el suelo. En cambio, existen muchas evidencias que sugieren que el transporte bacteriano a través del suelo puede ser incrementado por una variedad de factores biológicos, químicos y fisiológicos. Los factores biológicos incluyen las propiedades de las poblaciones bacterianas, que minimizan su retraso por las superficies del suelo, tales como el tamaño reducido de la célula (68), la forma esférica (213), y las superficies celulares hidrófilas (193). Los organismos superiores tales como las plantas y las lombrices pueden actuar como agentes de transporte (90,129). El transporte puede también ser facilitado por cambios en la composición química de la solución de transporte, tales como pH elevado (182), muy baja fuerza iónica (65,69,142), y la presencia de tensioactivos (97) o de materia orgánica natural (102). Finalmente, el transporte bacteriano puede ser incrementado por las propiedades texturales del suelo,

las cuales permiten un flujo de agua preferencial a través de los macroporos, tales como la presencia de grandes granos de arena (65) y agregados del suelo (129).

Un factor que se suele considerar que afecta el transporte bacteriano a través del suelo es la presencia de los coloides de arcilla. La modificación de arena (21) y de un suelo (96) con la arcilla resulta en la reducción del transporte bacteriano a través de columnas empaquetadas, en comparación al material no modificado. Esto se ha explicado en base a la asociación entre las partículas de arcilla y las bacterias que se observa frecuentemente en suspensión (195). Sin embargo, es muy difícil atribuir la influencia de la arcilla sobre el transporte bacteriano solamente a la adhesión, porque la presencia de la arcilla en el interior del suelo matriz también afecta la distribución del tamaño del poro y puede dar lugar a una intercepción directa de las bacterias. Aparte de extrapolaciones y consideraciones teóricas de los resultados experimentales obtenidos con suspensiones líquidas, se conoce poco sobre las interacciones bacterias-arcilla en el medio poroso (202).



## **OBJETIVOS**

Los objetivos que se plantearon en este trabajo fueron:

- a) **Determinar los factores que afectan a la biodisponibilidad de HPAs en suelos.** En esta tesis se ha dado mucha importancia al papel de la adsorción a coloides del suelo tales como la arcilla y los complejos arcillo-ácido húmico y arcillo-ácido fulvico. Dado que las sustancias húmicas se encuentran siempre en la naturaleza en asociación con los coloides minerales, es muy importante establecer los mecanismos por los cuales las bacterias degradan los compuestos hidrófobos cuando están adsorbidos a las sustancias húmicas asociadas al mineral. Por lo tanto se estudió la biodegradación de fenantreno, antraceno, pireno y fluoranteno (hidrocarburos policíclicos aromáticos representativos), tanto en suelos como en sistemas modelo. En estos últimos, los HPA se han utilizado adsorbidos a partículas de arcilla que difieren en la cantidad y la calidad de las fracciones húmicas asociadas. Nuestro abordaje incluía la medida de la biodegradación de los compuestos orgánicos adsorbidos bajo distintas concentraciones de equilibrio. Se ha estudiado además el efecto del contenido en la materia orgánica sobre el envejecimiento de fenantreno en suelo. En nuestro enfoque, las tasas de biodegradación se determinaron a través de la medida de la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir los HPAs marcados con  $^{14}\text{C}$ .
- b) **Esclarecer los mecanismos de adsorción de HPAs a arcillas.** En experimentos preliminares centrados en los efectos de la adsorción de fenantreno a la esmectita sobre su biodegradación, detectamos una fuerte influencia del hierro en solución sobre la capacidad de la adsorción de la esmectita. Los objetivos de este trabajo han sido investigar los mecanismos que gobiernan este efecto, y determinar su influencia sobre la biodisponibilidad. Algunos aspectos de este estudio han sido extendidos también a pireno

- c) **Determinar la influencia de los constituyentes del suelo sobre el transporte bacteriano.** Uno de los factores claves en la biodisponibilidad de HPA en suelos es la inmovilidad del sistema: la transferencia de masas está limitada, por un lado, por la adsorción de los HPA al suelo, y, por otro, por la asociación de los microorganismos a la fase sólida del suelo. Por tanto, se ha tratado el transporte bacteriano en el suelo aplicando un nuevo método para la realización de los experimentos de transporte bacteriano con la arcilla enriquecida, agregada en un medio poroso, lo cual no es posible con la arcilla pura debido a su baja conductividad. Se ha estudiado el transporte de distintas bacterias degradadoras de HPAs a través de un suelo conteniendo componentes del suelo aislados: montmorillonita, arena y complejos arcillo-acido humico. Las estirpes bacterianas estudiadas pertenecieron principalmente a los géneros *Mycobacterium* y *Sphingomonas*, que son especialistas en la degradación de los HPAs poco disponibles y son inoculantes potenciales para la biorremediación de HPAs. Se pretendía por tanto (i) comparar los efectos de los distintos componentes del suelo sobre el transporte de estas bacterias, (ii) determinar si los efectos pueden ser explicados sobre las bases de las propiedades específicas de las bacterias y / o de los componentes del suelo, y (iii) encontrar los medios que puedan facilitar el transporte bacteriano a través del suelo.
- d) **Estudiar in-situ la capacidad de biodegradación de HPA en suelos contaminados.** Finalmente, se ha estudiado la capacidad degradativa de las bacterias autóctonas de dos suelos contaminados reales usando como substratos fenantreno, naftaleno, antraceno, fluoreno, fluoranteno y pireno. También se ha estudiado el efecto de la inoculación de bacterias exógenas y la presencia de los tensioactivos Triton X-100 y Tween 80 sobre la tasa de degradación de los compuestos estudiados.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## I.- Reactivos.

Los compuestos no marcados usados en este estudio son: fenantreno, naftaleno, pireno, antraceno, fluoreno, fluoranteno, la glucosa, 2,2,4,4,6,8,8 heptametilnonano (HMN), hexadecano (HD), ftalato de dibutilo (DBP), Triton X-100 y Tween 80, que se obtuvieron de Sigma, Deisenhofen, Germany. Los compuestos marcados usados son: [9-14C] fenantreno, [4,5,9,10-14C] pireno, [1-14C] naftaleno, [1,2,3,4,4a,9a-14C] antraceno, [9-14C] fluoreno, [3-14C] fluoranteno y [14C] glucosa, todos ellos con una pureza radioquímica >98% que se obtuvieron también de Sigma. También los compuestos policíclicos aromaticos no marcados tales como fenantreno, pireno, naftaleno, antraceno, fluoreno y fluoranteno se han obtenido de la misma casa.

## II.- Suelos.

Para el estudio de la biodisponibilidad de fenantreno en suelos de distinta composición se seleccionaron cinco suelos de ecosistemas continentales de España central, en base a sus contenidos en materia orgánica y arcilla (Tabla I.1.1). Las muestras de suelo, pertenecientes al horizonte A, se secaron al aire y se tamizaron a un tamaño inferior a 2-mm.

Se utilizó también, principalmente para los experimentos de transporte en columnas, un suelo arenoso procedente de la estación experimental del IRNAS en Coria del Río, Sevilla (Typic Xerochrepts, 0.76 % de materia orgánica, pH 6.5). El suelo se secó y tamizó de la forma anteriormente citada. La distribución del tamaño de las partículas de este suelo fue 73.3 % de arena de granos gruesos (2.0-0.2 mm), 6.0 % de arena de granos finos (0.20-0.05 mm), 14.0 % de limo (0.050-0.002 mm), y 6.7 % de arcilla (<0.002 mm). Como fuente de distintos componentes del suelo se utilizaron, además, dos suelos arenosos (Typic Humaquept) del parque nacional de Doñana, Huelva: uno de una zona cerca del lago de Santa Olalla (4.3 % de materia orgánica, pH 6.5), y el otro del Pinar del Raposo (3.2 % de materia orgánica, pH 6.5). Esto suelos se seleccionaron por su baja o nula exposición previa a HPAs.

Los suelos contaminados por hidrocarburos procedían de la localidad Sidi Kacem, en Marruecos. El primero, S1, que se obtuvo del fondo de un río contaminado por los residuos de una refinería. La muestra S2 que se obtuvo del borde del mismo río

contaminado. La muestra S3 se obtuvo de una zona contaminada provocada por un derrame de un oleoducto en la localidad de huelva.

### **III.- Componentes de los suelos.**

#### **III.1.- Arcillas.**

En este trabajo se ha utilizado la montmorillonita sodica de Crook County, SWy-2 (Source Clay Minerals Repository, University of Missouri-Columbia, MO, EE.UU.). La arcilla se purificó por deposición mediante gravedad en agua deionizada, eliminando la fracción mayor que 2  $\mu\text{m}$ . Asimismo, se eliminaron las trazas de carbono orgánico mediante lavado con agua oxigenada, lavando posteriormente tres veces con agua destilada, para eliminar el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , saturando con  $\text{CaCl}_2$  1 M, dializando para quitar el exceso de aniones, y liofilizándola. Esta muestra es principalmente homoionica como está saturada con el calcio, se ha denominado Ca-SWy. Esta muestra se había también saturado con  $\text{Fe}^{3+}$ , por lavado durante una noche con una solución acuosa del M de  $\text{FeCl}_3$ , lavada hasta desaparición del  $\text{Cl}^-$  y luego congelada y liofilizada. Esta muestra es Fe-SWy, y se utilizó en el estudio de la influencia del hierro en solución sobre la adsorción y biodisponibilidad de HPAs.

Las suspensiones de arcilla así purificadas se prepararon por adición de un volumen determinado (generalmente 15 ml) de una solución estéril de sales inorgánicas (descrita posteriormente) a tubos conteniendo montmorillonita, dejando la muestra en agitación durante una noche.

#### **III.2.- Fracciones húmicas.**

A lo largo de este estudio se han utilizado diferentes fracciones húmicas de suelos:

- Ácido húmico y ácido fúlvico extraídos a partir de un suelo Xerochrept y ácido húmico a partir de un suelo Xerorthent Típico. Una descripción detallada de los métodos de extracción y de las características de estas fracciones húmicas ha sido publicadas en el trabajo (177)(Saiz-jimenez).

- Acido fúlvico de Ranker (AFr) original de un suelo de Alemania. Los resultados de los análisis elementales porcentuales [w/w] libre de cenizas, realizados en un analizador elemental fueron: C: 43.56, H: 3.913, N: 1.475, S: 0.705.
- Fracciones húmicas de una muestra de turba, tomada de un deposito de Padul, Granada, ha sido ofrecida por Rolando Marbot (del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología). Los resultados de los análisis elementales fueron, para el ácido húmico: C: 46.4, H: 4.8, O: 43.5, N: 2.7, y S: 2.5; y para el ácido fúlvico: C: 44.7, H: 4.0, O: 47.0, N: 2.5 y S: 2.7.
- Fracciones de ácido húmico purificadas de los suelos del Parque Nacional de Doñana anteriormente citados. Estas fracciones se obtuvieron después de extracción con NaOH, precipitación con ácido clorídrico y fluorídrico, y diálisis (180). Los análisis de  $^{13}\text{C}$ -NMR de estas fracciones han dado los resultados típicos de sustancias húmicas del suelo, i.e., señales indicando los grupos ácidos carboxílicos (200-170 ppm), los grupos aromáticos (160-100ppm), y carbonos alquílicos (50-0 ppm). Los resultados de los análisis elementales fueron para el ácido húmico de Santa Olalla (AH1), C: 47.0 %, H: 5.31 %, O: 43.72 %, N: 3.97 %, y, para el ácido húmico del Pinar del Raposo (AH2), C: 54.84 %, H: 5.52 %, O: 35.77%, N: 3.87 %. La baja proporción C/O del AH1 indica que este último es más polar que AH2 (119). Estas fracciones fueron las más utilizadas, principalmente en el trabajo con los complejos AH-arcillas.

### III.3.- Complejos ácidos húmicos/fúlvicos y arcilla.

El proceso de obtención de complejos arcillo-húmicos fue diferente según se deseara una mayor o menor cantidad de materia orgánica en los complejos, y según el tipo de experiencia posterior (biodegradación, desorción, etc.):

- Complejos utilizados en los experimentos de biodegradación en suelos. La adsorción de las fracciones húmica a la arcilla se realizó en tubos de vidrio de 10 ml con tapón de rosca, en suspensiones de 10 ml conteniendo 500  $\mu\text{g}$  de la fracción húmica disuelta y 100 mg de montmorillonita. Los tapones se envolvieron con teflon para impedir las pérdidas por adsorción a la superficie

de los tapones. Después de equilibrar durante una noche a 21°C en un agitador funcionando a 150rpm, la fracción húmica no adsorbida se eliminó por centrifugación. En las pruebas preliminares, las suspensiones equilibradas mostraron después de la centrifugación una disminución clara de la coloración del sobrenadante, sugiriendo que la mayor parte de la fracción húmica se había adsorbido sobre la arcilla. El depósito obtenido tras centrifugar se resuspendió en agua destilada estéril en presencia de fenantreno marcado y no marcado a una concentración final de 1 µg/ml. Las suspensiones se equilibraron de nuevo una noche y se centrifugaron. Las suspensiones de arcilla se trataron de la misma manera. Después de la centrifugación, el sobrenadante se usó para medir la fracción de fenantreno no adsorbido, y luego fue descartado. El depósito o pellet, conteniendo el fenantreno sorbido, se mezcló completamente con el suelo. Esto se realizó en primer lugar en el interior de los tubos, mezclando el pellet con porciones de muestras de suelo, usando una barra de vidrio, y luego mezclando estas porciones con el resto de las muestras de suelo en el interior de los matraces de 250 ml. Los suelos se inocularon, mediéndose la mineralización como ya se ha descrito. La cantidad total de fenantreno adsorbido, y luego añadido al suelo, fue  $3.76 \pm 0.5$  µg en el caso de la arcilla, y  $3.96 \pm 0.15$ ,  $3.47 \pm 0.04$  y  $4.00 \pm 0.08$  µg con los complejos conteniendo, respectivamente, el AH del suelo Xerorthent Tipico, y el AF y AH del suelo Xerochrept Tipico.

- Complejos con ácido fúlvico de "Ranker". Se prepararon distintos complejos variando las proporciones iniciales de arcilla u ácido fúlvico. El complejo (Ca-SWy)-AFr1 se preparó mezclando 17 ml de una solución de AF 1 g/l con 1.7 g de arcilla en un tubo de vidrio estéril. El complejo (Ca-SWy)-AFr2 se preparó mezclando 10 ml de una solución de AF 0.05 g/l con 0.2 g de arcilla. El complejo (Ca-SWy)-AFr3 se preparó mezclando 32 ml de una solución de AF 0.1 g/l con 1.4 g de arcilla. Por último el complejo (Ca-SWy)-AFr 4 ha preparó mezclando 15 ml de una solución de 10 g/l con 3.5 g de arcilla. Estas suspensiones se equilibraron durante 8 h a 21 °C sobre un agitador orbital funcionando a 150 rpm y luego se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min. La fracción no adsorbida se eliminó mediante dos lavados en agua destilada y los sorbentes resuspendieron en distintos volúmenes de



medio de sales inorgánicas (mc1). En algunas ocasiones se añadió la muestra directamente sin centrifugación.

- Complejos con fracciones húmicas de turba. Los ácidos húmicos y fúlvicos se disolvieron en NaOH 0.1 M y en una solución estéril de sales inorgánicas (mc1), respectivamente, en un agitador orbital durante 8 h. Las soluciones resultantes contenían una concentración de 10 g/l de fracción húmica. Después de la esterilización por filtración, 15 ml de las soluciones se añadieron a botellas de vidrio que contenían 3.5 g de montmorillonita. Estas suspensiones se equilibraron durante casi 8 h a 21 °C en agitador a 150 rpm, y luego se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min. La fracción de la materia húmica no adsorbida se eliminó mediante lavados y el sorbente obtenido se resuspendió en 4 ml de la solución de las sales minerales (mc1). El contenido en carbono orgánico fraccional (foc), o fracción de masa del carbono orgánico contribuida por las fracciones húmicas adsorbidas – determinado mediante análisis elemental – fue 0.008 y 0.017 para los complejos arcillo-húmico y arcillo-fúlvico, respectivamente. En la arcilla no se detectaron niveles de foc.
- Complejos con fracciones húmicas de suelos de Santa Olalla y Pinar del Raposo. Se fabricaron complejos mediante dos procedimientos distintos:
  - Complejos para los experimentos de biodisponibilidad: Para la preparación de los complejos, 0.45 ó 2.5 g de la fracción húmica se disolvieron en separado en 25 ml de NaOH 0.1 N mediante agitación de las soluciones en un agitador orbital durante 8 h. Luego, se añadió a cada solución 10 g de montmorillonita, y la mezcla se mantuvo en obscuridad durante 8 h a 21 °C sobre un agitador funcionando a 150 rpm. La fracción húmica no adsorbida se eliminó mediante lavados sucesivos en agua destilada y centrifugación (8000 rpm durante 10 min), hasta que el color desapareciera del sobrenadante. El pellet restante se liofilizó y homogeneizó con espátula y mortero. Los valores de foc de las partículas obtenidas de estas muestras fueron 0.006 para el complejo (Ca-SWy)-AHs2 y 0.013 para el complejo (Ca-SWy)-AHs3.
  - Complejos para los experimentos de transporte: Para la preparación de los complejos, 1.8 g de la fracción húmica se disolvió en 25 ml de

NaOH de 0.1 N mediante agitación de las soluciones en un agitador orbital durante 8 h. Luego, se añadió 7 g de montmorillonita, y la mezcla se guardó en obscuridad durante una noche. La fracción húmica no adsorbida se descartó después de centrifugaciones repetidas y resuspensión en agua destilada hasta desaparición del color del sobrenadante. El pellet restante se liofilizó. El contenido en carbono orgánico fraccional (foc), fué aproximadamente 0.01.

#### **III.4.- Agregados de complejos/arcilla y PVA sobre vidrio.**

Para los experimentos de transporte bacteriano en columnas, la arcilla y los complejos arcillo-ácido húmico se inmovilizaron sobre bolas de cristal usando PVA (polivinil alcohol) como agente agregante. Para ello, se disolvió 0.5 g de PVA en 200 ml del agua destilada. Después la suspensión se calentó durante 15 min a 40 °C, y se añadió 100 g de bolas de cristal de 250 mm de diametro al conjunto. Después se añadió 50 ml de una suspensión conteniendo 7 g de arcilla o complejo y se calentó la mezcla de nuevo durante 15 min a la misma temperatura. Después de esta etapa se transfirió la muestra a un rotavapor para secar la muestra, que posteriormente se transfirió a una probeta de 2 l con el objetivo de quitar mediante lavado las partículas de arcilla o complejo no inmovilizadas. Finalmente, se secaron las muestras en una estufa (60 °C). Las partículas resultantes tenían diámetros entre 250 y 500  $\mu\text{m}$ , y un 4 % (w/w) de arcilla inmovilizada (156).

#### **III.5.- Fracción arenosa**

La fracción arenosa del suelo de Santa Olalla se obtuvo por deposición mediante gravedad en agua deionizada, proceso que permitió eliminar la mayor parte de la materia orgánica inicialmente presente en la muestra. Los análisis elementales de este material resultaron en un contenido en carbono de 0.17 %. La composición mecánica de sus partículas fué 3.1 % de arena de granos gruesos (2-0.2 mm) y 96.9 % de arena de granos finos (0.20-0.05 mm).

#### **III.6.- NAPLs.**

En este estudio se han utilizado tres NAPLs modelo: 2,2,4,4,6,8,8 heptametilnonano (HMN), hexadecano (HD) y ftalato de dibutilo (DBP). HMN se adquirió a Aldrich, y HD y DBP a Sigma.

#### IV.- Bacterias, medios y condiciones de cultivo.

Las bacterias utilizadas en este estudio tienen como origen suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) y son capaces de crecer con los PAHs individuales como única fuente de carbono y de energía (Tabla D.II.3.1). Las estirpes *Mycobacterium* LB307T y LB501T se habían aislado por un nuevo método de enriquecimiento usando membranas de Teflon conteniendo los HPAs adsorbidos (9). Dos diferentes medios se utilizaron para cultivar las estirpes: un medio mínimo Tris, que hemos llamado mc3, cuya composición, en 1 litro de agua destilada, era: 6.05 g de Tris, 4.6752 g de NaCl, 1.4912 g de KCl, 1.0698 g de NH<sub>4</sub>Cl, 0.534 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2033 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.0294 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 4 ml de la solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1 %, 10 ml de la solución Fe(III)NH<sub>4</sub> citrato 0.048 % y, como solución traza, se añadió 1 ml de una solución stock compuesta por 100 ml de agua destilada y 14.4 mg de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 9.8 mg de MnCl<sub>2</sub>, 6.18 mg de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 19 mg de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.7 mg de Cl<sub>2</sub>Cu·2H<sub>2</sub>O, 2.37 mg de NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 3.6 mg de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O y 82  $\mu$ l de HCl (9). Después de ajustar el pH a 7, el medio se esterilizó. Este último medio de cultivo se usó para las estirpes LH162, VM502, VM503 y VM505 mientras que el medio fosfato tomponado, que hemos denominado mc4, tenía la siguiente composición, por litro de agua destilada: 1.75 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g de (HN<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 g de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O y 0.05 g de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, y como solución traza se añadió 2.5 ml de una solución stock de 1 l compuesta por 800 mg de NaEDTA, 300 mg de FeCl<sub>2</sub>, 10 mg de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 4mg de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1 mg de CuSO<sub>4</sub>, 3 mg de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2 mg de ZnCl<sub>2</sub>, 0.5 mg de LiCl, 0.5 mg de SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1mg de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2 mg de KBr, 2 mg de KI y 0.5 mg de BaCl<sub>2</sub> (84). Este medio de cultivo se usó para la *Arthrobacter polychromogenes* y las estirpes *Sphingomonas sp.* LB126 y las *Mycobacterium sp.* LB208, LB307T y LB501T. Las bacterias se mantuvieron de forma permanente en el medio de sales minerales correspondiente, conteniendo 0.2 % del HPA respectivo.

Además de estas estirpes, se utilizaron otros dos degradadores de fenantreno, aislados de suelos no contaminados. Uno de ellos se aisló de un suelo Cambisol de

Guadalajara (suelo nº. 3 en la Tabla I.1.1). El aislamiento se realizó por enriquecimiento en sales minerales y fenantreno como única fuente de energía y de carbono (58). Este medio de cultivo lo hemos llamado mc<sub>2</sub>, y está compuesto de 1.0 l de agua conteniendo 200 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 800 mg de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mg de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 100 mg de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 100 mg de CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 10 mg de FeCl<sub>3</sub>, y 2.0 µg de cada uno de los siguientes compuestos: Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O y CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (58). La bacteria se caracterizó mediante métodos microbiológicos estándar (94). La estirpe forma en medio TSA (Trypticase Soy Agar) colonias amarillas de aspecto opaco y mucoso. Las células tienen forma de bastón ligeramente curvado y están organizadas en cortas cadenas. La bacteria es Gram-negativo, oxidasa positivo y catalasa positivo, identificándose como como *Pseudomonas fluorescens* estirpe B1. Capaz de usar el fenantreno como única fuente de carbono y de energía para su crecimiento. La bacteria ha sido mantenida en el medio líquido mc<sub>2</sub> conteniendo fenantreno a una concentración idéntica a aquella usada para el cultivo de crecimiento.

Una segunda bacteria degradadora de fenantreno se aisló de un suelo luvisol (0.8% de materia orgánica, 14% de arcilla) de Madrid. Para ello, se inocubaron 10 g de suelo en 100 ml de medio de cultivo (mc<sub>2</sub>), con 0.1 g/ml de fenantreno, durante dos semanas a 30°C en un agitador funcionando a 120 rpm. Después de dos transferencias, el cultivo de crecimiento se sembró en placas con 0.3% (w/v) trypticase soy broth, 1.5% de agar, y la solución de sales inorgánicas mc<sub>2</sub>. Se obtuvo un cultivo puro a partir de una sola colonia después de la incubación. La observación al microscopio indicó que se trataba de cocos gram-positivo, no móviles, y organizados en cortas cadenas. Se obtuvieron resultados negativos con los tests de esporas, catalasa, y de oxidasa. La bacteria se identificó como *Clavibacter xyli* S1, y es capaz de usar fenantreno y naftaleno como una fuente de carbono y de energía por su crecimiento.

En los experimentos de mineralización y en algunos experimentos de adsorción se utilizó como medio de cultivo (mc<sub>1</sub>) una solución catiónica (mc<sub>1</sub>) compuesta de 1.0 litro de agua conteniendo 900 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mg de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mg de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 100 mg de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 100 mg de CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 10 mg de FeCl<sub>3</sub>, y 2.0 µg de cada uno de los siguientes compuestos: Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O y CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O. La concentración final de los cationes Na, Mg, Ca y Fe en solución, era respectivamente,  $2.83 \cdot 10^{-8}$ ,  $4.06 \cdot 10^{-4}$ ,  $7.75 \cdot 10^{-4}$  y  $6.16 \cdot 10^{-5}$  M.

Para los experimentos de biodegradación y transporte, las bacterias se cultivaron en 500 ml de medio de sales minerales con el PAH correspondiente, a 30 °C sobre un

agitador orbital a 180 rpm. Las células se recogieron al comienzo de la fase estacionaria. Los cultivos se pasaron a través de un filtro de vidrio de 40  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para eliminar el resto de los cristales del PAH, y las células en el filtrado se lavaron dos veces en 10 mM de solución salina tampón fosfato (PBS) compuesta por 0.493 g de NaCl, 0.029 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , y 0.119 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  por litro (pH 7.2), y se resuspendieron en el mismo tampón (en el caso de los experimentos de transporte y determinación de características físico-químicas) o en medio de cultivo (experimentos de biodegradación).

## **V.- Caracterización de las bacterias.**

La movilidad electroforética y el ángulo de contacto en agua ( $\theta_w$ ) se determinaron según los métodos de van Loosdrecht et al. (2007). Se utilizó un analizador electroforético Doppler de dispersión de luz (Zeta-master; Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, United Kingdom) para medir la movilidad electroforética. El potencial zeta ( $\zeta$ ), que puede utilizarse como estimación indirecta de la carga de la superficie celular, se ha calculado a partir de la movilidad electroforética según el método de Helmholtz-Smoluchowski (93). Para determinar la hidrofobicidad de la superficie celular, las células bacterianas se colectaron sobre filtros Micropore de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Los filtros se montaron sobre un dispositivo de vidrio y se secaron durante 2 h a temperatura ambiente. La hidrofobicidad de la superficie celular se cuantificó mediante la medida del ángulo de contacto entre la capa celular y una gota de agua, usando un microscopio equipado con un goniómetro (Kruss GmbH, Hamburg, Germany).

## **VI. Adsorción.**

### **VI.1.- Adsorción de fenantreno a suelos.**

La adsorción de fenantreno a las partículas del suelo se determinó mediante el método batch. Brevemente, 1 g de las muestras del suelo por duplicado, se introdujo en tubos de vidrio de 10 ml con tapón de rosca, y se añadió 10 ml de agua destilada. El fenantreno marcado con  $^{14}\text{C}$  y el no marcado se añadieron para alcanzar una concentración final de 1  $\mu\text{g/g}$  de suelo, y las suspensiones del suelo se equilibraron

durante una noche sobre un agitador orbital a 150 rpm. Después de la centrifugación, el fenantreno disuelto se determinó en el sobrenadante mediante contador de centelleo líquido. El color del sobrenadante no interfirió en las medidas.

## **VI.2.- Adsorción de fenantreno a componentes modelo de suelos.**

Las isothermas de adsorción de fenantreno a la montmorillonita y a los diferentes complejos fracción húmica-montmorillonita se realizaron usando el método batch. Cuarenta microlitros de diclorometano, con casi 40000 dpm de fenantreno marcado y suficiente fenantreno no marcado para lograr concentraciones final es entre 0.1 y 1  $\mu\text{g/ml}$ , se evaporaron en el fondo de tubos de vidrio de 10 ml con tapones roscados. Después, se añadieron 5 ml de solución de sales minerales  $\text{mc}_1$ , y los tubos se cerraron con tapones de rosca envueltos de teflon. Los tubos se mantuvieron en un agitador orbital hasta la completa disolución del fenantreno. Entonces se añadió 100 mg del sorbente completándose el volumen hasta 10 ml. Estas suspensiones se equilibraron durante 8 h a 21 °C en un agitador funcionando a 150 rpm, y luego se centrifugaron a 8000 rpm. Para medir la concentración acuosa de fenantreno en el equilibrio, 1 ml del sobrenadante se mezcló con 5 ml de líquido de centelleo (Ready Safe, Beckman Instrument, Fullerton, CA, USA), y la radioactividad se midió con un contador de centelleo líquido (modelo LS5000TD, Beckman Instruments). La concentración del sorbato se calculó por diferencia. El coeficiente de distribución,  $K_d$ , se calculó para cada sorbente por regresión lineal de las isothermas de adsorción, dado que resultaron altamente lineales. El coeficiente de distribución normalizado para el carbono,  $K_{oc}$ , se calculó para los complejos arcillo-ácido húmico y arcillo-ácido fúlvico mediante división de la  $K_d$  por el valor  $f_{oc}$  correspondiente.

## **VI.3.- Adsorción de HPAs a componentes modelo de suelos en presencia de hierro.**

En estas experiencias se hizo un estudio detallado de la influencia del hierro en solución sobre la adsorción de HPAs a arcillas y complejos. En este caso, la separación-detección y cuantificación de los HPAs se realizó en un sistema HPLC equipado con un modulo de separaciones Waters 2690, un detector de fluorescencia Waters 474, y una columna NOVA-PAK C-18 de  $3.9 \times 150$  mm. La fase móvil fué Acetonitrilo-agua 60:40 a un flujo de 1 ml/min. Las longitudes de ondas de la emisión / excitación fueron

374/248 nm para fenantreno y 400/270 nm para pireno. La concentración de hierro en solución se midió en suspensiones equilibradas, después de la eliminación del material sólido por centrifugación a  $12,000 \times g$  durante 10 min, mediante un espectrómetro de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES, Iris advantage, mod. Thermo Jarrel Ash).

Se realizaron tres diferentes series de experimentos con fenantreno: las isotermas de adsorción, las isotermas de adsorción extendidas por saturación sucesiva, y la determinación del coeficiente de distribución. Algunas de estas últimas se realizaron también con pireno.

### **VI.3.1.- Isotermas de adsorción.**

Las isotermas de adsorción de fenantreno y de pireno sobre Ca-SWy y Fe-SWy se obtuvieron en experimentos batch equilibrando 100 mg del sorbente en tubos de centrifuga de 14.5 ml, los cuales se llenaron completamente con distintas soluciones del HPA. Estas isotermas se realizaron en agua deionizada y, en el caso de Ca-SWy, en presencia de hierro<sup>3+</sup> en solución (a partir de ahora este sistema será llamado Ca-SWy(Fe<sup>3+</sup>)) a la concentración de 2.64 mM. Las concentraciones iniciales fueron entre 0.1 y 1.26 µg/ml, 0.097 y 1.215 µg/ml y 0.1 y 1.28 µg/ml, respectivamente, para Ca-SWy(Fe<sup>3+</sup>); Fe-SWy y Ca-SWy, con fenantreno, y entre 0.02 y 0.13 µg/ml para Ca-SWy(Fe<sup>3+</sup>) y Fe-SWy con pireno. Todas estas concentraciones se encuentran por debajo del límite de solubilidad en agua de los dos compuestos. Los tubos se cerraron con papel de aluminio y se equilibraron durante 12 h con una agitación circular constante. Después de la centrifugación, la concentración en equilibrio en la fase acuosa,  $C_w$ , se midió por HPLC. La concentración en la fase sólida,  $C_s$ , se calculó por diferencia entre la concentración inicial y después del equilibrio en la fase acuosa. Se utilizaron al mismo tiempo soluciones control de PAH sin sorbentes para corregir las pérdidas por volatilización o adsorción a las paredes del tubo.

### **VI.3.2.- Isotermas de adsorción extendidas y difracción de rayos-X**

Debido a la baja solubilidad del PAH y con el objetivo de obtener smectitas con una gran cantidad del PAH adsorbido, las isotermas se extendieron mediante el método de saturación sucesiva (19). Estas saturaciones sucesivas se realizaron con Ca-SWy en

presencia de hierro a 2.64 mM y con Fe-SWy en agua, respectivamente, las concentraciones de 7.85 y 3.6  $\mu\text{mol/g}$  de fenantreno, o 0.27 y 0.31  $\mu\text{mol/g}$  del pireno. Se utilizaron como controles blancos con arcilla y solución sin PAH. Los espacios basales de todas estas muestras se midieron por difracción de rayos-X (SIEMENS D5000,  $\text{CuK}\alpha$  radiación) sobre muestras orientadas, preparadas por secado de las suspensiones de agua al 2 % sobre placas sólidas de vidrio.

### VI.3.3.- Coeficientes de distribución

Para comparar la influencia del medio de cultivo sobre el proceso de adsorción, se realizaron medidas de adsorción individual para calcular los coeficientes de distribución para Ca-SWy y los complejos (Ca-SWy)-AHs2a y (Ca-SWy)-AHs3a. Los experimentos se realizaron con 100 mg de los sorbentes Ca-SWy, (Ca-SWy)-AHs3a suspendidos en una solución de 14.5 ml de fenantreno a una concentración de 0.94  $\mu\text{g/ml}$ , y a los que se había añadido 42  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{CaCl}_2$  a la concentración de 68 mg/ml. Otras experiencias utilizaron una solución de fenantreno a una concentración de 1.1  $\mu\text{g/ml}$ , a la que se había añadido 1 ml del  $\text{FeCl}_3(6\text{H}_2\text{O})$  a una concentración 10 mg/ml. Estas dos soluciones serán abreviadas respectivamente como `` $\text{CaCl}_2$ `` y `` $\text{FeCl}_3$ ``. Los iones añadidos tenían una concentración final de 2.64 mM de  $\text{Fe}^{3+}$  y 1.84 mM de Ca en la solución de adsorción. Como control, se mezcló Ca-SWy con una solución de fenantreno disuelto a una concentración 1.28  $\mu\text{g/ml}$ . Se realizaron los mismos experimentos que los descritos arriba, pero con la solución de medio de cultivo como solvente para los dos tratamientos, incluyendo el primer control. El complejo (Ca-SWy)-AHs3a se utilizó solamente con el tratamiento control.

## VII. Desorción.

### VII.1.- Experimentos en batch con $^{14}\text{C}$ .

La desorción de fenantreno se realizó mediante las extracciones secuenciales con agua del compuesto adsorbido. Para este objetivo, se equilibraron suspensiones con 100 mg de sorbente de la misma forma que en los experimentos de las isotermas. Después de centrifugar, se reemplazó la fase acuosa, se resuspendió el pellet con nueva solución, y los tubos se incubaron durante 24 h. La extracción se repitió cinco veces. La



concentración de fenantreno se midió en cada sobrenadante mediante el centelleo líquido. La fracción resistente a la desorción calculó por diferencia entre la cantidad inicialmente adsorbida y la cantidad total extraída bajo estas condiciones. Las pérdidas debidas a volatilización o a adsorción a las paredes de los tubos se controlaron en tubos sin sorbentes. Se recuperó una media de 90 % de la radioactividad inicial después de 24 h de agitación bajo las mismas condiciones que en los experimentos de adsorción-desorción. Los resultados de adsorción se corrigieron para las pérdidas medidas en los tubos control.

## VII.2.- Experimentos en columnas con $^{14}\text{C}$ .

El estudio del transporte de fenantreno a través de columnas de suelo se realizó en un sistema de flujo continuo, para estimar la desorción del compuesto. Antes de comenzar los experimentos en columnas, se indujo la adsorción, en sistema estanco, de la misma cantidad de fenantreno, 2.94  $\mu\text{g}/100$  mg de substrato, a los sorbentes siguientes: Ca-SWy, (Ca-SWy)-AHs1, (Ca-SWy)-AHs2 y (Ca-SWy)-AHs3. En un segundo grupo de sorbentes constituido por la arena y el complejo (Ca-SWy)-AH1', la concentración común que se adsorbió fue 1.232  $\mu\text{g}/100$  mg. Hay que notar que (Ca-SWy)-AHs1 y (Ca-SWy)-AHs1' son en realidad el mismo sorbente, pero que se han denominado de forma distinta para diferenciarlos en uno y otro grupo de experiencias.

Estas dos distintas concentraciones adsorbidas se obtuvieron mediante el cálculo para cada sorbente de la fracción de compuesto en la fase acuosa en el equilibrio,  $f_w$ , que viene determinada por :

$$f_w = 1 / (1 + r_{sw}K_d)$$

siendo  $r_{sw}$  la proporción sólido:agua y la  $K_d$  el coeficiente de distribución (Schwarzenback et al.). Según esta fórmula, modulando la concentración acuosa inicial de fenantreno, se puede tener la misma  $C_s$  (2.94  $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ) utilizando sorbentes distintos (de  $K_d$  conocida). La arcilla y de la arena se eligieron como referencia por su baja capacidad de la adsorción de fenantreno, en comparación con los complejos. El método experimental de adsorción ya ha sido descrito anteriormente. También se utilizó en estos experimentos un NAPL, en concreto 0.1 ml de HMN, para disolver la misma cantidad de fenantreno (2.94  $\mu\text{g}/0.1$  ml).

Para la preparación de las columnas, 14 g de suelo de la estación experimental, tamizado y autoclavado, se introdujo en columnas cilíndricas de vidrio, con lana de vidrio (Panreac) en la zona inferior. Posteriormente, se añadió los 14 g de de suelo. Después se añadió 100 mg de los distintos sorbentes con el fenantreno adsorbido. Estos sorbentes se habían puesto en la parte subyacente a la parte superior para evitar las pérdidas de fenantreno por volatilización. La columna se cerró en su parte superior también con la lana de vidrio, y se colocó en el centro de un matraz de vidrio de 250 ml conteniendo 6 ml de hexano. El agua destilada estéril se bombeó mediante una bomba peristáltica, aplicando un flujo de 10 ml/h. A intervalos regulares, el agua recogida en el fondo de los matraces se recuperó a través de una cánula conectada a una jeringa de 10 ml. Las muestras se mezclaron con 4 ml de hexano en tubos de vidrio pyrex de 40 ml, y 1 ml del hexano obtenido se mezcló con 5 ml de líquido de centelleo, midiendo la radioactividad como está descrito arriba. Las columnas usadas como control tenían la misma cantidad de fenantreno (2.94  $\mu\text{g}/100\text{mg}$  de sorbente), pero añadido en el suelo en forma disuelta.

### **VII.3.- Experimentos en batch con HPLC (efecto del hierro).**

La desorción del PAH se realizó por extracciones secuenciales en agua del compuesto adsorbido a 100 mg de Ca-SWy tratada mediante algunos tratamientos ya descritos en los estudios de adsorción. Una vez alcanzado el equilibrio, y después de centrifugación, la fase acuosa se reemplazó con agua deionizada nueva. Los tubos se mantuvieron en agitación circular durante 24 h. La extracción se repitió cuatro veces. La concentración del HPA se midió en cada sobrenadante mediante HPLC.

## **VIII. Biodegradación.**

### **VIII.1. Experiencias de mineralización en suelos previamente no contaminados de diferente composición.**

Para medir la mineralización de fenantreno, duplicados de muestras de 25 g del suelo se introdujeron en matraces Erlenmeyer de 250-ml, y se añadió el agua destilada

para alcanzar un nivel de humedad de aproximadamente de el 70 % de la capacidad de campo de los suelos. Los suelos se esterilizaron mediante autoclave. Se añadió aproximadamente 80000 dpm de fenantreno marcado [ $9\text{-}^{14}\text{C}$ ] y suficiente compuesto no marcado para tener una concentración final de 1 mg/kg de suelo. El substrato se añadió en una solución de diclorometano, que se dejó evaporar. Se cerraron con un tapón envuelto en cinta de teflon para impedir que las muestras se sequen durante el muestreo, y se mantuvieron a temperatura ambiente. Se midió la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  midiendo la reactividad que aparecía en una trampa de sosa (155), que consistía en un vial de 5 ml suspendido del tapón con 1 ml de NaOH 0.5 M. Periódicamente, la solución se retiró de la trampa y se reemplazó con sosa nueva. La solución de NaOH se mezcló con 5 ml de líquido de centelleo, y la mezcla se mantuvo en oscuridad durante 8 h para la disipación de la quimioluminiscencia. La radioactividad se midió mediante contador de centelleo líquido modelo Beckman LS5000TD. Los resultados se dan como medias de las medidas por duplicado. Se utilizó un F-test para analizar estadísticamente las diferencias entre las medias a  $p=0.05$ .

### **VIII.2. Experiencias de mineralización en suelos con NAPLs.**

Los experimentos de mineralización se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 g de suelo de la estación experimental de Coria del Río, tamizado a un tamaño inferior a 2 mm. Los matraces con el suelo se autoclavaron y se secaron. A los 50 g de suelo se añadieron 0.5, 1.5, 2.5 ó 3 ml del NAPL, conteniendo 50000 dpm de fenantreno marcado y 50  $\mu\text{g}$  de fenantreno no marcado, homogeneizando las muestras ligeramente con una barra de vidrio. Los NAPLs conteniendo el fenantreno marcado y el no marcado se habían preparado previamente dejando evaporar el diclorometano de las soluciones stock respectivas en un mismo vial de 20 ml. Una vez el diclorometano se había evaporado, se añadió el volumen deseado de NAPL, dejando reposar la solución durante al menos 1.5 h.

En los casos donde se estudió el efecto de la presencia de la bacteria degradadora de hexadecano, se añadió el inóculo al suelo en el mismo punto que se añadió el NAPL, dejando el conjunto reaccionar durante 2 h, y posteriormente se añadió 5 ml de medio de sales inorgánicas  $\text{mc}_1$ , para alcanzar un nivel de humedad de aproximadamente 70 % de la capacidad de campo. Esta solución contenía, según el caso estudiado, distintas cantidades del tensioactivo estudiado para lograr las concentraciones deseadas: 0, 40, 80 100 o 160 mg/kg para el caso del Triton X-100 y 0, 16, 80 y 160 mg/kg para el caso del

Tween 80. Los suelos se inocularon con  $5 \times 10^7$  y  $7 \times 10^7$  células/ml de la bacteria *Clavibacter xyli* en los experimentos realizados con fenantreno y naftaleno, respectivamente.

Los experimentos realizados en suspensiones de suelos se realizaron con la misma cantidad de suelo y 50 ml del medio salino mc<sub>1</sub>. Las suspensiones, se mantuvieron en un agitador orbital a 100 rpm para favorecer el buen reparto del sustrato. La cinética de mineralización se siguió como se ha descrito anteriormente.

### **VIII.2.1. Efecto del estado fisiológico de *Clavibacter xyli* sobre su capacidad de degradación de fenantreno y de naftaleno en presencia de tensioactivos**

La bacteria *Clavibacter xyli* se cultivó en medio mc<sub>2</sub> en presencia de fenantreno o de naftaleno. Después de preparar los inoculos como se ha descrito anteriormente (filtración, lavados del pellet bacteriano y la resuspensión de este último) se realizó un experimento cruzado inoculando las muestras que contenían fenantreno como sustrato, con una suspensión de bacterias cultivada con naftaleno, a una concentración de  $6 \times 10^7$  células/ml. Las suspensiones contenían las mismas concentraciones de tensio activo (Triton X-100 o Tween 80) que en el apartado anterior. De forma inversa, también se estudio la mineralización de naftaleno por bacterias preacondicionadas con fenantreno. La densidad del inóculo fué en este caso de  $7 \times 6 \cdot 10^7$  células/ml, y los tensioactivos utilizados (y sus concentraciones) fueron los mismos. Los volúmenes de DBP estudiado fueron 0.5, 1.5 y 3 ml.

### **VIII.3. Experiencias de mineralización en suelos contaminados**

El estudio de los suelos contaminados se realizó preparando en condiciones estériles dos series de matraces de 250 ml de vidrio con 14 g de suelo. En una primera serie de matraces se estudió la capacidad de degradación de las bacterias autóctonas, añadiendo 60000 dpm del compuesto marcado y suficiente compuesto no marcado para alcanzar una concentración de 1 mg/kg, ambos disueltos en diclorometano. En la segunda serie de matraces se estudió el efecto combinado de bacterias exógenas *Sphingomonas sp.* LH128 y *Mycobacterium sp.* LB 208 y LB501T sobre la degradación de fenantreno, de pireno y de antraceno, respectivamente y el efecto de la concentración de tensioactivo en 14 g de suelo S1. Las cantidades de los compuestos

marcados y no marcados fueron las mismas que aquellas usadas en los matraces de la primera serie. Una vez evaporado el diclorometano que contenía los substratos se mezcló el conjunto para homogeneizar la muestra, y posteriormente se añadieron los tensioactivos Triton X-100 (100, 200, 300 o 500 mg/kg) o Tween 80 (5, 20, 160 o 300 mg/kg) al suelo contaminado S1. Los suelos se inocularon con  $8 \times 10^7$ ,  $1.1 \times 10^8$  o  $3 \times 10^8$  células/g de *Sphingomonas sp.* LH128, *Mycobacterium sp.* LB208 y LB501T, según se siguiera en el experimento la mineralización de fenantreno, pireno o antraceno, respectivamente. Tras homogeneizar las muestras con una barra de vidrio, se cerraron los matraces con los tapones con la trampa de sosa. La mineralización se midió como se ha mencionado anteriormente.

#### VIII.4. Experiencias de mineralización con componentes modelo de suelo.

Para medir la mineralización de HPAs en las suspensiones con sorbentes, se dejó evaporar 80  $\mu$ l de diclorometano, con aproximadamente 50.000 dpm del compuesto marcado y suficiente del no marcado para lograr la concentración final deseada, en el fondo de matraces Erlenmeyer de 250 ml. Después se añadieron 50 mililitros de una suspensión de sorbente en una solución de sales inorgánicas mcl. La cantidad de sorbente en la suspensión se modificó en las distintas suspensiones con el objetivo de producir diferentes proporciones solución:sorbente. Los controles sin sorbentes tenían la misma concentración inicial de fenantreno. Los matraces se cerraron con tapones envueltos con Teflon y se mantuvieron a 25 °C durante 1 h sobre un agitador orbital, funcionando a 80 rpm, para alcanzar el equilibrio. Luego, se añadió 1 ml de una suspensión de bacterias preacondicionadas al HPA (a una densidad final de aproximadamente  $2 \times 10^8$  células/ml), y los matraces se incubaron a 25 °C sobre un agitador orbital (80 rpm). La cantidad de substrato en el sistema era lo bastante baja como para descartar un crecimiento significativo a la densidad bacteriana utilizada. La producción de  $^{14}\text{CO}_2$  se midió como la radioactividad aparecida en una trampa de sosa. La radioactividad se midió con un contador de centelleo líquido.

Con el objetivo de calcular las tasas de mineralización, se adoptó un modelo de desorción-degradación (80) a los datos de mineralización de cada curva duplicada:

$$P = v_2 t + ((v_1 + v_2)(1 - e^{-kt}))/k \quad (1)$$

En esta ecuación,  $P$  es el porcentaje de la radioactividad inicial convertido a  $^{14}\text{CO}_2$  en función del tiempo,  $t$ ;  $v_1$  representa la tasa inicial de producción de  $^{14}\text{CO}_2$  (porcentaje/h);  $v_2$  es la tasa de producción de  $^{14}\text{CO}_2$  resultante de la desorción lenta de fenantreno adsorbido (porcentaje/h); y  $k$  es la constante de la tasa (1/h). La tasa inicial de sustrato mineralizado (ng/ml/h) se calculó a partir de la tasa inicial estimada de producción de  $^{14}\text{CO}_2$ ,  $v_1$ , normalizando para la concentración inicial de fenantreno (ng/ml). El valor  $v_1/k$  (%) da la amplitud de mineralización después la fase inicial de mineralización exponencial. Las comparaciones estadísticas se han realizado con un test t a  $p = 0.05$  y 0.10.

Se utilizó inicialmente un segundo modelo a efectos comparativos:

$$P = P_{max}(1 - e^{-kt}) \quad (2)$$

Los parámetros  $P_{max}$  (amplitud de mineralización) y  $k$  (la constante de la tasa de primer orden) se estimaron mediante análisis de regresión no lineal.

La biodegradación de HPAs resistentes a la desorción se determinó después de haber inducido la desorción de la mayor parte de la fracción lábil adsorbida. Para este objetivo, el procedimiento descrito anteriormente (para obtener la fracción resistente a la desorción) se repitió con 50 o 500 mg de arcilla o complejos arcillo-ácido fúlvico y arcillo-ácido húmico. Después de las últimas centrifugaciones, el pellet se resuspendió en los mismos tubos con 3.6 ml de una suspensión bacteriana de *Clavibacter xyli* S1 conteniendo  $8.33 \times 10^8$  células/ml. Alternativamente, se realizó por separado la extracción química de la fracción resistente a la desorción en una serie de tubos, mediante extracciones secuenciales de los pellets con 8 ml de n-butanol, seguido de 8 ml de diclorometano, bajo agitación continua durante 24 h.

Los tubos para los ensayos de mineralización se cerraron con tapones envueltos de cinta de teflon y se mantuvieron de pie a 25 °C en un agitador funcionando a 180 rpm. Se introdujo una pequeña barra de cristal para garantizar la agitación. La mineralización del HPA se determinó como la reactividad que aparecía en una trampa de sosa suspendida desde el tapón. Los controles conteniendo fenantreno disuelto en la fase acuosa tenían las mismas cantidades de HPA presente en los tubos con sorbentes en forma de fracción resistente a la desorción. Debido a la alta linealidad de la forma de las curvas que representaban el porcentaje de mineralización respecto al tiempo en los

replicados conteniendo el sorbente, las tasas iniciales de mineralización se calcularon por regresión lineal a partir de los puntos de cada curva que daban la tasa máxima.

### **VIII.5. Ensayos con envejecimiento.**

Para estos ensayos, las soluciones de fenantreno marcado se prepararon añadiendo 60.000 dpm a tubos estériles de 14.5 ml, y añadiendo 6 ml de una disolución en agua destilada de fenantreno no marcado a una concentración de 1 µg/ml. Los tubos se agitaron a 180 rpm durante 2h, y se completó el volumen de líquido hasta 14.5 ml. Se tomó 0.5 ml para confirmar el proceso de disolución, midiendo con el contador de centelleo líquido. En una segunda serie de tubos estériles, se añadieron 100 mg de arcilla o del complejo (Ca-SWy)-AHs5. A estos tubos se añadió las soluciones de fenantreno preparadas en la primera serie de tubos, y luego se mantuvo las suspensiones en agitación durante 24h. Las suspensiones equilibradas se centrifugaron, y el pellet se transfirió a matraces de vidrio de 250 ml conteniendo 50 g de suelo estéril. En los matraces control se añadió 50 µg de fenantreno no marcado y 50.000 dpm de fenantreno marcado disueltos en diclorometano que se dejó evaporar. Los suelos se homogeneizaron con una barra de vidrio, y se añadieron añadido 5 ml de medio mcl para alcanzar un humedad de 70 % de la capacidad de campo en todos los matraces. Tras cerrarlos con los tapones que llevan la trampa de sosa los matraces se conservaron a temperatura ambiente. Cuatro meses mas tarde se repitió el mismo trabajo preparando las mismas muestras en las mismas condiciones. Una vez preparadas todas las muestras, se inocularon todos los matraces ( las muestras envejecidas y las muestras recientemente preparadas) con  $8 \times 10^7$  células/g de *Clavibacter xyli*. La mineralización se siguió como se ha mencionado anteriormente.

### **IX. Transporte bacteriano.**

Los experimentos de transporte se realizaron a 25 °C en columnas de percolación según el método de Rijnaarts et al. (86). Los materiales que se utilizaron (suelo, arena o agregados de arcilla inmovilizados sobre bolas de cristal) se empaquetaron en presencia de tampón fosfato en columnas de vidrio de 4.1 cm de altura y 1 cm de diámetro interno. La cantidad de material empaquetado presente en cada columna fué del orden

de 3.5 g. La omisión de los nutrientes en las suspensiones impidió la proliferación bacteriana durante los experimentos. Para simular las condiciones de los suelos contaminados, los materiales se contaminaron artificialmente, antes de su introducción en las columnas, con el HPA usado para cultivar las estirpes. El HPA se introdujo como una solución de diclorometano, el cual se dejó evaporar, dando una concentración final de 2.8 mg/g de suelo seco. Esta concentración es relativamente baja, y típica de los suelos contaminados por HPAs (39, 40), y además no afectó transporte bacteriano, como se determinó en los experimentos control sin PAH.

Las columnas conectaron a una bomba peristáltica, y las suspensiones de bacterias cultivadas en presencia del PAH ( $DO_{280} = 0.7$ ) se bombearon a través de las columnas a tasas de flujo constante. Se utilizaron flujos de lecho vacío idénticos, lo que condujo a diferentes flujos hidráulicos en función de la porosidad del medio. Estos últimos fueron 0.947 cm/min para el suelo, el cual tenía una porosidad (estimada gravimétricamente) de 0.22, correspondiendo a un volumen de poro (VP) de 0.71 ml y a un tiempo de resistencia hidráulica ( $t_R$ ) de 4.33 min, 0.727 cm/min para la arena (porosidad, 0.26; PV, 0.84 ml;  $t_R$ , 5.64 min), y 0.526 cm/min para los agregados de arcilla (porosidad, 0.37; VP, 1.20 ml;  $t_R$ , 7.79 min), 0.508 cm/min para los agregados arcilla-AH1 (porosidad, 0.41; VP, 1.32;  $t_R$ , 8.07 min) y 0.540 cm/min para los agregados arcilla-AH2 (porosidad, 0.38; VP, 1.21ml;  $t_R$ , 7.59 min). El transporte de las bacterias a través de las columnas se siguió fotométricamente de forma periódica. La eficiencia de la eliminación de las bacterias se expresó como la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 280 nm en los efluentes de la columna (C) dividido por la del influente ( $C_0$ ). La observación al microscopio confirmó la ausencia de partículas de arcilla en los efluentes. Los experimentos control indicaron una adsorción despreciable de todas las bacterias a las bolas de cristal cubiertas sólo con el PVA ( $\alpha < 0.04$ ; para definición ver abajo) y, asimismo, que tampoco el HPA tenía efecto alguno sobre el transporte bacteriano. Todos los resultados están dados como medias de las medidas por duplicado. Las diferencias máximas entre columnas individuales fué menos que 5 %. Los experimentos de transporte con el tensioactivo no ionico Triton X-100 se realizaron con suspensiones bacterianas en solución de PBS que contenían la concentración de tensioactivo deseada. Las soluciones de tensioactivos se prepararon inmediatamente antes de los experimentos. Ni el suelo ni los materiales del suelo se trataron con el tensioactivo antes del bombeo de las suspensiones bacterianas a través de las columnas.



La filtración se cuantificó para todas las combinaciones de bacterias y materiales empaquetados. La eficiencia de adhesión  $\alpha_t$  se define generalmente como la relación entre la tasa de adhesión  $\eta_t$  contra la tasa del transporte bacteriano hacia las superficies del material empaquetado  $\eta_{trans}$

$$\alpha_t = \eta_t / \eta_{trans}$$

Su cálculo, por tanto, depende del conocimiento de la tasa de transporte. Para las columnas empaquetadas con esferas de tamaño uniforme, se ha propuesto un método de cálculo del  $\eta_{trans}$  que toma en cuenta la contribución de la convección, difusión, atracción de van der Waals, y la sedimentación, demostrándose su utilidad (134). Para poder comparar los resultados obtenidos con las bacterias individuales y los materiales empaquetados en nuestros experimentos, hemos utilizado esta ecuación para calcular la eficiencia de adhesión  $\alpha_t$ , aunque los materiales utilizados están muy lejos de ser esferas ideales. Para los cálculos, hemos supuesto que las esferas son de tamaño idéntico (275  $\mu\text{m}$  de radio) en sus empaquetamiento, y que el radio bacteriano efectivo es  $R = 0.5 (wl)^{1/2}$ , donde  $w$  y  $l$  representan el ancho y la longitud de las bacterias, respectivamente.  $\eta_t$  se calculó a partir de los valores de  $C/C_0$  obtenidos en los experimentos de transporte según Jucker et al.(104). Para una explicación detallada del método de cálculo usado, hay que acudir al trabajo de Martin et al. (135) y la ecuación de filtración de Rajagopalan and Tien (168). Debido al aumento de las probabilidades de contacto con las superficies irregulares de las partículas empaquetadas usadas en este estudio, los valores de  $\alpha_t$  pueden exceder 1 y deben ser considerados como eficiencias de adhesión relativas. En algunos experimentos, principalmente con el suelo y la arcilla aislada, los valores de  $\alpha_t$  no alcanzaron un valor constante, sino que bajaron de una manera lineal, en general después de 2 o 4 volúmenes de poro. Por esta razón, y para tener en cuenta la dinámica de bloqueo del filtro, se calcularon dos valores representativos de  $\alpha_t$ : Uno primero inicial, calculado en el punto del cambio de la pendiente en las curvas de  $C/C_0$  frente a VP (correspondiendo al final del frente bacteriano) y uno segundo final, correspondiendo al final del periodo experimental.

## **RESULTADOS**

## I.- EFECTO DE LOS COMPONENTES DEL SUELO SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD DE FENANTRENO

### I.1.- Efecto de la materia orgánica y la fracción arcillosa de los suelos.

#### I.1.1.- Mineralización de fenantreno por la flora microbiana autóctona.

En todos los casos, las poblaciones microbianas presentes en los cinco tipos de suelo bajo estudio mineralizaron fenantreno hasta CO<sub>2</sub> (Fig. I.1.1). No obstante, las cinéticas de transformación fueron diferentes, de acuerdo con el contenido en materia orgánica y en arcilla en los suelos. La Fig.I.1.1a compara la mineralización de fenantreno (1 mg/Kg suelo) en tres suelos con distintos contenidos de materia orgánica (suelos nº 1 a 3 de la tabla I.1.1). En estos suelos las tasas máximas de mineralización

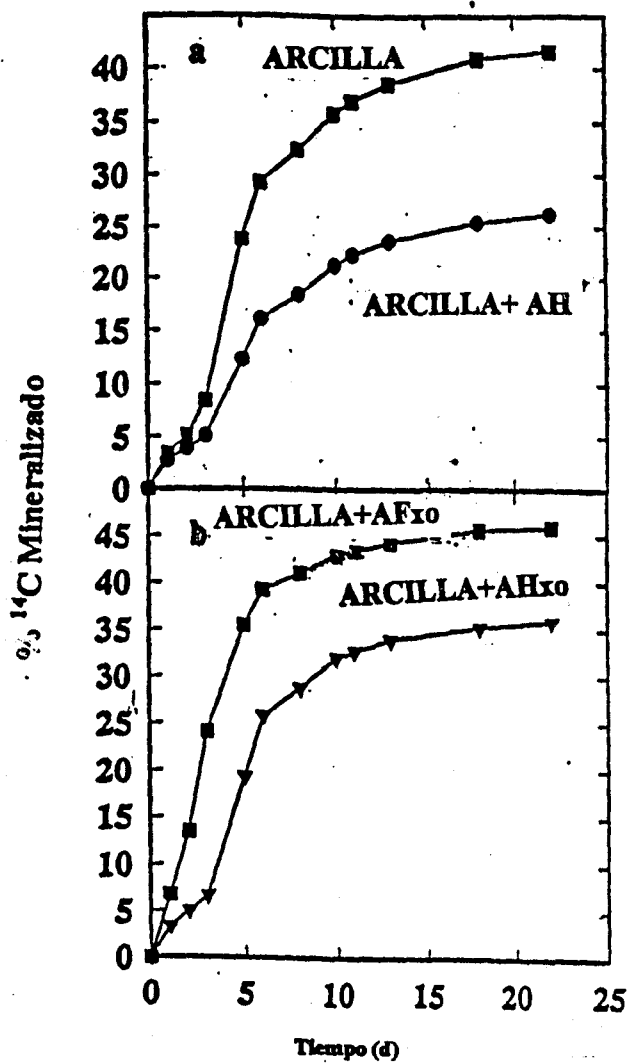
**Tabla I.1.1:** Efecto del contenido de la arcilla y de la materia orgánica del suelo sobre la mineralización de fenantreno (1mg/kg) en suelos de diferente composición.

Nº	Tipo suelo	Localidad	pH	MO (%)	Arcilla (%)	Partición del fenantreno en agua (ng/ml) <sup>a</sup>	Mineralización <sup>a</sup>	
							Tasa mg/kg/día	Amplitud <sup>b</sup> %
1	Luviosol	Madrid	7.4	0.8	14.0	19.1 A	3.4 A	19.0 A
2	Cambisol	Madrid	5.4	17.0	5.6	1.5 B	2.1 B	11.4 B
3	Cambisol	Guadalajara	7.5	36.9	12.0	1.0 B	1.1 C	5.1 C
4	Cambisol	Guadalajara	6.4	15.5	13.4	2.8 C	0.4 C	3.6 D
5	Rendoll	Segovia	7.6	12.5	22.4	2.7 C	0.2 C	1.3 E

a: Los valores en una columna seguidos por la misma letra capital no son significativamente diferente ( $p=0.05$ ).

b: Porcentaje de substrato mineralizado después de 120 días.

ocurrieron después de una fase de aclimatación de varias semanas. Las tasas y las amplitudes de mineralización fueron estadísticamente más bajas en los suelos con un mayor contenido en materia orgánica. En los tres suelos con un similar contenido en materia orgánica, pero con diferentes contenidos en arcilla, la cinética de mineralización también fue diferente (Fig. I.1.1b). En el suelo con bajo contenido en arcilla, la curva de



**Fig. I.1.4:** Mineralización de fenantreno en suelos, inicialmente adsorbido a arcilla o a complejos arcillo-húmicos (a) y a complejos arcillo-húmicos y fúlvicos con fracciones húmicas de un mismo suelo Xerochrept (b).

mineralización adquirió un aspecto típico en forma de S, incluyendo una fase de aclimatación de varias semanas. En cambio, la curva de mineralización en los suelos ricos en arcilla fue lineal, con tasas y amplitudes estadísticamente menores que el suelo pobre en arcilla

### **I.1.2.- Mineralización de fenantreno en suelos inoculados**

Para investigar en mayor profundidad el efecto de la materia orgánica y de la arcilla sobre la mineralización de fenantreno en los distintos tipos de suelo, se estimó la biodegradabilidad de fenantreno en los mismos suelos, pero inoculados con *Pseudomonas fluorescens*, una bacteria degradadora de fenantreno, a una densidad de inóculo de  $3.5 \times 10^6$  células/g.

En estas condiciones, la mineralización de fenantreno comenzó sin fase de aclimatación, tanto en medio líquido sin agitación (con fenantreno como única fuente de carbono) como en los suelos (Fig. I.1.2). La tasa de mineralización en los suelos fue más baja que en medio líquido. La diferente biodegradabilidad entre los tres tipos de suelos fue similar a la de los ensayos con las poblaciones autóctonas de esos suelos, es decir, se observaron mayores tasas y amplitudes de mineralización a un menor contenido en materia orgánica. En este experimento, la larga fase de aclimatación observada en los suelos no inoculados desapareció tras la adición de una cantidad suficiente de microorganismos degradadores.

### **I.1.3.- Capacidad de adsorción de fenantreno por los suelos.**

Para estimar si la diferente biodegradabilidad observada en estos experimentos podría ser atribuida a la adsorción a las partículas del suelo se determinó la concentración acuosa de fenantreno en suspensiones de los distintos suelos, equilibradas con una solución del compuesto a una concentración conocida. Los resultados están incluidos en la tabla I.1.1, donde se comparan además las tasas máximas y la amplitud de mineralización, determinadas en los ensayos con los microorganismos autóctonos. Se observó que la concentración de fenantreno en solución disminuía con el contenido en MO del suelo. En cambio, el contenido en arcilla parecía no tener influencia. Las diferencias en la mineralización de fenantreno entre los suelos 2, 4 y 5 (con similar contenido en MO pero con distintas cantidades de arcilla) no pueden ser explicadas

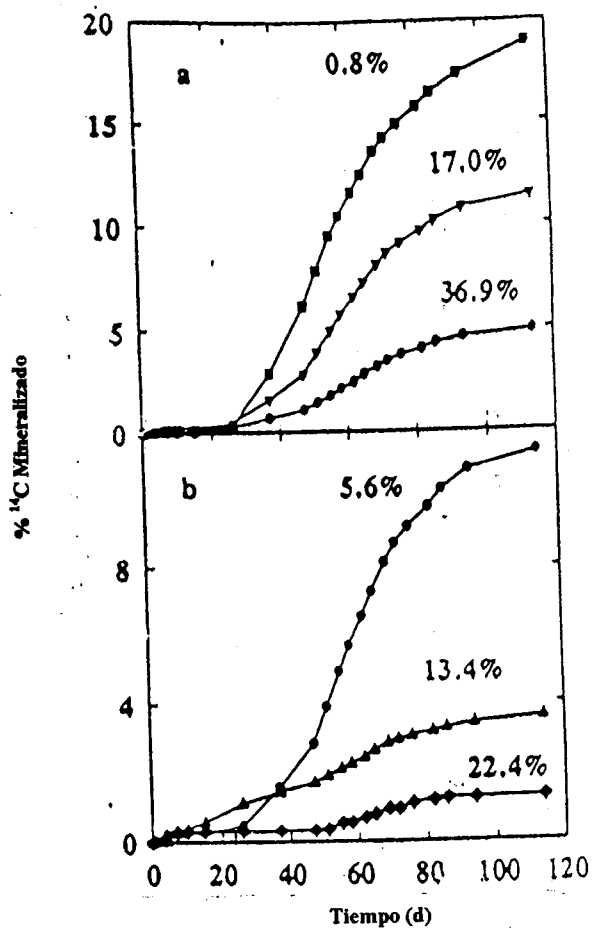


Fig. 1.1.1: Mineralización de fenantreno (1 mg/kg de suelo) por las bacterias autoctonas de los suelos con diferente contenido en materia orgánica (a) y en arcillas (b). Los contenidos están expresado en porcentaje.

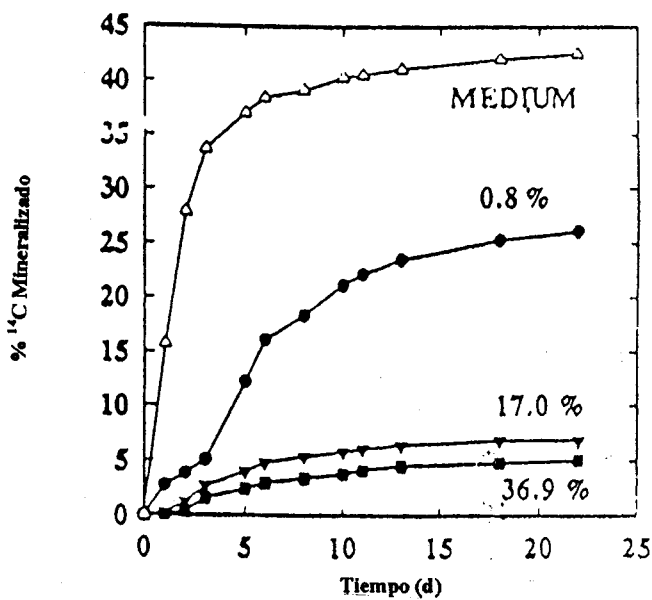


Fig. 1.1.2: Mineralización de 25 µg de fenantreno por la *Pseudomonas fluorescens* en 100 ml del medio mineral y en suelos inoculados con cantidades diferentes en materia orgánica.

solamente a base a la adsorción, teniendo en cuenta las concentraciones similares de fenantreno en solución encontradas en los experimentos de adsorción (Tabla I.1.1). Por otra parte, la arcilla no parece ser el único factor que reduce la mineralización en estos suelos, dada la activa biodegradación observada en el suelo n° 1, con un contenido en arcilla parecido al del suelo n° 4. Los datos sugieren que una cierta cantidad de MO es necesaria en el suelo para la observación de este efecto.

### **I.1.3.- Capacidad de adsorción de fenantreno por los suelos.**

Para estimar si la diferente biodegradabilidad observada en estos experimentos podría ser atribuida a la adsorción a las partículas del suelo se determinó la concentración acuosa de fenantreno en suspensiones de los distintos suelos, equilibradas con una solución del compuesto a una concentración conocida. Los resultados están incluidos en la tabla I.1.1, donde se comparan además las tasas máximas y la amplitud de mineralización, determinadas en los ensayos con los microorganismos autóctonos. Se observó que la concentración de fenantreno en solución disminuía con el contenido en MO del suelo. En cambio, el contenido en arcilla parecía no tener influencia. Las diferencias en la mineralización de fenantreno entre los suelos 2, 4 y 5 (con similar contenido en MO pero con distintas cantidades de arcilla) no pueden ser explicadas solamente a base a la adsorción, teniendo en cuenta las concentraciones similares de fenantreno en solución encontradas en los experimentos de adsorción (Tabla I.1.1). Por otra parte, la arcilla no parece ser el único factor que reduce la mineralización en estos suelos, dada la activa biodegradación observada en el suelo n° 1, con un contenido en arcilla parecido al del suelo n° 4. Los datos sugieren que una cierta cantidad de MO es necesaria en el suelo para la observación de este efecto.

### **I.1.4.- Mineralización en suelo de fenantreno inicialmente adsorbido a partículas modelo.**

Para establecer inicialmente unas condiciones más controladas de adsorción, el fenantreno se añadió, en otros experimentos, a un suelo de baja cantidad en MO (0.76 %, suelo n°1), no en una solución de diclorometano, sino ya adsorbido a partículas de arcilla o complejos arcillo-húmicos. Los complejos se habían preparado previamente adsorbiendo las fracciones húmicas disueltas sobre las arcillas. Estos componentes,

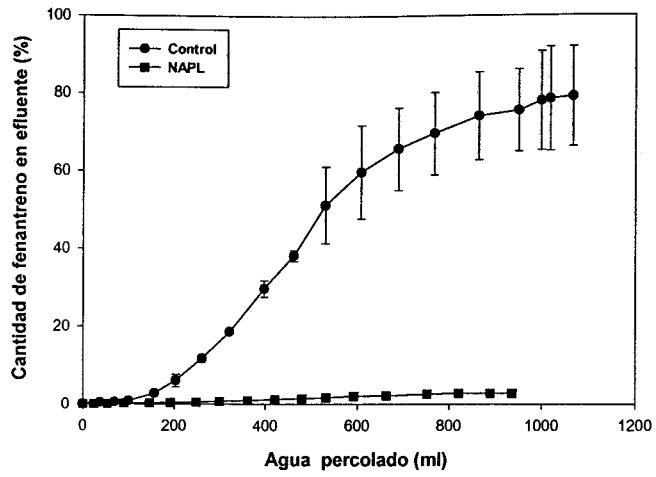


Fig I.2.1: Liberación de fenantreno inicialmente presente en Heptametilonano en columnas de percolación.

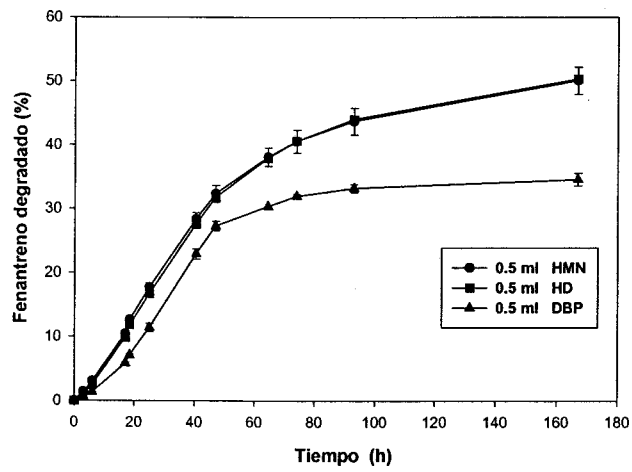


Fig I.2.2a: Efecto del tipo de NAPL sobre la mineralización de fenantreno.

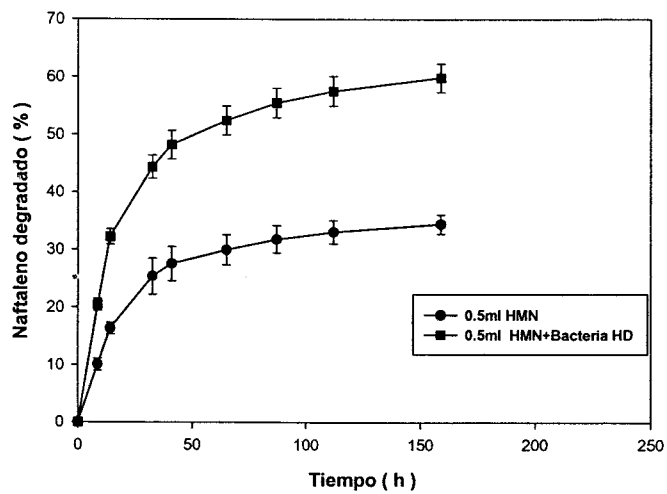


Fig I.2.2b: Efecto de la coinoculación con la bacteria degradadora de HD sobre la mineralización de naftaleno secuestrado en 0.5 ml de HMN.



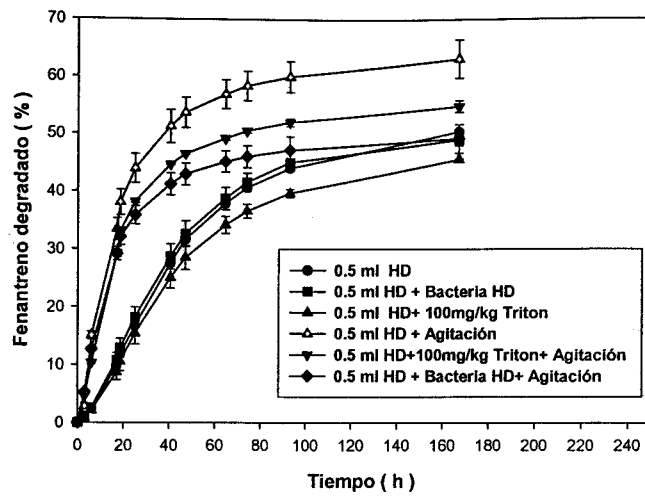


Fig 1.2.3a: Efecto de la bacteria degradadora de HD, de Triton X-100 y de la agitación sobre la biodegradación de fenantreno secuestrado en 0.5ml de HD.

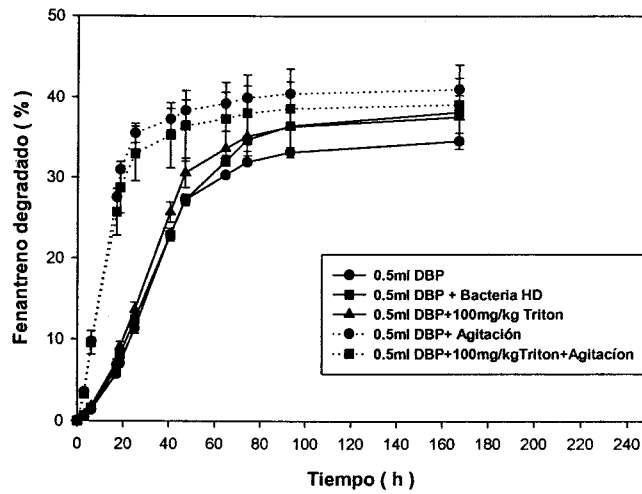


Fig 1.2.3b: Efecto de la bacteria degradadora de HD, de Triton X-100 y de la agitación sobre la biodegradación de fenantreno secuestrado en 0.5 ml de DBP.

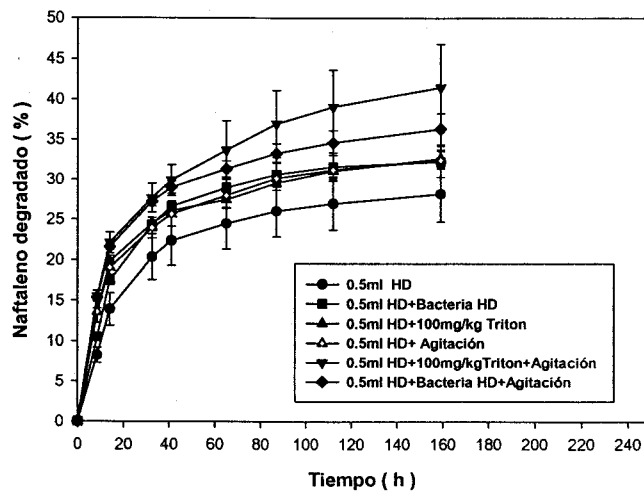


Fig 1.2.3c: Efecto de la bacteria degradadora de HD, de la agitación y de Triton X-100 sobre la biodegradación de naftaleno secuestrado en 0.5ml de HD.

conteniendo el sustrato adsorbido, se homogeneizaron con el suelo, y después se añadió el inóculo de *P. fluorescens*. En estas condiciones, la bacteria mineralizó rápidamente el fenantreno adsorbido, pero con diferencias según la naturaleza del sorbente (Fig. I.1.4a). El fenantreno adsorbido a la arcilla era más biodisponible y por tanto fue más fácilmente degradado que aquél adsorbido al complejo arcillo-húmico, (Ca-Swy)-AH. Más del 40% del carbono inicial se convirtió a CO<sub>2</sub> cuando el sustrato se introdujo adsorbido a la arcilla sola, mientras que sólo el 26% del sustrato se mineralizó cuando estaba inicialmente adsorbido al complejo arcillo-húmico. Estos resultados sugieren que la interacción entre el fenantreno y las partículas añadidas es más fuerte cuando éstas contienen el ácido húmico.

La naturaleza de la fracción húmica presente en los complejos también afectó a la transformación. La figura I.1.4b compara la biodegradación de fenantreno adsorbido a complejos conteniendo arcilla y ácido húmico extraído de un suelo Typic Xerochrept, frente a la biodegradación del compuesto adsorbido a otros complejos que contenían arcilla y ácido fúlvico extraído del mismo suelo. El fenantreno adsorbido al complejo arcillo-fúlvico fue degradado más fácilmente que aquel adsorbido al complejo arcillo-húmico.

## **I.2.-Efecto de los líquidos en fase no acuosa (NAPLs).**

### **I.2.1.- Efecto de un NAPL sobre la movilidad de fenantreno en suelos**

La presencia de un NAPL en un suelo representa también *a priori* un factor negativo para la biodegradación de compuestos hidrófobos, dado que esta fase orgánica tiende a secuestrar el compuesto de la fase acuosa por procesos de reparto. Para confirmar esto, se realizó un experimento de percolación en columnas de suelo con bajo contenido en MO, en el que el fenantreno se añadió en solución acuosa o disuelto inicialmente en heptametilnonano (HMN), un NAPL puro modelo. La concentración inicial del compuesto era en ambos casos de 0.21 µg/g suelo. La evolución de la concentración del compuesto en el efluente de las columnas mostró claramente el retardo que la presencia del NAPL originaba sobre la liberación del compuesto (Fig. I.2.1). Los porcentajes finales liberados, después de más de 30 días de experimentación, fueron 79.1±12.869 y 2.8±0.707 % en las columnas control y en las columnas con HMN, respectivamente.

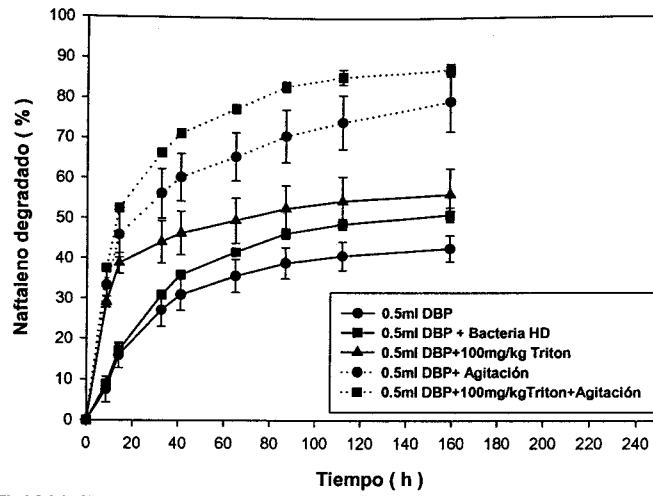


Fig 1.2.3d : Efecto de la bacteria degradadora de HD, de Triton X-100 y de la agitación sobre la biodegradación de naftaleno secuestrado en 0.5ml del DBP.

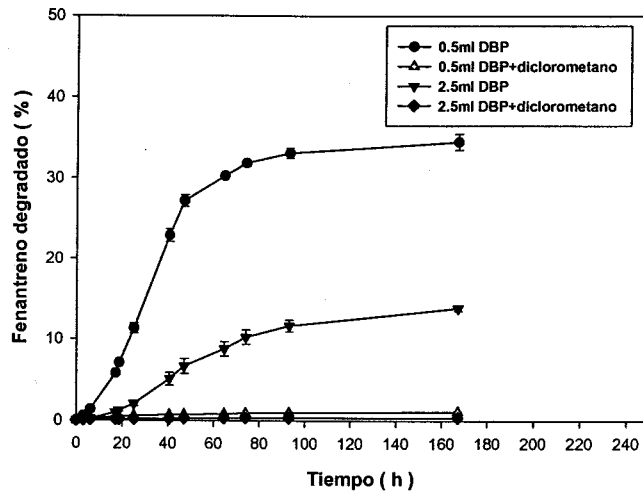


Fig 1.2.4: Efecto de la dispersión con diclorometano sobre la biodegradación de fenantreno inicialmente disuelto en DBP.

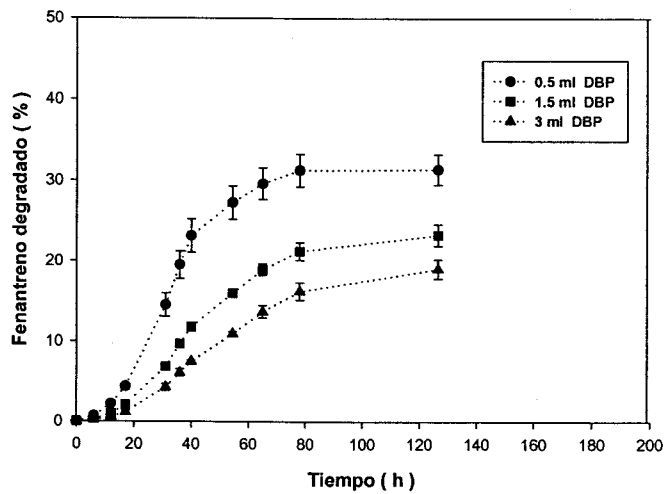


Fig 1.2.4a: Efecto del volumen de DBP sobre la biodegradación de fenantreno.

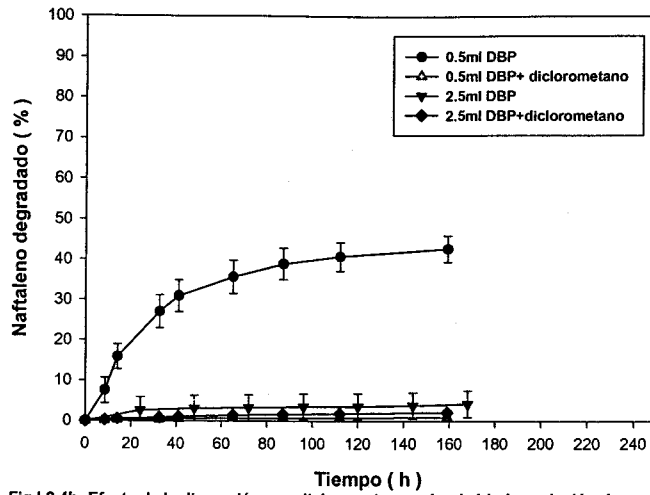


Fig I.2.4b: Efecto de la dispersión con diclorometano sobre la biodegradación de fenantreno inicialmente disuelto en DBP.

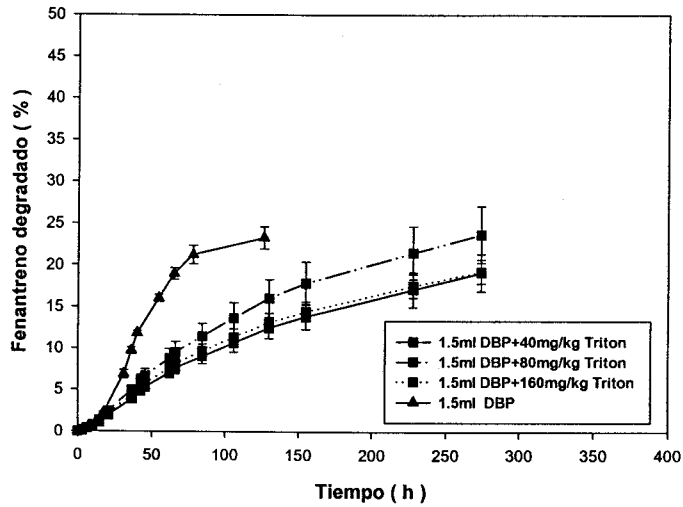


Fig I.2.5b: Efecto de la concentración de Triton X-100 sobre el efecto de 1.5ml del DBP

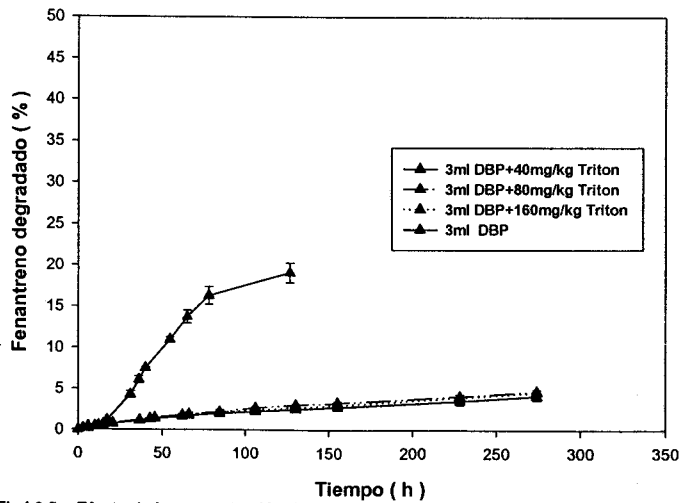


Fig I.2.5c: Efecto de la concentración del triton sobre el efecto de 3 ml del DBP.

Al representar los NAPLs un factor limitante de la biodisponibilidad en suelos, de forma análoga a la materia orgánica y la fracción arcillosa, se realizaron una serie de experimentos con suelos, descritos a continuación, encaminados al estudio de los distintos factores que afectan a la biodegradación y biodisponibilidad de PAH cuando están presentes en NAPLs. Todos estos experimentos con NAPLs se realizaron con suelos inoculados con la bacteria degradadora *C. xili*.

### **I.2.2.- Influencia del tipo de NAPL sobre la biodisponibilidad de PAH en suelos.**

En un experimento de biodegradación en suelo en fase sólida, se realizó una comparación entre tres tipos de NAPLs: hexadecano (HD), heptametilnonano (HMN) y ftalato de dibutilo (DBP). A diferencia del experimento de percolación en columna, la mineralización de fenantreno presente en los NAPLs se inició rápidamente, alcanzándose valores de 30-40 % de producto mineralizado después de una semana (Fig. I.2.2a). Se observó que hexadecano y heptametilnonano presentaron comportamientos parecidos, a nivel de amplitud de mineralización. No obstante, no se observaron grandes diferencias en cuanto a las tasas máximas de mineralización con los tres NAPLs. Debido a la similitud de los resultados presentados por HMN y HD, por una parte, y, por otra, el aislamiento de una bacteria degradadora de HD, que posiblemente producía tensioactivos (visto el aspecto espumoso que presentaba el cultivo bacteriano durante su crecimiento), se orientó el trabajo a investigar solamente HD y DBP, no tratando el HMN en detalle.

Se estudió también la influencia de la identidad del NAPL sobre la mineralización de naftaleno. De los tres NAPLs modelo estudiados, HMN, HD y DBP, fue el HMN el NAPL que presentó una tasa de mineralización más alta, posiblemente al causar una menor resistencia para liberar el compuesto (Tabla I.2.2). El único tratamiento realizado con HMN se realizó con la bacteria degradadora de hexadecano, que, a diferencia de lo que ocurría con fenantreno, tuvo un claro efecto positivo sobre la transformación (Fig. I.2.2b).

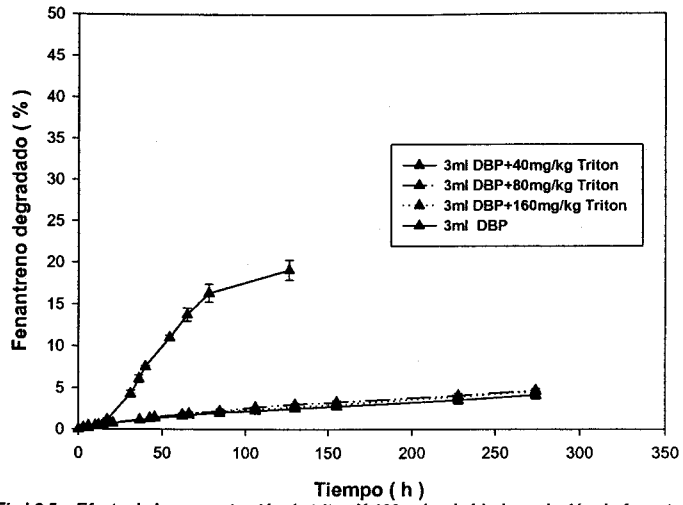


Fig 1.2.5c: Efecto de la concentración de triton X-100 sobre la biodegradación de fenantreno inicialmente presente en 3 ml de DBP.

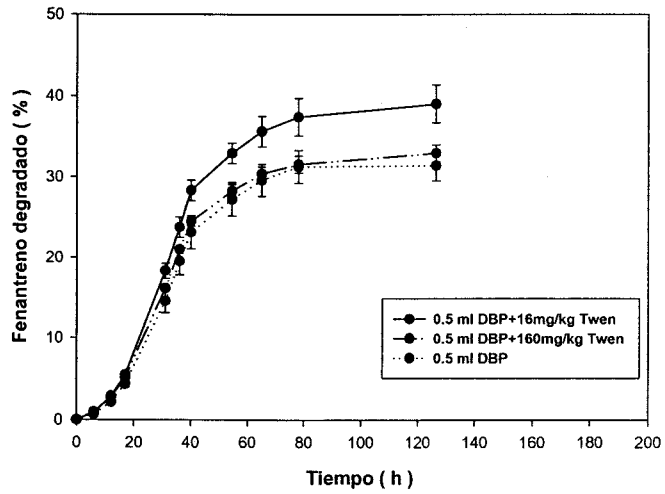


Fig 1.2.5d: Efecto de la concentración de Tween 80 sobre la biodegradación de fenantreno inicialmente presente en 0.5 ml de DBP.

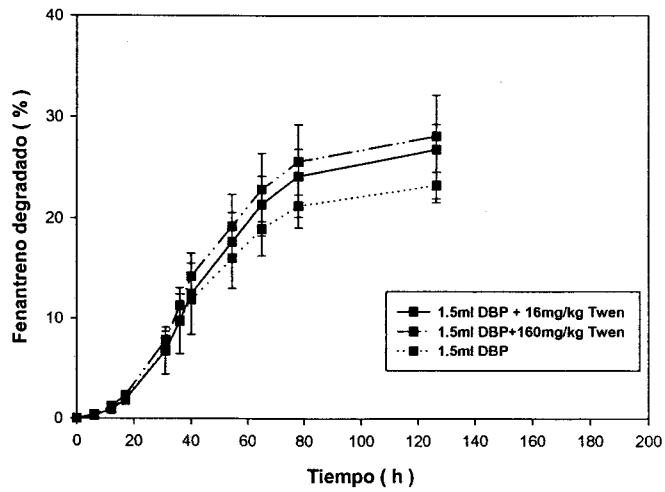


Fig 1.2.5e: Efecto de la concentración de Tween 80 sobre la biodegradación de fenantreno inicialmente presente en 1.5ml de DBP.

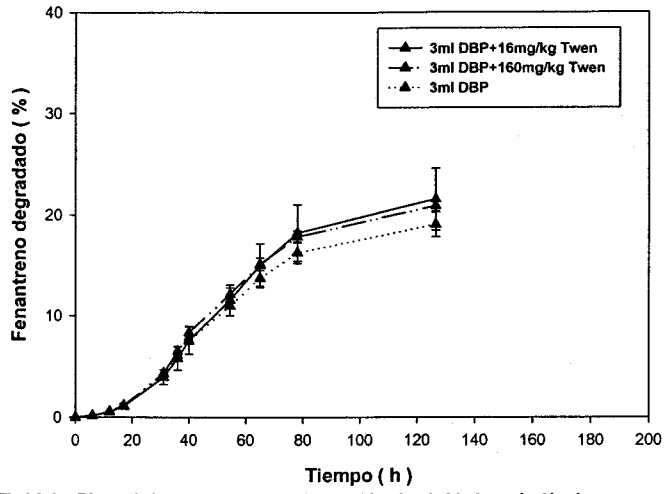


Fig 1.2.4g: Efecto de la concentración de Tween 80 sobre la biodegradación de fenantreno inicialmente presente en 3ml de DBP.

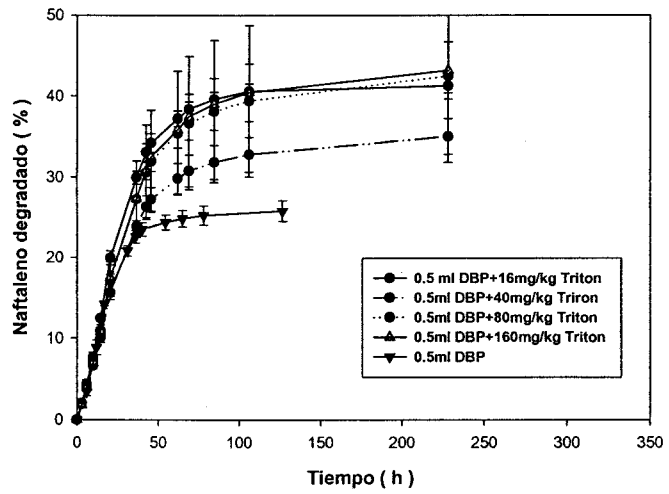


Fig 1.2.5g: Efecto de la concentración de Triton X-100 sobre la biodegradación de naftaleno inicialmente presente en 0.5 ml de DBP.

**Tabla I.2.2:** Efecto de distintos tratamientos sobre la biodisponibilidad de naftaleno secuestrado en distintos tipos de NAPLs

NAPLs	Volumen (ml)	Tratamiento	Tasa (%/h)	Amplitud (%)
HMN	0.5	Blanco	1.169 ± 0.077	34.49 ± 1.648
HMN	0.5	Degradadora de HD	2.311 ± 0.098	59.86 ± 2.497
HD	0.5	Blanco	0.993 ± 0.140	28.23 ± 3.488
HD	0.5	Degradadora de HD	1.248 ± 0.018	32.29 ± 1.937
HD	0.5	Triton 100 mg/kg	1.431 ± 0.063	32.67 ± 1.089
HD	0.5	Suspensión (Agitación)	1.385 ± 0.060	32.48 ± 1.112
HD	0.5	Triton 100mg/kg (Agita)	1.600 ± 0.090	41.51 ± 5.312
HD	0.5	Degradadora de HD (Agita)	1.566 ± 0.022	36.34 ± 1.948
DBP	0.5	Blanco	1.113 ± 0.237	42.56 ± 3.265
DBP	0.5	Degradadora de HD	1.199 ± 0.121	50.97 ± 1.806
DBP	0.5	Triton 100mg/kg	2.824 ± 0.180	56.05 ± 6.377
DBP	0.5	Diclorometano	0.022 ± 0.011	00.90 ± 0.346
DBP	2.5	Blanco	0.064 ± 0.029	04.20 ± 3.294
DBP	2.5	Diclorometano	0.040 ± 0.001	02.11 ± 0.607
DBP	0.5	Suspensión	3.328 ± 0.419	79.30 ± 7.607
DBP	0.5	Triton100mg/kg (Agita)	3.808 ± 0.008	87.11 ± 1.547

**I.2.3.- Efecto de la agitación, de bacterias degradadoras del NAPL y del tensioactivo Triton X-100 sobre la biodegradación de PAH en NAPLs.**

Con el objetivo de identificar posibles vías para la estimulación de la biodegradación de PAH presentes en NAPLs, se iniciaron una serie de experimentos consistentes en la aplicación de distintos tratamientos para aumentar la biodisponibilidad. Estos tratamiento incluyeron: 1) Introducción de una bacteria degradadora de hexadecano, junto a la degradadora de PAH (*C. xyli* S1). Con ello se pretendía ver si la biodegradación del mismo NAPL podría acelerar la mineralización, de tal manera que el compuesto secuestrado podía liberarse más rápidamente y, por



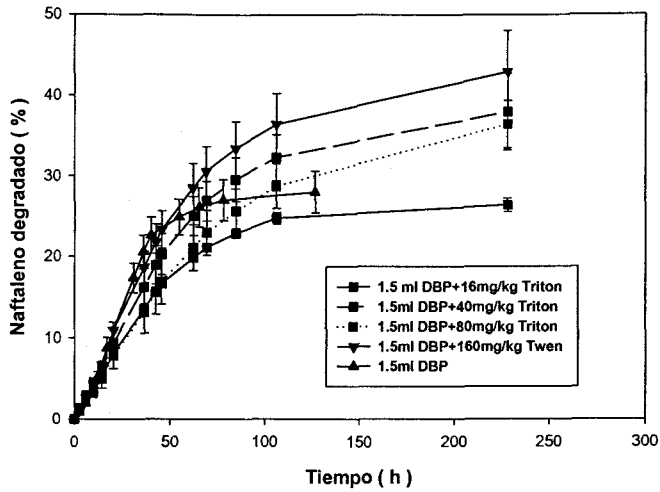


Fig 1.2.5h: Efecto de la concentración de Triton X-100 sobre la biodegradación de naftaleno inicialmente presente en 1.5 ml del DBP.

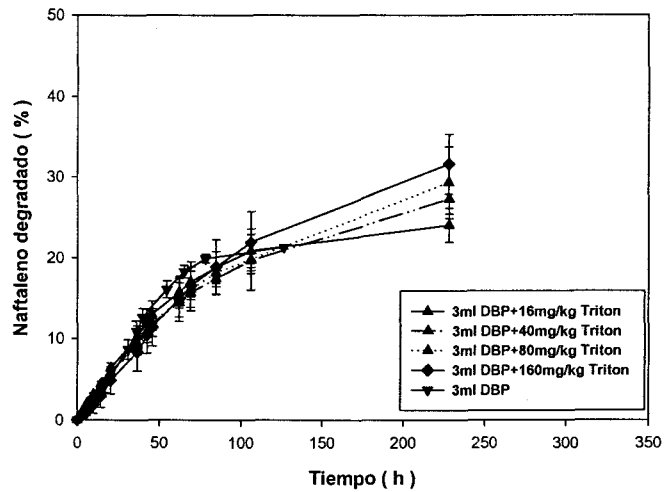


Fig 1.2.5i: Efecto de la concentración de Triton X-100 sobre la biodegradación de naftaleno inicialmente presente en 3ml de DBP.

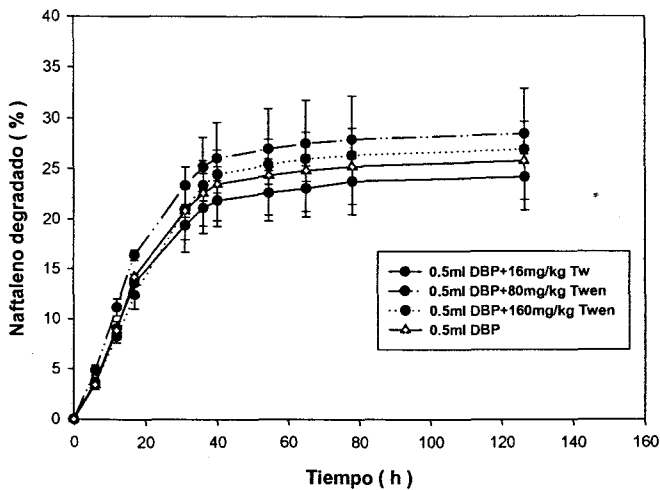


Fig 1.2.5j: Efecto de la concentración de Twen 80 sobre la biodegradación de naftaleno inicialmente presente en 0.5 ml del DBP.

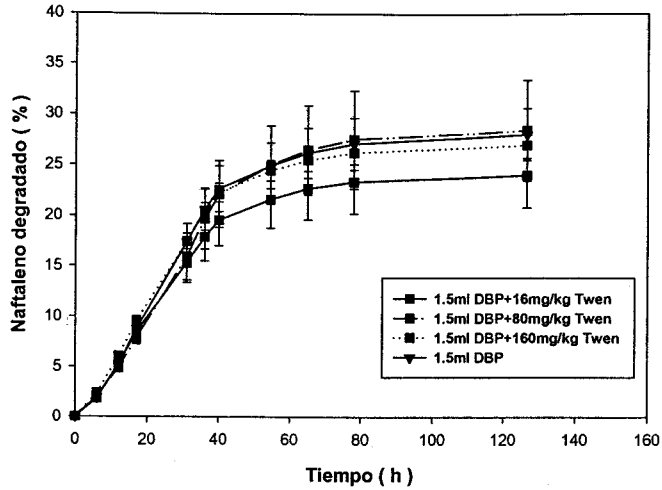


Fig 1.2.5k: Efecto de la concentración de Tween 80 sobre la biodegradación de de naftaleno inicialmente presente en 1.5 ml de DBP.

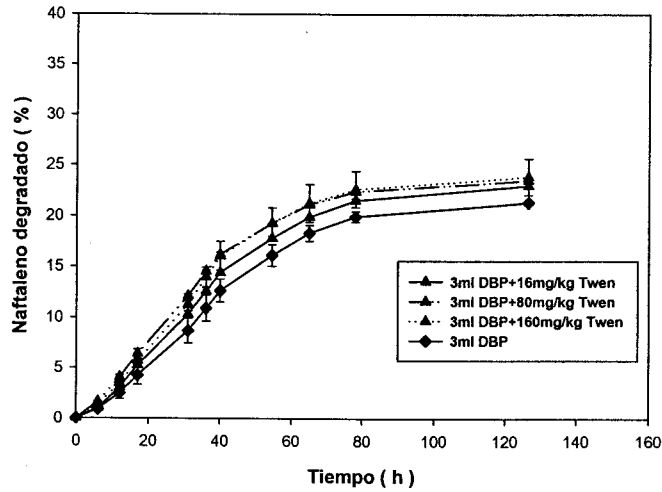


Fig 1.2.5l: Efecto la concentración de Tween 80 sobre la biodegradación de naftaleno inicialmente presente en 3 ml de DBP.

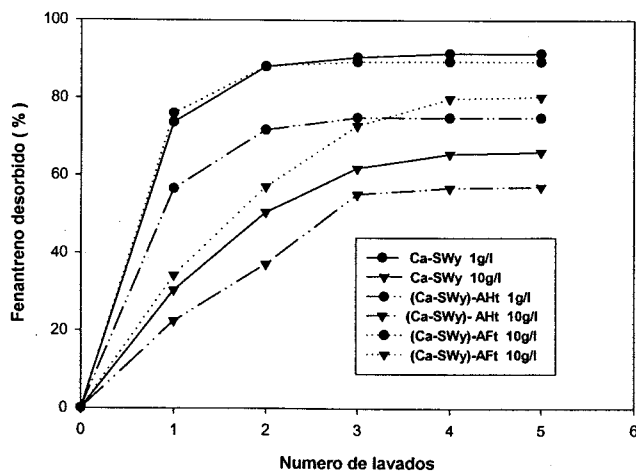


Fig II.1.1.1: Cinética de desorción en batch de fenantreno a partir de arcilla y de complejos arcillo-húmicos y arcillo-fúlvicos de turba.

**Tabla I.2.3:** Efecto de distintos tratamientos sobre la biodisponibilidad de fenantreno secuestrado en distintos tipos de NAPLs

NAPL	Volumen (ml)	Tratamiento	Tasa (%/h)	Amplitud (%)
HMN	0.5	Blanco	0.653 ± 0.043	50.08 ± 2.131
HMN	0.5	Degradadora de HD	0.635 ± 0.126	44.15 ± 4.42
HD	0.5	Blanco	0.829 ± 0.035	50.32 ± 0.489
HD	0.5	Degradadora de HD	0.897 ± 0.041	48.93 ± 1.011
HD	0.5	Triton 100 mg/kg	0.813 ± 0.066	45.53 ± 0.075
HD	0.5	Suspensión (Agitación)	2.511 ± 0.112	63.08 ± 3.322
HD	0.5	Triton 100mg/kg (Agita)	1.751 ± 0.055	54.81 ± 1.027
HD	0.5	Degradadora de HD (Agita)	2.113 ± 0.014	49.13 ± 2.51
DBP	0.5	Blanco	0.726 ± 0.027	34.50 ± 0.986
DBP	0.5	Degradadora de HD	0.685 ± 0.009	38.10 ± 0.435
DBP	0.5	Triton 100mg/kg	0.771 ± 0.037	37.49 ± 2.67
DBP	0.5	Diclorometano	0.022 ± 0.003	01.11 ± 0.08
DBP	2.5	Blanco	0.207 ± 0.03	13.88 ± 0.353
DBP	2.5	Diclorometano	0.003 ± 0	00.38 ± 0.046
DBP	0.5	Suspensión	1.620 ± 0.014	40.95 ± 1.37
DBP	0.5	Triton100mg/kg (Agita)	1.599 ± 0.236	39.05 ± 4.94

consecuencia, volverse más disponible para *Clavibacter xyli* S1; 2) Introducción del tensioactivo Triton X-100 a una concentración final de 100 mg/kg; y 3) Formación de fangos (a una concentración final de 1 g suelo/ ml agua) y agitación a 120 rpm. De estos tres tratamientos, sólo en el caso de la formación de fangos y agitación se observó una clara estimulación con respecto al control sobre la mineralización de fenantreno inicialmente disuelto en HD (Fig. I.2.3a). Este efecto se observó básicamente sobre las tasas máximas de mineralización, mientras que no se observó ningún efecto sobre el porcentaje final mineralizado (Tabla I.2.3). Al utilizar DBP como NAPL, el efecto de los distintos tratamientos fue básicamente el mismo que con HD, aunque también se observó una ligera estimulación en presencia de Triton X-100 (Fig. I.2.3b y Tabla I.2.3).

El estudio del efecto de la bacteria degradadora de HD y de Triton X-100 a una concentración de 100 mg/kg sobre la disponibilidad de naftaleno disuelto en HD resultó en una cierta estimulación de la tasa de mineralización en comparación con el control (Fig. I.2.3c). Esta estimulación también ocurrió al aplicar la formación de fangos y agitación a las muestras que recibieron los tratamientos arriba citados. Hay que notar, no obstante, que el tensioactivo potenció ligeramente el efecto estimulador de la agitación. Este efecto estimulador fue menos pronunciado que el que se detectó con fenantreno, con el que la agitación aumentó la disponibilidad del compuesto de una manera pronunciada en todos los tratamientos, sobre todo en el control (Tabla I.2.3 y I.2.2).

Un estudio parecido se realizó con DBP y al mismo volumen (0.5ml). Se observó que la presencia de la bacteria degradadora de HD estimuló ligeramente la mineralización en comparación con el control, mientras que la presencia de Triton X-100 resultó claramente en un aumento de la tasa de mineralización (Tabla I.2.2). El tratamiento que aumentó más la mineralización fue la agitación en presencia del tensioactivo, lo que se reflejó al nivel de la amplitud de mineralización, cuyo valor llegó hasta  $87.11 \pm 1.547 \%$  (Fig. I.2.3d).

#### **I.2.4.- Efecto de la superficie y del volumen del NAPL.**

En otro experimento se estudió el uso de un gran volumen (20 ml) de otro solvente orgánico (diclorometano), que se dejó evaporar antes de la inoculación, como forma de aumentar la superficie del NAPL en el suelo. Esto podría permitir un aumento en la disponibilidad del sustrato y por consecuencia aumentar su degradación. Contrariamente a lo que cabría esperar, no hubo estimulación sino una inhibición de la degradación de fenantreno, obteniéndose también el mismo resultado al aumentar el volumen de DBP a 2.5ml (Fig. I.2.4). El efecto inhibitorio del aumento del volumen del NAPL sobre la biodegradación de fenantreno también ocurrió en bacterias que habían sido precultivadas con naftaleno, en vez de con fenantreno (Fig. I.2.4a). En este caso, la tasa máxima de mineralización detectada con 0.5 ml de DBP ( $0.785 \pm 0.071 \%/h$ ) fue muy parecida, para el mismo volumen de DBP, a la de bacterias precultivadas con fenantreno ( $0.726 \pm 0.027 \%/h$ ).

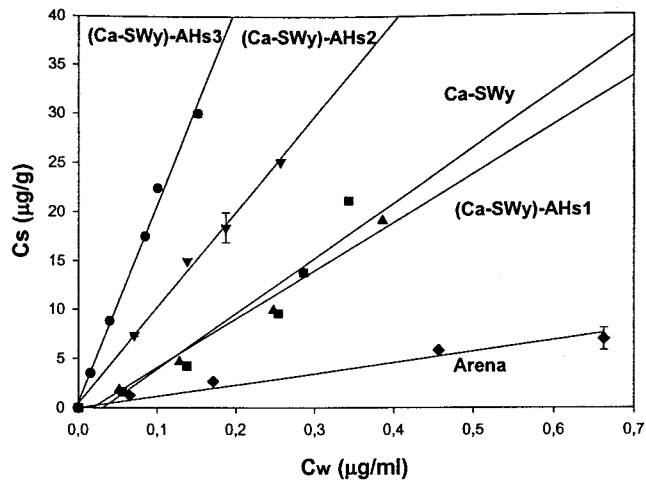


Fig II.1.1.2 : Isotermas de adsorción de fenantreno a distintos componentes modelo de suelo.

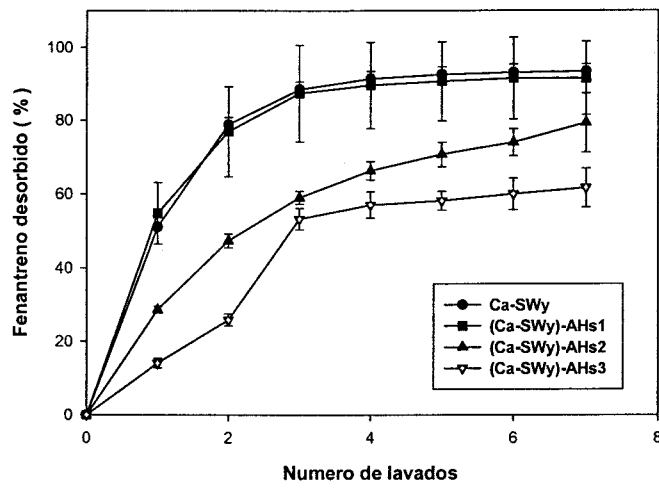


Fig IV-1-1 A: Cinética de desorción en batch de fenantreno a partir de distintos componentes modelo de suelo.

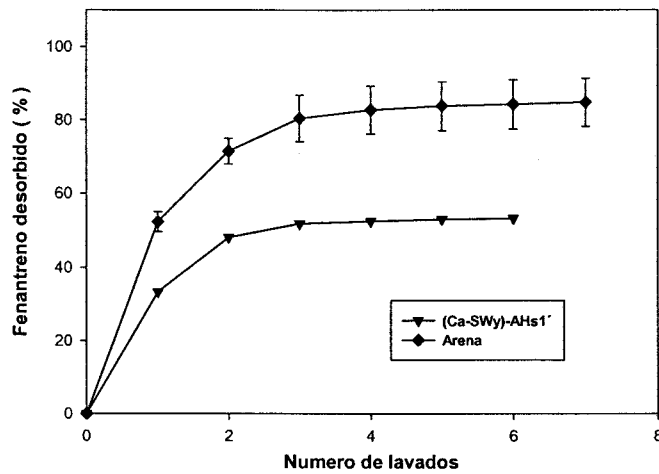


Fig II.1.1.3B: Cinética de desorción en batch de fenantreno a partir de arena y de complejo (Ca-SWy)-AHs1.

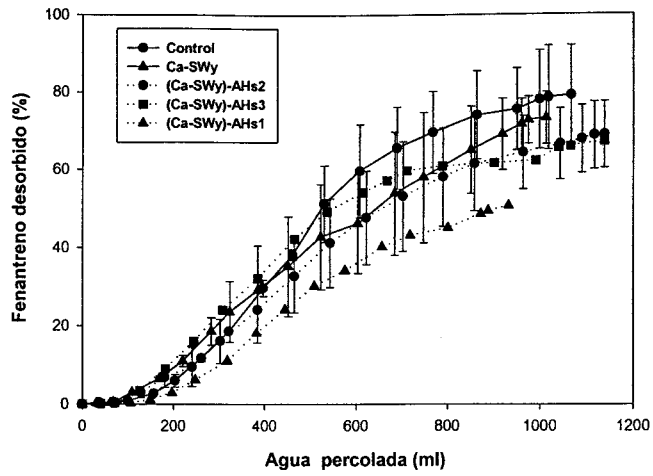


Fig II.1.1.4A: Cinética de desorción en columna de fenantreno a partir de componentes modelo de suelo.

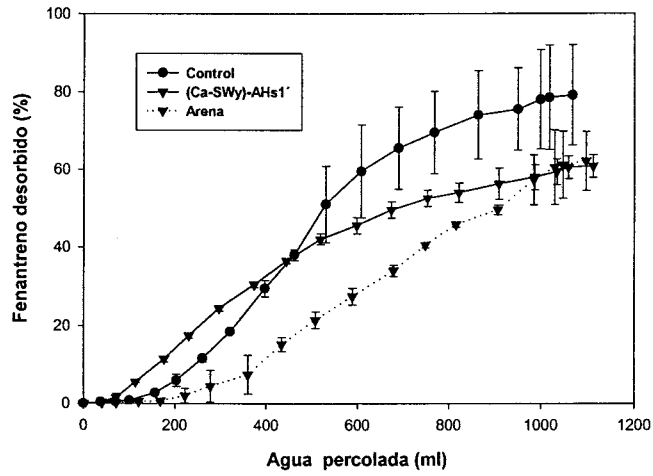


Fig II.1.1.4B: Efecto del contenido en MO de las partículas modelo sobre la cinética de desorción de fenantreno en columnas.

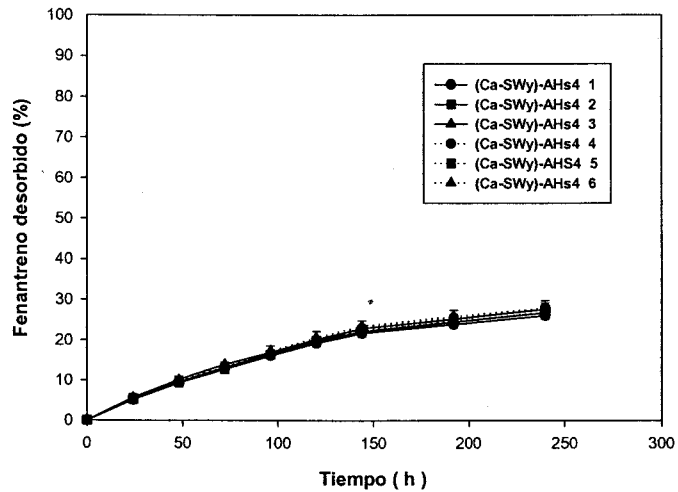


Fig II.1.1.5: Extracción de la fracción fácilmente desorbida del complejo (Ca-SWy)-AHs4 mediante lavados sucesivos con agua.

También se estudió el efecto del diclorometano como medio de extracción de naftaleno secuestrado en 0.5 y 2.5 ml del DBP, para hacerlo más disponible a la bacteria *Clavibacter xyli* S1. No obstante el resultado salió negativo (Fig. I.2.4b).

**I.2.5.- Estudio comparativo del efecto de distintas concentraciones de los tensioactivos Triton X-100 y Tween 80, en combinación con la fuente de carbono de precultivo de la bacteria *Clavibacter xyli*, sobre la biodegradación de fenantreno disuelto en DBP.**

Ante la posibilidad de un efecto positivo del tensioactivo Triton X-100 a concentraciones diferentes a la probada en I.2.3. (100 mg/Kg), se realizaron una serie de experimentos con concentraciones de 40 y 160 mg/Kg de tensioactivo, y diferentes volúmenes de DBP. La comparación de estos tratamientos con los respectivos controles mostró el efecto inhibitorio de este tensioactivo sobre la mineralización a los tres volúmenes estudiados de DBP: 0.5 ml (Fig. I.2.5a), 1.5 ml (Fig. I.2.5b) y 3 ml (Fig. I.2.4e). Este efecto era más patente en los valores de tasa máxima de mineralización que en los de amplitud detectados en estos ensayos (Tabla I.2.5a).

Se vió por tanto necesario utilizar otro tensioactivo para intentar aumentar la biodisponibilidad de fenantreno. Para ello se seleccionó Tween 80, utilizándose a dos concentraciones: 16 y 160 mg/kg. A un volumen de NAPL de 0.5 ml, se observó una cierta estimulación (visible en la tasa máxima de mineralización) a 16 mg/kg, mientras que a 160 mg/kg el tensioactivo no hubo ningún efecto pronunciado (Fig. I.2.5d). Cuando la comparación se realizó con un volumen de 1.5 ml de DBP no se observó una clara estimulación, aunque aumentó ligeramente la tasa máxima de mineralización a 160 mg/kg (Fig. I.2.5e). Con 3 ml de DBP tampoco se observó ningún efecto pronunciado del tensioactivo (Fig. I.2.5f).

Dado el efecto estimulante del Triton X-100 en la degradación de naftaleno observado en I.2.3., se estudió el efecto de un rango de concentraciones de Triton X-100 en combinación con la fuente de carbono de precultivo, es decir, precultivando la bacteria con fenantreno para usarla en los experimentos de biodegradación de naftaleno, con el objetivo de buscar las condiciones ideales para la estimulación. Las concentraciones usadas fueron 16, 40, 80 y 160 mg/kg. Como resultado, se ha notado

**Tabla I.2.5a:** Efecto de distintas concentraciones de Tween 80 y de Triton X-100 sobre la biodisponibilidad de fenantreno secuestrado en distintos volúmenes de DBP.

Volumen de NAPL (ml)	[Tensioactivo] (mg/kg)	Tasa (%/h)	Amplitud (%)
0.5	0	0.785 ± 0.071	31.39 ± 1.887
0.5	40 (Triton)	0.163 ± 0.011	20.24 ± 2.374
0.5	80 (Triton)	0.201 ± 0.035	25.06 ± 3.568
0.5	160 (Triton)	0.166 ± 0.007	20.38 ± 1.511
1.5	0	0.554 ± 0.025	23.27 ± 1.32
1.5	40 (Triton)	0.154 ± 0.011	19.14 ± 2.245
1.5	80 (Triton)	0.190 ± 0.033	23.69 ± 3.374
1.5	160 (Triton)	0.157 ± 0.007	19.27 ± 1.429
3	0	0.360 ± 0.031	19.06 ± 1.19
3	40 (Triton)	0.028 ± 0.008	04.11 ± 0.508
3	80 (Triton)	0.032 ± 0.006	04.68 ± 0.223
3	160 (Triton)	0.034 ± 0.005	04.56 ± 0.074
0.5	16 (Tween)	1.109 ± 0.037	38.99 ± 2.322
0.5	160 (Tween)	0.925 ± 0.094	32.92 ± 1.044
1.5	16 (Tween)	0.632 ± 0.186	26.84 ± 5.297
1.5	160 (Tween)	0.703 ± 0.052	28.15 ± 1.139
3	16 (Tween)	0.399 ± 0.069	21.55 ± 3.065
3	160 (Tween)	0.438 ± 0.04	20.90 ± 0.51

que a un volumen de 0.5 ml de DBP, ocurría una estimulación de la tasa máxima de mineralización a la concentración de 16 mg/kg, mientras en el resto de las concentraciones no se observó un efecto pronunciado de la presencia del tensioactivo (Fig. I.2.5g). También se observó que la presencia de Triton X-100 aumentó la amplitud de mineralización (Tabla I.2.5b). El efecto de la concentración de Triton X-100 sobre la tasa de degradación de naftaleno disuelto en 1.5 ml de DBP fué negativo a las concentraciones de 16, 40 y 80 mg/kg, mientras que a la concentración 160 mg/kg no se observó ningún efecto (Fig. I.2.5h). Con 3 ml de DBP el tensioactivo indujo una cierta



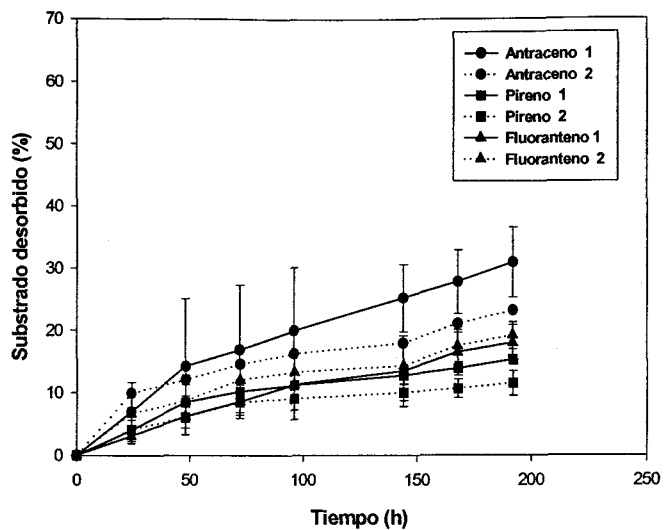


Fig. II.1.1.5: Desorción de HPAs a partir de (Ca-SWy)-AHS4 Se presentaron los diferentes duplicados por separado.

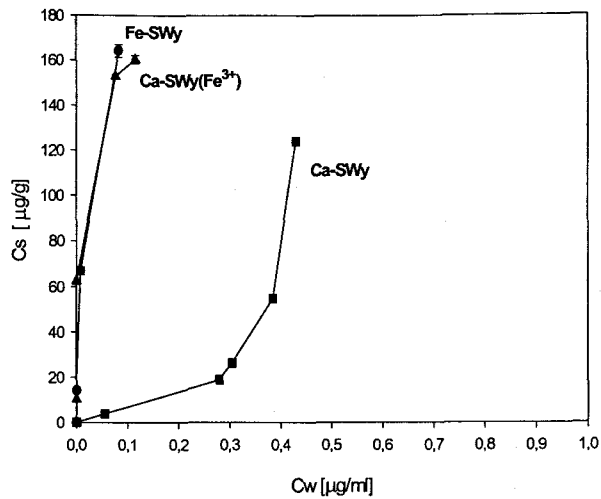


Fig. II.1.2.1.1A: Isotermas de adsorción de fenantreno sobre Ca-SWy en agua, Ca-SWy en presencia de Fe(III) y de Fe-SWy en agua.

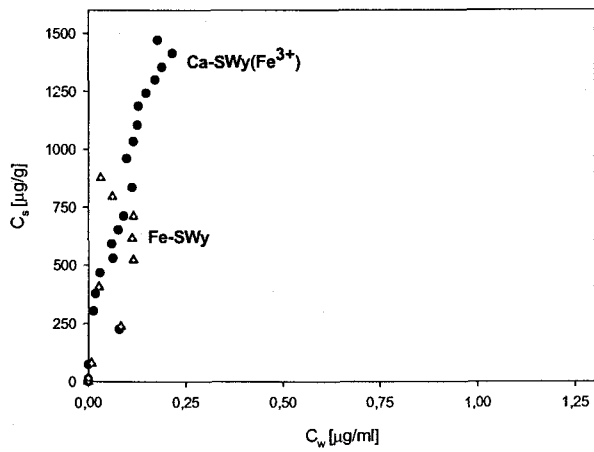


Fig. II.1.2.1.1B: Isotermas de adsorción extendidas de fenantreno sobre Ca-SWy( $\text{Fe}^{3+}$ ) y Fe-SWy.

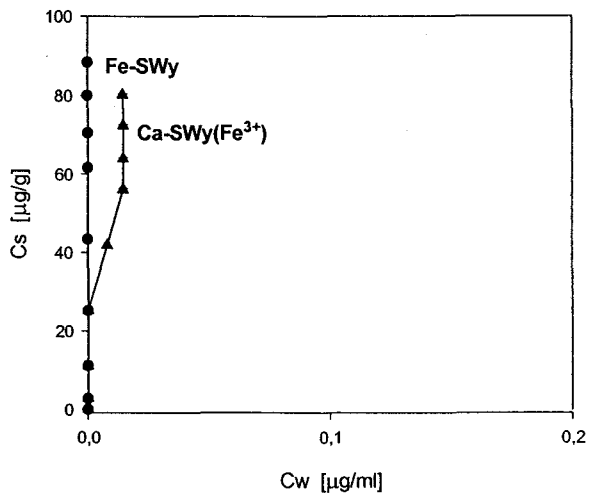


Fig. II.1.2..1.1C: Isotermas de adsorción extendidas de pireno sobre Ca-SWy( $\text{Fe}^{3+}$ ) y Fe-SWy.

inhibición de la degradación del sustrato en todos los casos, en comparación con el control (Fig. I.2.5i) y (Tabla I.2.5b).

**Tabla I.2.5b:** Efecto de distintas concentraciones de Triton X-100 sobre la biodisponibilidad de naftaleno secuestrado en distintos volúmenes de DBP

Volumen de NAPL (ml)	[Triton X-100] (mg/kg)	Tasa (%/h)	Amplitud (%)
0.5	0	0.980 ± 0.016	25.78 ± 1.307
0.5	16	1.173 ± 0.141	41.24 ± 0.901
0.5	40	0.856 ± 0.003	35.00 ± 2.203
0.5	80	0.953 ± 0.217	42.45 ± 10.643
0.5	160	1.010 ± 0.006	43.14 ± 3.545
1.5	0	0.636 ± 0.054	27.97 ± 2.572
1.5	16	0.435 ± 0.040	26.32 ± 0.849
1.5	40	0.484 ± 0.052	37.89 ± 4.78
1.5	80	0.424 ± 0.081	36.35 ± 2.948
1.5	160	0.633 ± 0.064	42.88 ± 5.119
3	0	0.440 ± 0.010	21.32 ± 0.217
3	16	0.340 ± 0.002	24.06 ± 2.123
3	40	0.298 ± 0.006	27.29 ± 1.856
3	80	0.302 ± 0.033	29.33 ± 4.44
3	160	0.284 ± 0.053	31.61 ± 3.709

El efecto del tensioactivo Tween 80, a concentraciones de 16, 80 y 160 mg/kg, sobre la biodegradación de naftaleno inicialmente presente en 0.5 ml de DBP, fue prácticamente nulo (Fig. I.2.5j). El mismo resultado se obtuvo con 1.5 ml de DBP a la concentración de 16 mg/kg, mientras que en el resto de las concentraciones se observó una ligera estimulación (Fig. I.2.5k). Con 3 ml de DBP se observó una estimulación a nivel de la tasa de mineralización a distintas concentraciones de Tween 80 (Fig. I.2.4l) y (Tabla I.2.5c).

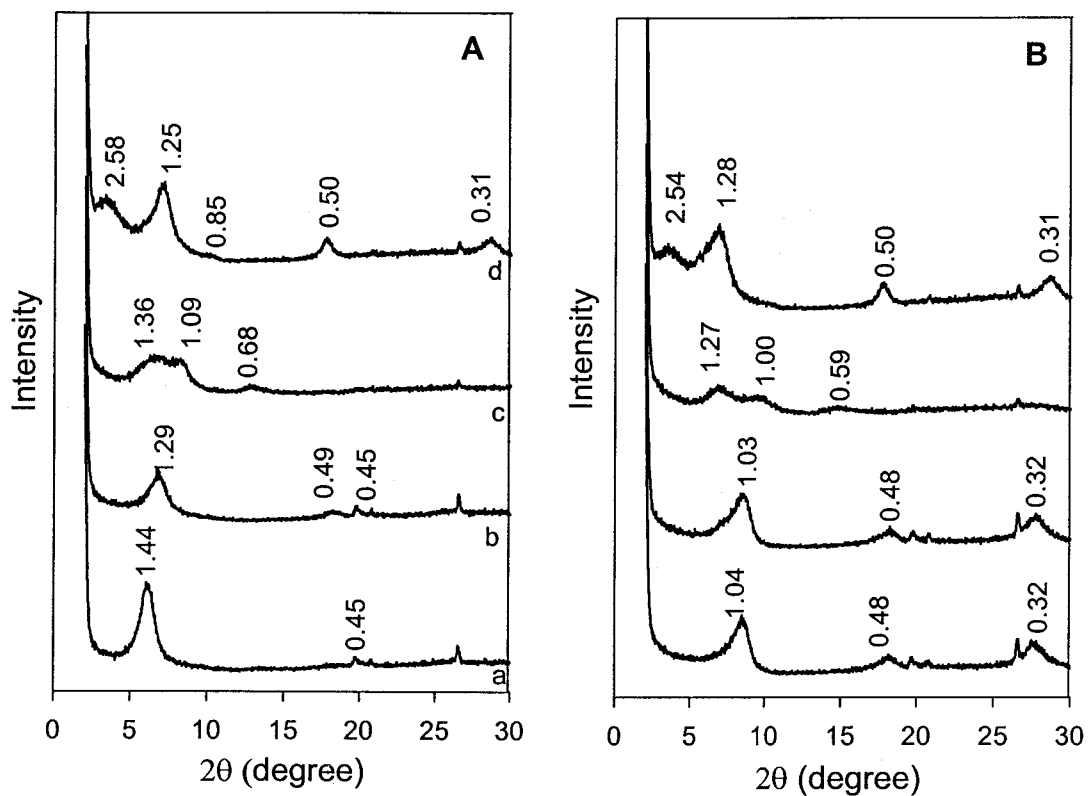


FIGURA II.1.2.2.2 A y B: Difractograma de rayos-X a temperatura ambiente (A) y después de calentar a 110 °C durante 24h (B) de las muestras de smectitas sujetas a un tratamiento de saturación sucesiva con fenantreno y sus controles correspondientes: a) Ca-SWy en agua, b) Ca-SWy en presencia del  $\text{Fe}^{3+}$  (2.64mM), c) Fe-SWy con 2.0  $\mu\text{mol/g}$  de fenantreno y d) Ca-SWy( $\text{Fe}^{3+}$ ) en presencia de 8.5  $\mu\text{mol/g}$  de fenantreno.

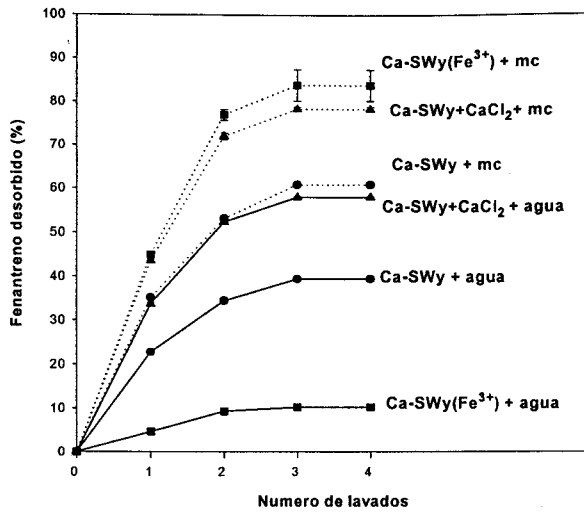


Fig. II.1.2.4.4A: Efecto del medio de cultivo (mc) como solución de adsorción sobre la desorción de fenantreno a partir de Ca-SWy y Ca-SWy(Fe<sup>3+</sup>) en comparación con agua destilada. Las condiciones de adsorción están indicadas en la figura para cada curva de desorción.

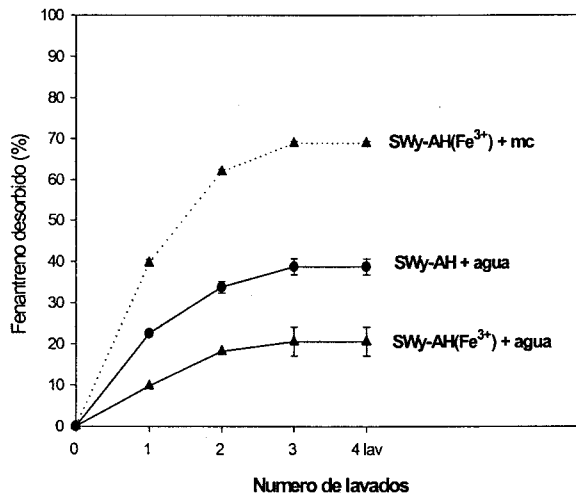


Fig. II.1.2.4.4B: Efecto del medio de cultivo (mc) como solución de adsorción sobre la desorción de fenantreno a partir del complejo arcillo-ácido húmico en comparación con agua destilada. Las condiciones de adsorción están indicadas en la figura para cada curva de desorción.

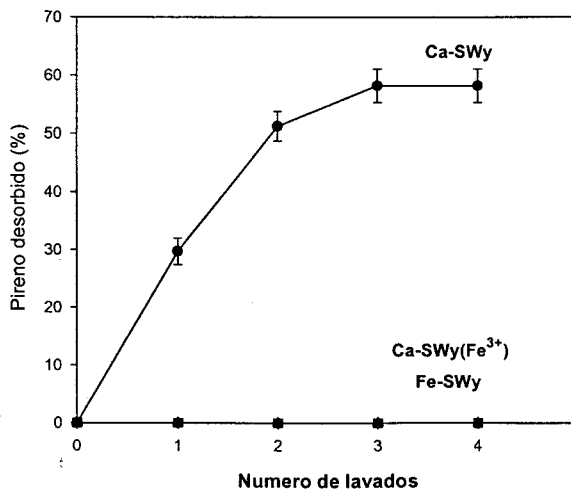


Fig. II.1.2.4.4C: Curvas de desorción sucesiva de pireno adsorbido a Ca-SWy, Ca-SWy(Fe<sup>3+</sup>) y Fe-SWy. La solución de la desorción fué el agua destilada.

**Tabla I.2.5c:** Efecto de distintas concentraciones de Tween 80 sobre la biodisponibilidad de naftaleno secuestrado en distintos volúmenes de DBP.

Volumen de NAPL (ml)	[Tween 80] (mg/kg)	Tasa (%/h)	Amplitud (%)
0.5	0	0.980 ± 0.016	25.78 ± 1.307
0.5	16	0.900 ± 0.007	24.18 ± 2.249
0.5	80	1.048 ± 0.005	28.46 ± 1.185
0.5	160	0.811 ± 0.101	26.90 ± 5.988
1.5	0	0.636 ± 0.054	27.97 ± 2.572
1.5	16	0.604 ± 0.082	23.95 ± 3.197
1.5	80	0.686 ± 0.107	28.37 ± 5.007
1.5	160	0.652 ± 0.011	26.91 ± 1.264
3	0	0.44 ± 0.010	21.32 ± 0.217
3	16	0.456 ± 0.008	22.99 ± 0.213
3	80	0.450 ± 0.006	23.49 ± 0.098
3	160	0.524 ± 0.119	23.85 ± 1.802

## II.- EFECTO DE PARTÍCULAS MODELO DEL SUELO SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD DE HPA.

### II.1. Adsorción-desorción

En esta sección se ha profundizado en el conocimiento de los procesos de adsorción-desorción de HPA en partículas modelo de suelo, que posteriormente fueron utilizadas en los ensayos de biodegradación y transporte bacteriano.

#### II.1.1. Efecto de la materia orgánica presente en las partículas.

II.1.1.1. Efecto de la naturaleza de la fracción húmica en las partículas sobre la adsorción-desorción de fenantreno: estudio comparativo de un ácido húmico y un ácido fúlvico del mismo origen.

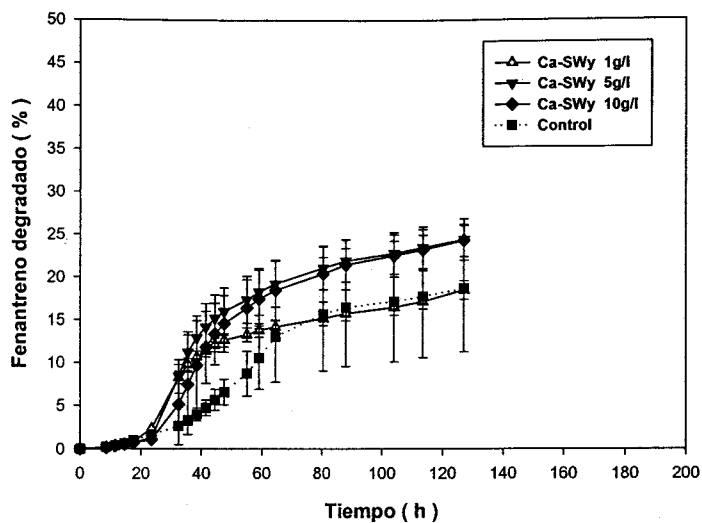


Fig II.2.1.1.1: Efecto de la concentración en arcilla sobre la biodegradación de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de fenantreno.

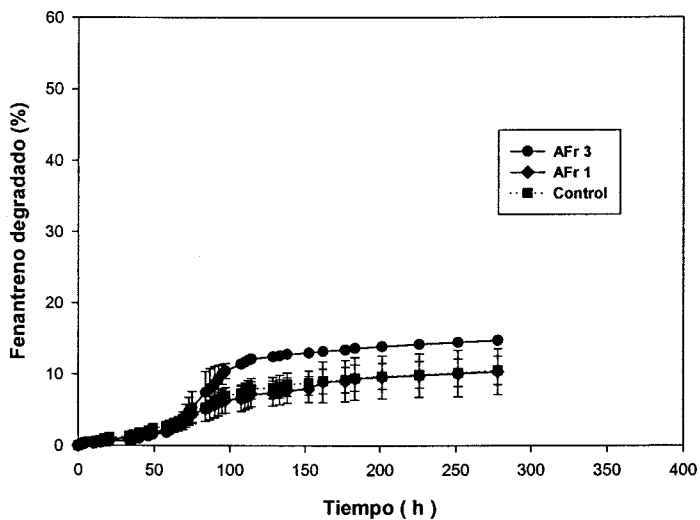


Fig II.2.1.1.2: Efecto de la concentración de ácido fúlvico disuelto sobre la biodegradación de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de fenantreno.

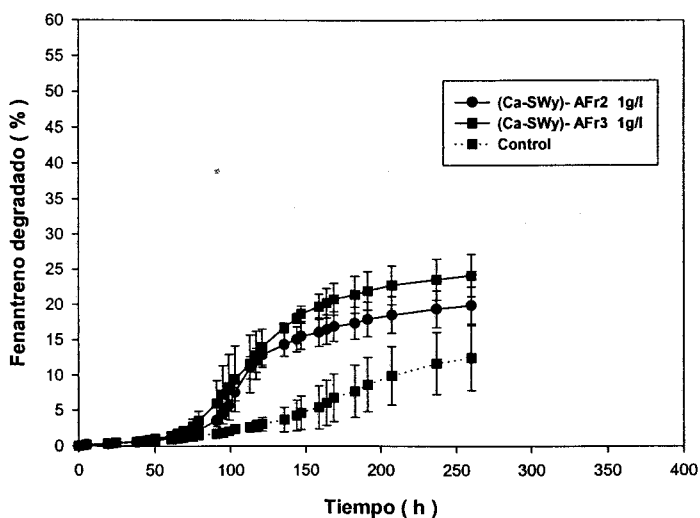


Fig II.2.1.1.3A: Efecto de la concentración de ácido fúlvico en los complejos arcillo-fúlvicos sobre la biodegradación de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de fenantreno.

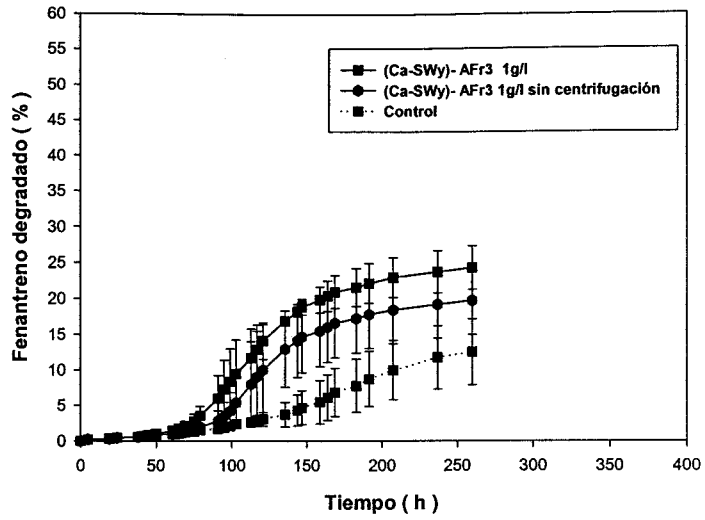


Fig II.2.1.1.3 B: Efecto de la centrifugación de las preparaciones de complejos (Ca-SWy)-AFr3 sobre la biodegradación de 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de fenantreno.

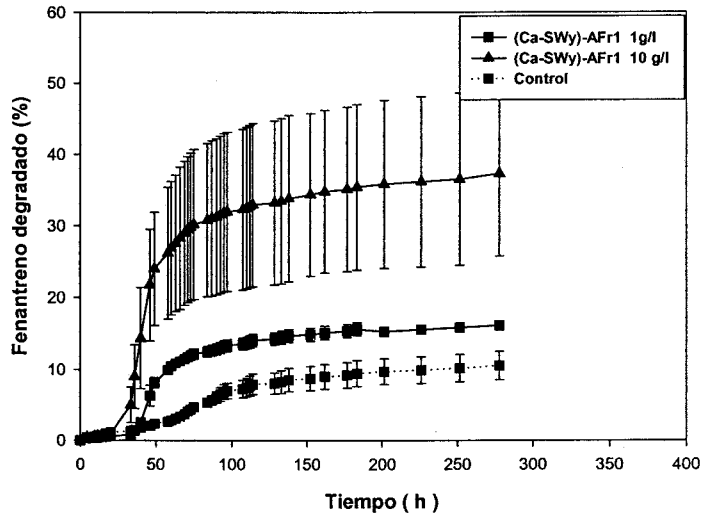


Fig II.2.1.1.3C: Efecto de la concentración del complejo (Ca-SWy)-AFr1 sobre la biodegradación de 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de fenantreno.

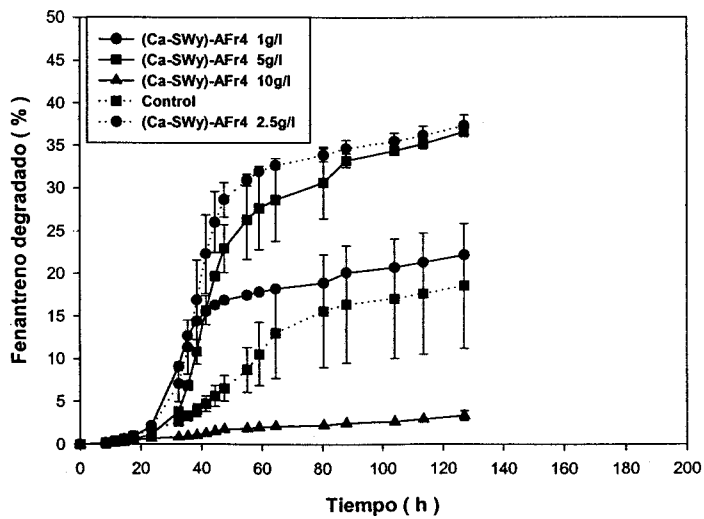


Fig II.2.1.1.3D: Efecto de la concentración del complejo (Ca-SWy)-AFr4 sobre la biodegradación de 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de fenantreno.



La adsorción de fenantreno a las partículas de arcilla montmorillonita y a complejos arcillo-húmicos se estimó dentro de un rango de concentración de fenantreno inferior a su solubilidad en agua (1,3 µg/ml). Los valores de los coeficientes de distribución,  $K_d$ , obtenidos de a partir de las isothermas, fueron 95.3 ml/g para la arcilla, 303.51 ml/g para los complejos arcilla-ácido fúlvico ((Ca-SWy)-AFt), y 349.22 ml/g para los complejos arcilla-ácido húmico ((Ca-SWy)-AHt). Se concluye, por tanto, que las fracciones húmicas presentes en las partículas contribuyen de una manera significativa al aumento de la capacidad de adsorción. Los valores de  $K_{oc}$  para la adsorción de fenantreno a los complejos arcillo-húmicos y arcillo-fulvicos fueron 20,542 ml/g y 37,689 ml/g, respectivamente.

La adsorción a la arcilla y a los complejos arcillo-fulvicos fué más reversible que la adsorción a los complejos arcillo-húmicos, como indica la desorción durante repetidas extracciones con agua realizadas cada 24 h (Fig. II.1.1.1). A una concentración de sólidos de 1g/l, el fenantreno recuperado alcanzó más de 91,4 y 89,3 % para la arcilla y los complejos arcillo-fulvicos, respectivamente. En cambio, los complejos arcillo-húmicos presentaron una significativa fracción de fenantreno resistente a la desorción. De hecho, solamente se pudo recuperar el 74,9% de la cantidad inicial. En todos los casos, la desorción de la fracción lábil de fenantreno se completó después de 48 h. Casi el mismo comportamiento se observó al aumentar la concentración en arcilla y de los complejos de 1 g/l hasta 10 g/l, aunque fueron necesarias 72 h para alcanzar la liberación de toda la fracción lábil.

### **II.1.1.2. Determinación de las isothermas de adsorción y coeficientes de distribución en partículas con valores diferentes de fracción de carbono orgánico ( $f_{oc}$ )**

Para profundizar sobre el efecto de la materia orgánica adsorbida en las partículas sobre su capacidad de adsorción de fenantreno, se obtuvieron los valores de  $K_d$  (Tabla II.1.1.2) mediante regresión lineal a partir de las isothermas correspondiente a componentes modelo con diferentes  $f_{oc}$  (Fig. II.1.1.2). De acuerdo con la clasificación propuesta por Giles et al (76), la forma de las isothermas es de tipo C para los materiales estudiados, considerando un rango de concentración en solución ( $C_w$ ) inferior a 0.84 µg/ml de fenantreno. No obstante, como se verá más adelante en un estudio en el que se

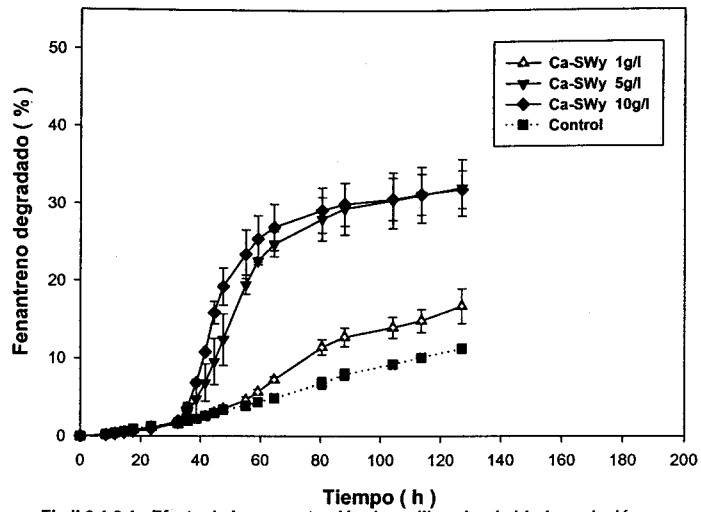


Fig II.2.1.2.1 : Efecto de la concentración de arcilla sobre la biodegradación de 1  $\mu\text{g/ml}$  de fenantreno.

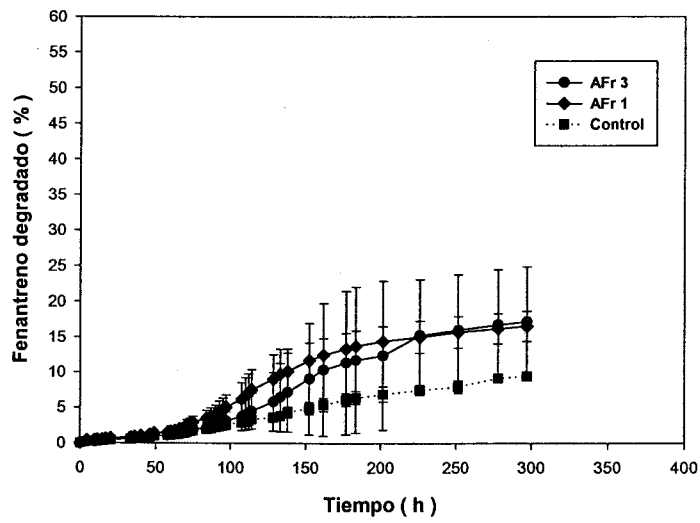


Fig II.2.1.2.2 : Efecto de la concentración de ácido fúlvico disuelto sobre la biodegradación de 1  $\mu\text{g/ml}$  de fenantreno.

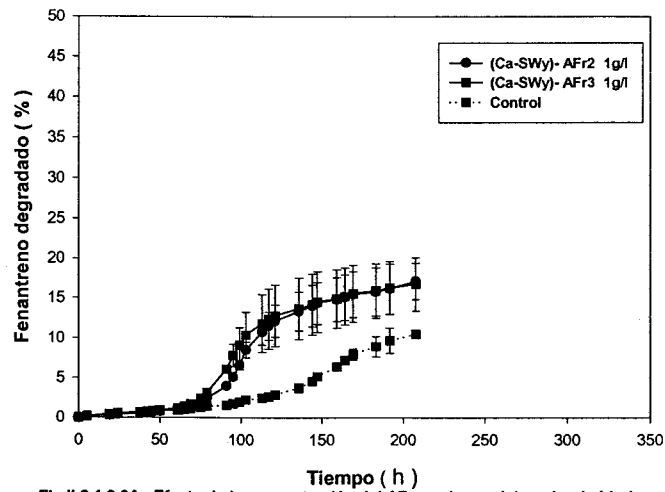


Fig II.2.1.2.3A : Efecto de la concentración del AFr en el complejo sobre la biodegradación de 1  $\mu\text{g/ml}$  de fenantreno.

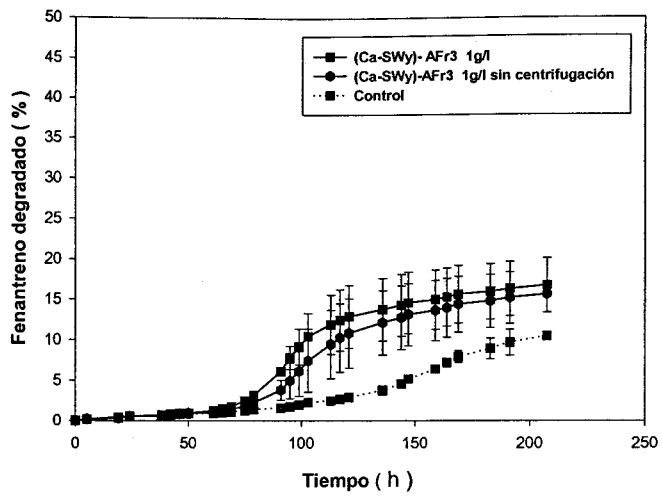


Fig II.2.1.2.3B : Efecto de la centrifugación de las preparaciones de complejos (Ca-SWy)-AFr3 sobre la biodegradación de 1 µg/ml de fenantreno.

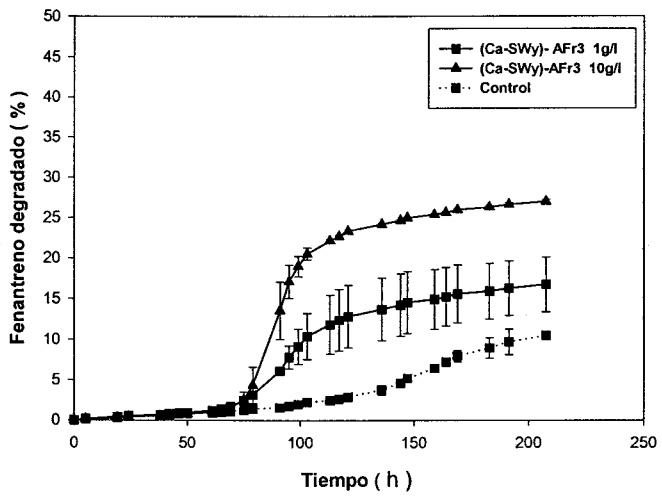


Fig II.2.1.2.3C : Efecto de la concentración del complejo (Ca-SWy)-AFr3 sobre la biodegradación de 1 µg/ml de fenantreno.

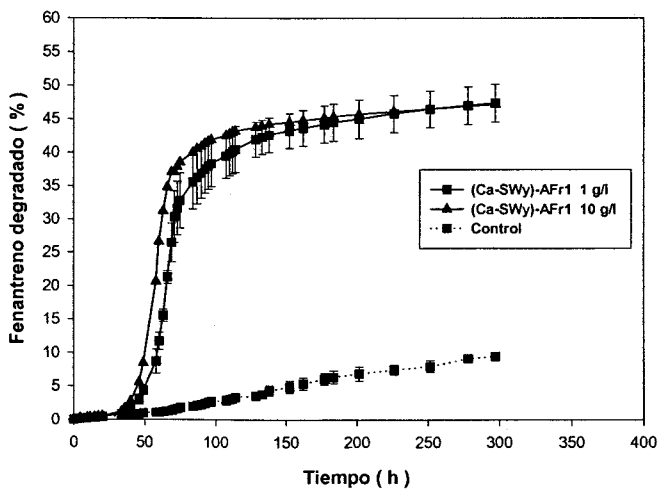


Fig III-1-2-3 D : Efecto de la concentración del complejo arcillo-fulvico (Ca-SWy)-AFr1 sobre biodegradación de 1 µg/ml de fenantreno.

utilizaron mayores concentraciones de fenantreno en solución, la isoterma observada con la arcilla (Ca-SWy) puede corresponder también al tipo C-S. Estas cinco isothermas revelaron que, dentro de un rango de concentración inferior a 0.84  $\mu\text{g/ml}$  de fenantreno, la arcilla tiene un valor mas bajo de  $K_d$  en comparación con los complejos (Ca-SWy)-AHs2 y (Ca-SWy)-AHs3. El complejo (Ca-SWy)-AHs5 tenía un contenido en materia orgánica ( $f_{oc}$ ) parecido a la del complejo (Ca-SWy)-AHs3.

**Tabla II.1.1.2:** Efecto del contenido en materia orgánica sobre la capacidad de adsorción de fenantreno por distintas partículas modelo del suelo.

Componentes del suelo	$f_{oc}$	$K_d$	$\text{Log } K_{oc}^a$
Ca-SWy	< 0.001	57	—
(Ca-SWy)-AHs1	0.001	50	4.70
(Ca-SWy)-AHs2	0.006	97	4.21
(Ca-SWy)-AHs3	0.013	201	4.19
(Ca-SWy)-AHs4	0.211	1393	3.819
(Ca-SWy)-AHs5	0.011		
Arena (Santa olalla)	0.002	20	4.00
Suelo	0.0076	11	3.16

(a) El valor de  $K_{ow}$  predicho por Karickhoff et al., 1979 es 4.36

### II.1.1.3. Influencia de $f_{oc}$ sobre la desorción de fenantreno en un sistema estanco (“batch”).

Utilizando la información generada en las isothermas del apartado II.1.1.2., se estudió la desorción de la misma concentración,  $C_s$ , de fenantreno (2.94  $\mu\text{g}/100\text{mg}$ ) inicialmente adsorbido a partículas de arcilla, y a los complejos (Ca-SWy)-AHs1, (Ca-SWy)-AHs2, (Ca-SWy)-AHs3. Para ello, se moduló la concentración inicial en la fase acuosa durante el proceso previo de adsorción según se describe en Material y Métodos. Los resultados muestran el efecto claro del contenido en materia orgánica sobre la cantidad desorbida (Fig II.1.1.3A). La cantidad de fenantreno desorbida de Ca-SWy, (Ca-SWy)-AHs1, (Ca-SWy)-AHs2 y (Ca-SWy)-AHs3 fué, respectivamente,  $93.4 \pm 1.98$ ,

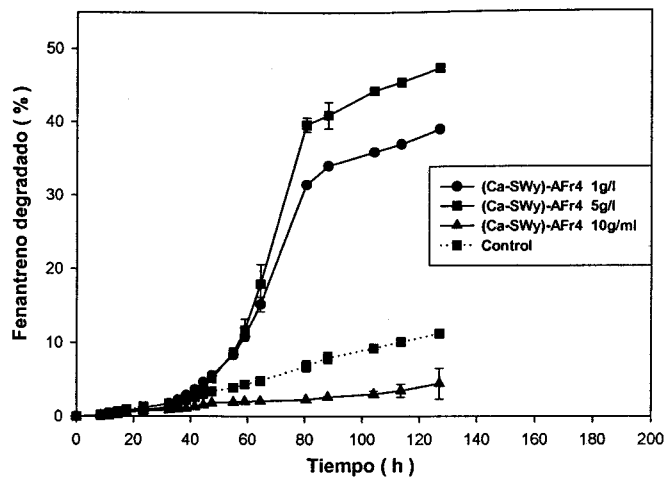


Fig II.2.1.2.3E: Efecto de la concentración del complejo (Ca-SWy)-AFr4 sobre la biodegradación de 1 µg/ml de fenantreno.

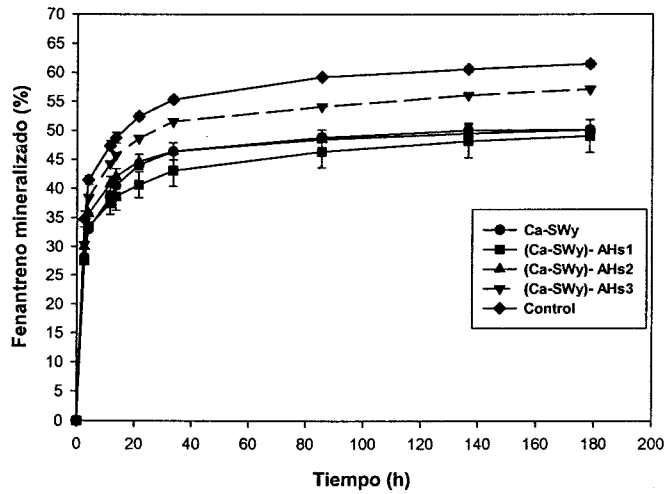


Fig II.2.2: Mineralización de la fracción labil adsorbida a la arcilla y a los complejos con distintas cantidades en materia orgánica.

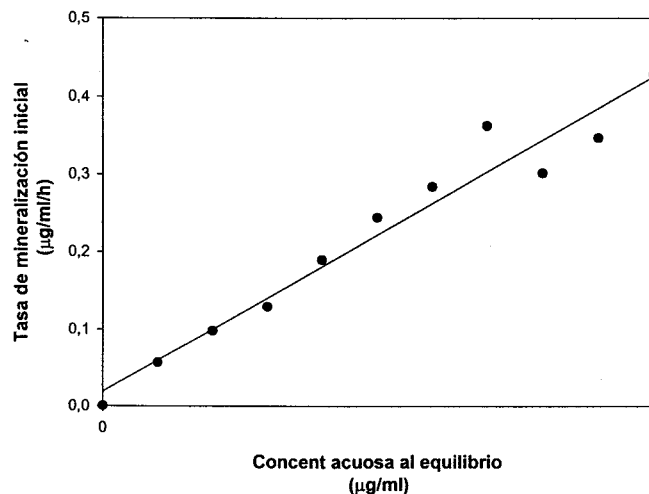


Fig II.2.3: Correlación entre la concentración acuosa y las tasas de mineralización de fenantreno en solución por *Clavibacter xyli*.

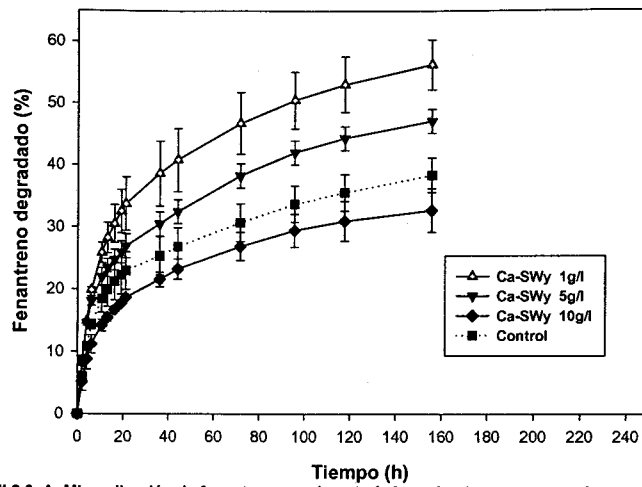


Fig II.2.3aA: Mineralización de fenantreno en el control sin sorbente y en suspensiones equilibradas con distintas cantidades de arcilla. la concentración inicial del fenantreno fué 0.1µg/ml

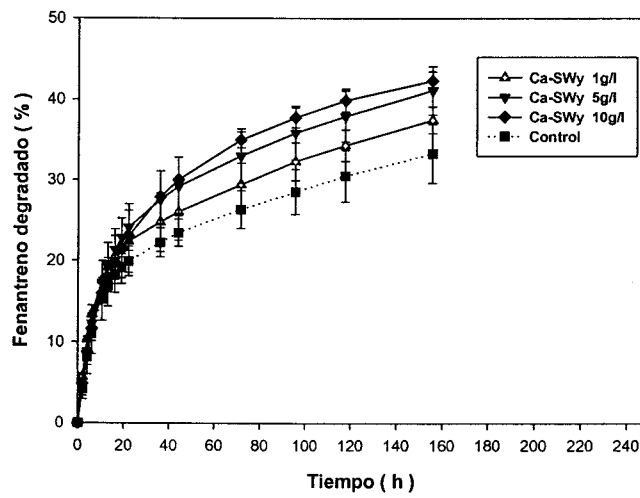


Fig II.2.3aB: Al igual que en Fig II.2.3aA, pero con 1 µg/ ml fenantreno.

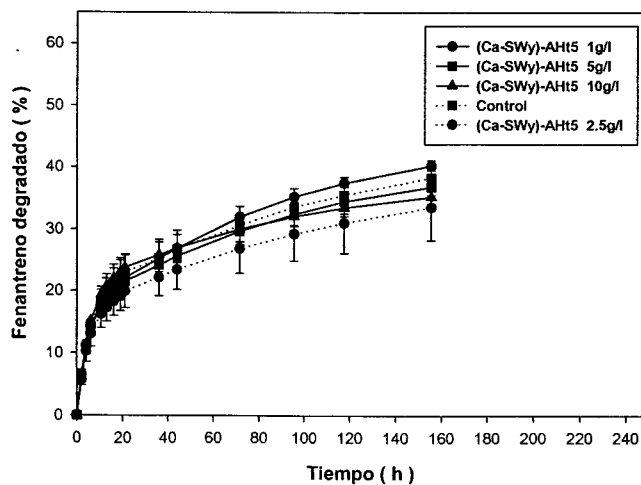


Fig II.2.3aC: Mineralización de fenantreno en el control y en suspensiones equilibradas con distintas concentraciones de (Ca-SWy)-AHT5. La concentración inicial del fenantreno fué 0.1µg/ml.

91.48±10.013, 79.3±8.061 y 61.7±5.233 %. El complejo (Ca-SWy)-AHs1 se comportó igual que la arcilla debido a su bajo contenido en ácido húmico.

Otro experimento similar se realizó con la misma cantidad del compuesto (1.23 µg/100 mg) adsorbido al complejo (Ca-SWy)-AHs1 y a la arena (Fig. II.1.1.3B). El comportamiento de ambos sorbentes fue también diferente, alcanzándose, respectivamente, una desorción final de 53.3% y 84.75±6.576 %. Aunque en este caso la  $f_{oc}$  era también diferente entre ambos sorbentes, la mayor superficie de los complejos frente a la arena puede también haber influido en la desorción.

#### **II.1.1.4. Influencia de $f_{oc}$ sobre la desorción de fenantreno en columnas de suelo.**

Se planteó estudiar el comportamiento de los distintos sorbentes mencionados en la sección anterior, incorporados al suelo de la estación experimental (0.76 % MO, 13.5 % arcilla ) sometido a un sistema de flujo continuo. Las curvas de desorción de la misma cantidad de fenantreno (2.94 µg/100mg) a partir de los sorbentes Ca-SWy, (Ca-SWy)-AHs1, (Ca-SWy)-AHs2, (Ca-SWy)-AHs3 y del control (es decir, suelo conteniendo la misma cantidad del fenantreno disuelto) están presentadas en la (Fig II.1.1.4A). Las cantidades finales desorbidas tras los lavados realizados con el sistema de flujo continuo fueron 73.25±6.718, 50.6, 68.95±8.556, 67.3 y 79.1±12.869 % del compuesto a partir de la Ca-SWy, (Ca-SWy)-AHs1, (Ca-SWy)-AHs2, (Ca-SWy)-AHs3 y del control, respectivamente.

Al comparar la arena y el complejo (Ca-SWy)-AHs1, las amplitudes de desorción fueron 62.1±7.637 y 60.8±2.97 %, respectivamente (Fig II.1.1.4B), pero con una cierta diferencia respecto a la velocidad de liberación del sustrato. Estos resultados muestran, a diferencia de los resultados obtenidos en el sistema estanco, el efecto parecido de los distintos sorbentes en comparación con el control a nivel de la tasa y de la amplitud de desorción debido a la liberación de la fracción lábil.

#### **II.1.1.5. Adsorción-desorción de HPA con partículas de alto $f_{oc}$ : (Ca-SWy)-AHs4 ( $f_{oc} = 0.211$ )**

Como se ha mencionado anteriormente, se observó la clara influencia de la materia orgánica asociada a la arcilla sobre la desorción de la fracción lábil, y, por consecuencia, sobre el grado de secuestro que implica la adsorción del compuesto hidrófobo. Con el objetivo de estudiar un complejo con un gran contenido en materia orgánica, se utilizó el complejo (Ca-SWy)-AHs4. Este último era capaz de adsorber hasta un 90% de fenantreno presente en el medio, resultando en una Cs igual a 10.2  $\mu\text{g}/100\text{mg}$ . En cambio, sólo el  $26,067 \pm 0.231$  % de esta cantidad se desorbió durante los lavados sucesivos (Fig. II.1.1.5). Este último complejo presuntó por tanto una mayor capacidad de adsorción y secuestro con respecto a los 3 primeros complejos, que contenían menos materia orgánica.

Esta gran capacidad de adsorción también se observó con otros HPAs, en concreto antraceno, pireno y fluoreno. Con antraceno, el complejo adsorbió un 90 % del compuesto inicialmente en solución, liberándose sólo un  $27.0 \pm 5.4$  % durante la desorción a una tasa de  $0.27 \pm 0.03$  %/h. Con el pireno se adsorbió un 95 %, de lo que sólo se desorbió  $13.4 \pm 2.6$ % (a una tasa de  $0.15 \pm 0.03$  %/h ). Finalmente, del 90 % de fluoranteno adsorbido se liberó sólo  $18.5 \pm 0.8$  %/h a una velocidad de  $0.15 \pm 0.04$  %/h.

Este complejo se utilizó en los ensayos de mineralización de la fracción de HPAs resistente a la desorción, descritos en II.2.4.2.

## **II.1.2. Influencia de la composición catiónica del medio sobre la adsorción de HPA a partículas de arcilla**

### **II.1.2.1. Isotermas de adsorción**

Las isotermas de adsorción de la arcilla (Ca-SWy) en presencia de fenantreno fueron diferentes según se realizaran en presencia o en ausencia de hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en solución (Fig. II.1.2.1-1A). El estudio de la isoterma de Ca-SWy en presencia de hierro reveló que cuando el fenantreno se presentaba a concentraciones bajas la adsorción era total. En cambio, cuando el mismo experimento se repitió en ausencia de hierro, 55-56 % del sustrato quedó en solución. Cuando la adsorción se realizó en agua a concentraciones altas de fenantreno, la adsorción a Ca-SWy aumentó de una manera muy importante. Las isotermas de adsorción presentaron dos aspectos distintos: en agua, sin presencia de  $\text{Fe}^{3+}$ , la isoterma mostró una curvatura cóncava, de tipo C-S, indicando



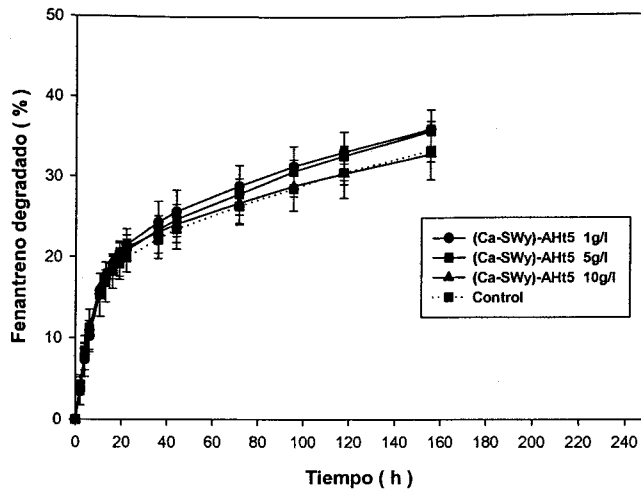


Fig II.2.3aD: Igual que en Fig II. 2.3aC, pero con 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de fenantreno.

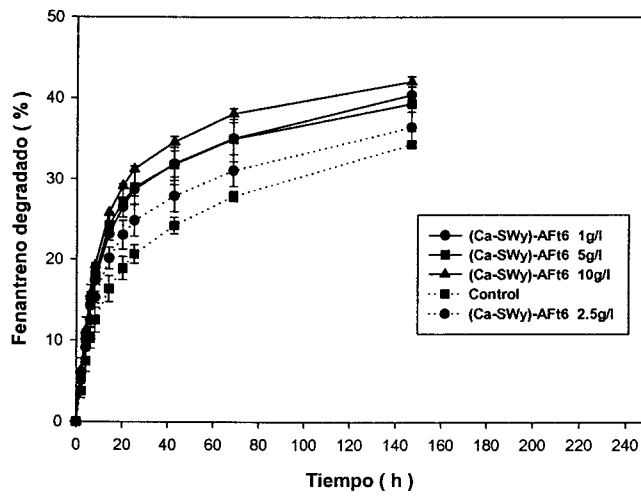


Fig II.2.3aE: Mineralización de fenantreno en el control y en suspensiones equilibradas con distintas concentraciones de (Ca-SWy)-AFt6. La concentración inicial de fenantreno fué 0.1  $\mu\text{g/ml}$ .

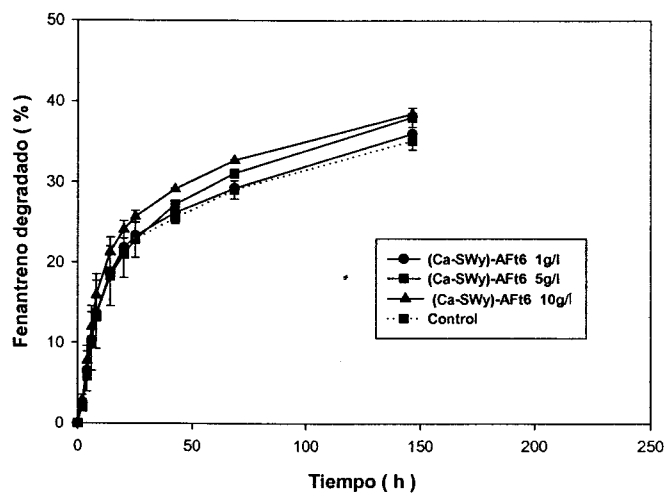


Fig II.2.3aF: Igual que en Fig II.2.3aE, pero con 1  $\mu\text{g/ml}$  de fenantreno.

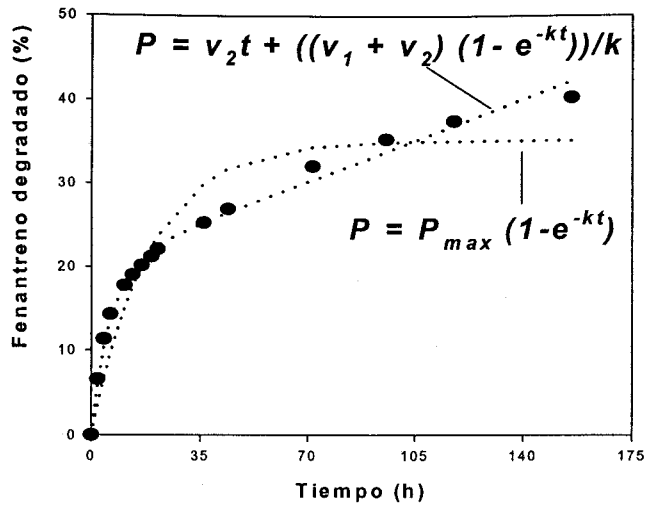


Fig II.2.3b: Curvas teóricas generadas mediante el uso del modelo de degradación-desorción (Eq1) y el modelo simple de primer orden (Eq.2) sobre los datos reales (representados como puntos) obtenidos con la mineralización de 0.1 µg/ml en presencia de 1 g/l de complejo arcillo-húmico.

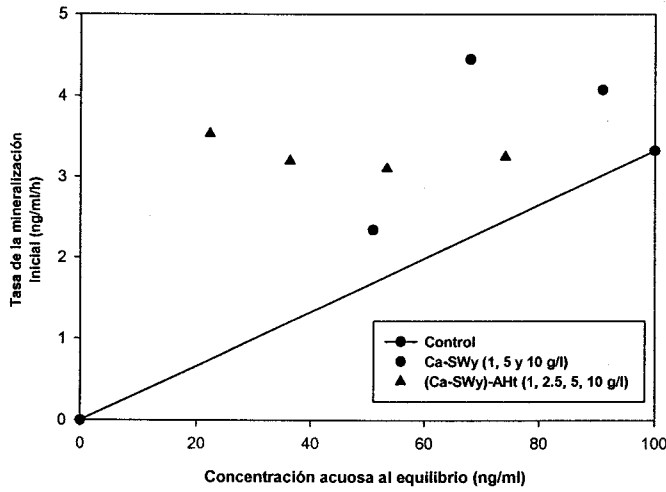


Fig II.2.3c: Tasas de mineralización, calculadas por modelización, frente a concentraciones de fenantreno en la fase acuosa en equilibrio obtenidas a partir de las isotermas de adsorción. La concentración inicial de fenantreno fué 0.1 µg/ml. La línea continua corresponde a los datos del control sin sorbente.

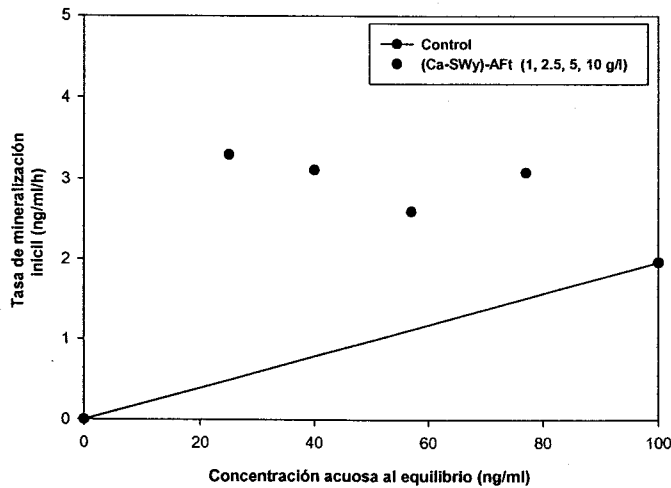


Fig II.2.3d: Tasas de mineralización, calculadas por modelización, frente a las concentraciones de fenantreno en la fase acuosa en equilibrio obtenidas a partir de las isotermas de adsorción. La concentración inicial de fenantreno fué 0.1 µg/ml. La línea continua corresponde a los datos del control sin sorbente.

una resistencia inicial de las moléculas de fenantreno a ser adsorbidas por competición con el solvente. En presencia de hierro, el aspecto de la isoterma de adsorción cambió completamente hacia el tipo H-L (Fig. II.1.2.1-1A), aumentando la adsorción de fenantreno incluso a concentraciones muy bajas. El papel del hierro se confirmó al constatar la disminución brusca en la concentración en hierro desde 2.64 mM en la solución inicial hasta 0.1 mM en equilibrio. La adsorción de  $\text{Fe}^{3+}$  o de  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$  fué acompañada por una adsorción de los protones del medio, tal como indica el aumento de pH desde 2.5 en la solución inicial, hasta 5, una vez alcanzado al equilibrio.

El papel del  $\text{Fe}^{3+}$  se confirmó mediante la isoterma de adsorción de fenantreno realizada con la arcilla saturada con hierro (Fe-SWy), como se muestra en la Figura. II.1.2.1-1A. Estas partículas se comportaron de una manera similar a Ca-SWy( $\text{Fe}^{3+}$ ), aunque ésta era de tipo H-L mientras que aquélla fue de tipo L-S (Fig. II.1.2.1-1A). Las isotermas de fenantreno realizadas con Ca-SWy( $\text{Fe}^{3+}$ ) y con Fe-SWy se extendieron por saturación sucesiva con soluciones más concentradas (0.507-1.167  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Estas isotermas muestran claramente ser de tipo L, desarrollando un comienzo de 'plateau' de saturación a 1470  $\mu\text{g}/\text{g}$  ( 8.25  $\mu\text{mol}/\text{g}$ ) lo que sugiere que las zonas hidrófobas han empezado a agotarse (Fig. II.1.2.1-1B).

Las isotermas extendidas de adsorción realizadas con pireno en presencia de los sistemas Ca-SWy( $\text{Fe}^{3+}$ ) y Fe-SWy están representadas en la Fig. II.1.2.1-1C. En el caso de Ca-SWy( $\text{Fe}^{3+}$ ) se observó que una gran parte del pireno que se encontraba inicialmente en solución se adsorbió durante el experimento. En el caso de Fe-SWy la adsorción fue total. El comportamiento de estos tipos de arcillas sugieren que tienen una isoterma de tipo-H, aunque el aspecto definitivo de estas isotermas no pudo determinarse debido al límite de la solubilidad.

### II.1.2.2. Estudio por difracción de rayos-X

Los difractogramas de rayos-X de las esmectitas Ca-SWy y Fe-SWy, obtenidos después de diversos tratamientos en una cámara de temperatura, se muestran en la Fig. II.1.2.2-2. El espacio basal original de la esmectita Ca-SWy en agua fué 1.44 nm, y cambió a 1.29 nm cuando se trató sucesivamente con una solución acuosa de  $\text{Fe}^{3+}$  a 2.64 mM (Fig. II.1.2.2-2Ab). Este último tratamiento presentó el mismo difractograma que Fe-SWy (resultado no mostrado). Asimismo, la arcilla en ausencia y en presencia de hierro se colapsó hasta 1.04 nm y 1.03 nm, respectivamente, cuando se calentó a 100 C.

Cuando las muestras Fe-SWy y Ca-SWy se sometieron a una saturación sucesiva de fenantreno en agua y en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$  (2.64mM), respectivamente, se observaron cambios muy importantes en su espacio basal. Los resultados de los análisis de Fe-SWy con 2.0  $\mu\text{mol/g}$  de fenantreno adsorbido mostraron una difracción muy larga y poco definida, con dos valores de espacio basal: a 1.36 nm y a 1.09 nm (Fig. II.1.2.2-2Ac). Los mismos análisis aplicados a la muestra Ca-SWy al ser tratada sucesivamente con fenantreno en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$ , conteniendo una cantidad de fenantreno adsorbido de 8  $\mu\text{mol/g}$ , mostraron una serie de reflexiones basales muy bien desarrolladas, correspondiendo a un espacio basal de 2.5 nm. Este factor se confirmó con las muestras Fe-SWy/Ph (Fig. II.1.2.2-2Bc) y Ca-SWy(Fe)/Ph, presentada en la Fig. II.1.2.2-2Bd, cuyos espacios basales no mostraron ningún cambio con respecto a aquellos realizados en la cámara de temperatura.

### II.1.2.3. Coeficientes de distribución

La adsorción de fenantreno también se estimó mediante la determinación de los coeficientes de distribución, con el objetivo de comparar fácilmente los diferentes sistemas estudiados, tales como Ca-SWy y el complejo (Ca-SWy)-AH, en presencia y ausencia de los iones de hierro y de calcio, así como de medio de cultivo. Los valores de  $K_d$  y de las cantidades de fenantreno adsorbidas ( $C_s$ ) que corresponden a cada uno de los sistemas estudiados están presentados en la tabla II.1.2.3. La presencia del medio de cultivo no alteró la adsorción de fenantreno ni por Ca-SWy ni por el complejo arcillo-húmico. En cambio, el medio de cultivo inhibió el efecto positivo de la presencia de hierro sobre la adsorción de fenantreno a Ca-SWy y (Ca-SWy)-AH. En resumen, la presencia del medio de cultivo causó que la adsorción de fenantreno en presencia de hierro ocurriera de una manera similar a aquella realizada en  $\text{CaCl}_2$  o en agua sin  $\text{Fe}^{3+}$ .

La asociación del ácido húmico a la arcilla aumentó la adsorción de fenantreno en agua y en medio de cultivo. También se observó que al ser mayor el contenido en AH en el complejo (Ca-SWy)-AH2 los valores de  $K_d$  y  $C_s$  fueron mayores que aquellos observados con el complejo (Ca-SWy)-AH1.

### II.1.2.4. Desorción.

Las curvas de desorción acumulativas de fenantreno adsorbido en los diferentes sistemas estudiados (Ca-SWy en agua, CaCl<sub>2</sub>, Fe<sup>3+</sup> y medio de cultivo) están representadas en la Fig. II.1.2.4-4A. Estas curvas de desorción se obtuvieron a partir de los sistemas adsorbente-substrato presentados en la tabla II.1.2.4, y reflejaron el mismo factor observado en la adsorción. Cuando el medio de cultivo estaba presente durante la fase de adsorción de fenantreno, la desorción fué mayor. La diferencia más grande se observó con Ca-SWy en presencia de hierro, con y sin medio de cultivo, alcanzando unos valores, respectivamente, de 10.3 % y 83.7 % del fenantreno desorbido.

La desorción acumulativa de fenantreno a partir del complejo (Ca-SWy)-AH mostró el mismo comportamiento que con Ca-SWy (Fig. II.1.2.4-4B). De nuevo, la desorción de fenantreno a partir del complejo se vió afectada por la presencia del medio de cultivo, como en el caso de la arcilla. De acuerdo con los resultados de adsorción (Tabla II.1.2.3), las diferencias en la desorción observadas entre el agua y el medio de cultivo de las muestras en el caso del complejo (Ca-SWy)-AH fueron menores que en el caso de Ca-SWy. La cantidad inicial del AH en el complejo pareció no tener efecto sobre la tasa de desorción, dado que el complejo (Ca-SWy)-AH2 presentó la misma curva que el complejo (Ca-SWy)-AH1, aunque estos complejos adsorbieron inicialmente distintas cantidades de fenantreno (Tabla II.1.2.3).

La desorción de pireno, como se muestra en la Fig. II.1.2.4-4C, corresponde solamente a los tres sistemas en los cuales se estudió la adsorción: Ca-SWy en agua, Ca-SWy en presencia de Fe<sup>3+</sup>, y Fe-SWy. La desorción en el primer sistema alcanzó el 58%. En cambio, no se detectó desorción en los otros dos sistemas. Los ensayos de adsorción realizados con Ca-SWy, (Ca-SWy)-Fe y Fe-SWy en presencia de pireno mostraron la misma influencia del hierro observada con fenantreno. En efecto, ocurrió una completa adsorción de pireno a la arcilla férrica (concentración final de 18.2 µg/g). Se detectó con (Ca-SWy)-Fe una adsorción del 97.6 % (17.36 µg/g). Por último, en presencia de Ca-SWy, la cantidad adsorbida fue de 66.15 % (12.04 µg/g). El mismo comportamiento observado durante la fase de la adsorción se repitió en la fase de desorción, con un secuestro completo con Fe-SWy y Ca-SWy(Fe<sup>3+</sup>) (Fig. II.1.2.4-4C). En ausencia de hierro, sólo se desorbió el 58 % del pireno inicialmente adsorbido.

La isoterma de adsorción de pireno en presencia del hierro presentó una forma de tipo H. Por último, los experimentos de adsorción sucesiva con pireno presentaron el mismo patrón que con fenantreno (Fig. II.1.2.1-1C).

**Tabla II.1.2.3:** Efecto de las fracciones humicas adsorbidas y de la composición de la fase acuosa sobre la sorción de fenantreno por la esmectita

	Ca-SWy		Ca-SWy(Fe <sup>3+</sup> )		Ca-SWy(CaCl <sub>2</sub> )		(Ca-SWy)-AH1	(Ca-SWy)-AH1(Fe <sup>3+</sup> )		(Ca-SWy)-AH2
	Agua	cm <sup>a</sup>	Agua	cm <sup>a</sup>	Agua	cm <sup>a</sup>	Agua	Agua	cm <sup>a</sup>	cm <sup>a</sup>
Kd	280,16	282,27	2324	217,6	228,63	220,2	322,45	1127,6	245,67	493,04
(l/g)										
Cs	119,49	121,66	145,25	85,19	81,62	92,26	124,95	137	89,18	141,75
(μg/g)										

<sup>a</sup>cm, medio de cultivo

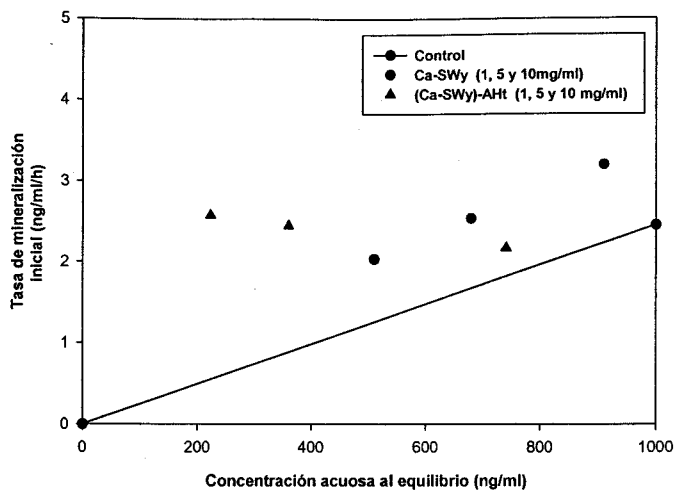


Fig II.2.3e: Tasas de mineralización, calculadas por modelización, frente a concentraciones de fenantreno en la fase acuosa en equilibrio obtenidas a partir de las isotermas de adsorción. La concentración inicial de fenantreno fué 1 µg/ml. La línea continua corresponde a los datos del control sin sorbente.

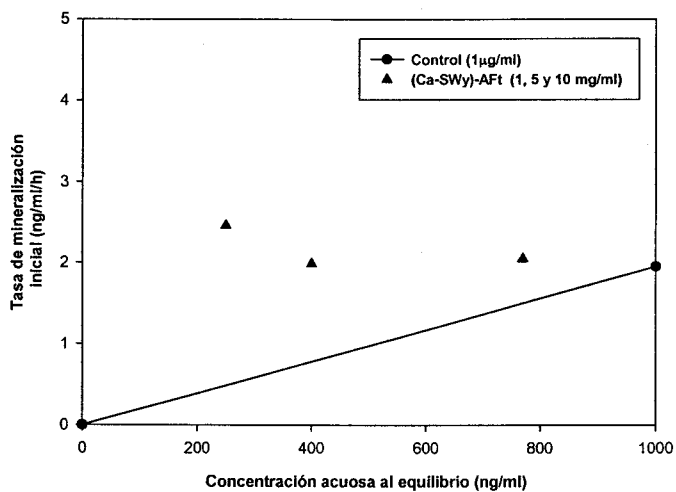


Fig II.2.3f: Tasas de mineralización, por modelización, frente las concentraciones de fenantreno en la fase acuosa en equilibrio obtenidas a partir de las isotermas de adsorción. La concentración inicial de fenantreno fué 1 µg/ml. La línea continua corresponde a los datos del control sin sorbente.

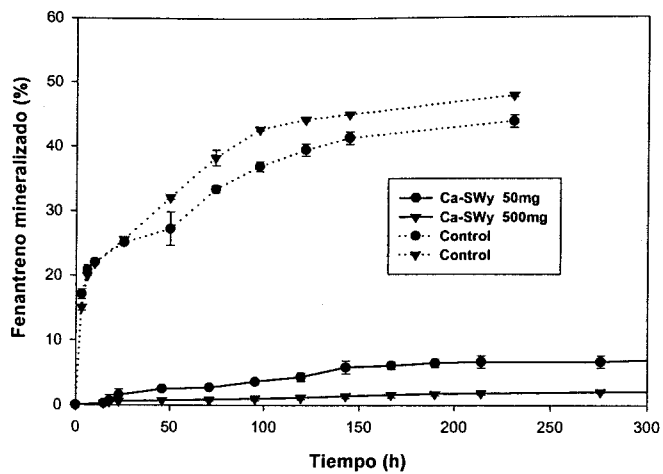


Fig II.2.4.1a: Mineralización de fenantreno resistente a la desorción presente en 50 y 500mg de arcilla. Las cantidades de fenantreno inicial presentes en los controles fueron las mismas que las adsorbidas a las dos muestras respectivas.

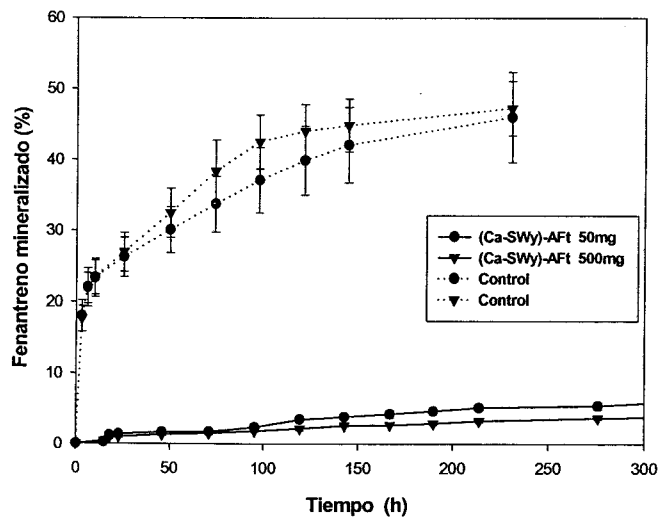


Fig II.2.4.1b: Mineralización de fenantreno resistente a la desorción presente en 50 y 500 mg del complejo arcillo-fúlvico. Las cantidades inicial presentes en los controles fueron las mismas que las adsorbidas a los dos muestras respectivas.

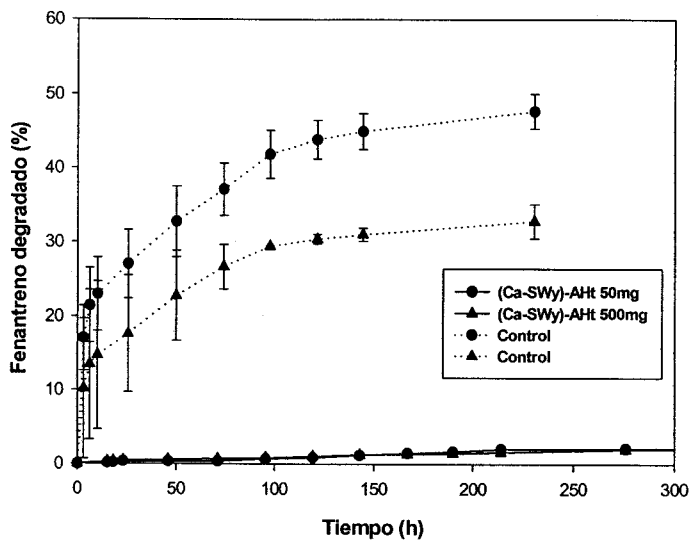


Fig II.2.4.1c: Mineralización de fenantreno resistente a la desorción presente en 50 y 500 mg del complejo arcillo-húmico. Las cantidades de fenantreno inicial presentes en los controles fueron las mismas que las adsorbidas a las dos muestras respectivas.



## II.2.- Biodegradación.

Una vez conocidos los procesos que gobiernan la adsorción-desorción de HPA en partículas modelo del suelo, a continuación se va a exponer el efecto de estos componentes sobre la biodegradación.

### II.2.1. Efectos de componentes modelo del suelo sobre la biodegradación de fenantreno.

#### II.2.1.1. Biodegradación de fenantreno a una de concentración 0.1 $\mu\text{g/ml}$

##### II.2.1.1.1. Efecto de las arcillas

La presencia de la arcilla (Ca-SWy) a la concentración de 1 g/l indujo una estimulación de la tasa de mineralización. Sin embargo, no se observó ningún efecto sobre la amplitud de mineralización en comparación con el control (tabla II.2.1.1.1).

**Tabla II.2.1.1.1:** Efecto de distintos componentes del suelo sobre la biodegradación de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de fenantreno

Tratamiento	[Sorbentes] (g/l)	Tasa (%/h)	Amplitud (%)
Ca-SWy	0	0.455 $\pm$ 0.288	18.59 $\pm$ 7.368
Ca-SWy	1	0.626 $\pm$ 0.068	18.41 $\pm$ 1.079
Ca-SWy	5	0.822 $\pm$ 0.202	24.31 $\pm$ 2.429
Ca-SWy	10	0.753 $\pm$ 0.095	24.21 $\pm$ 1.898
(Ca-SWy)-AFr4	1	0.887 $\pm$ 0.097	22.19 $\pm$ 0.299
(Ca-SWy)-AFr4	2.5	1.824 $\pm$ 0.247	37.35 $\pm$ 1.238
(Ca-SWy)-AFr4	5	1.470 $\pm$ 0.295	36.61 $\pm$ 0.58
(Ca-SWy)-AFr4	10	0.085 $\pm$ 0.003	03.35 $\pm$ 0.554

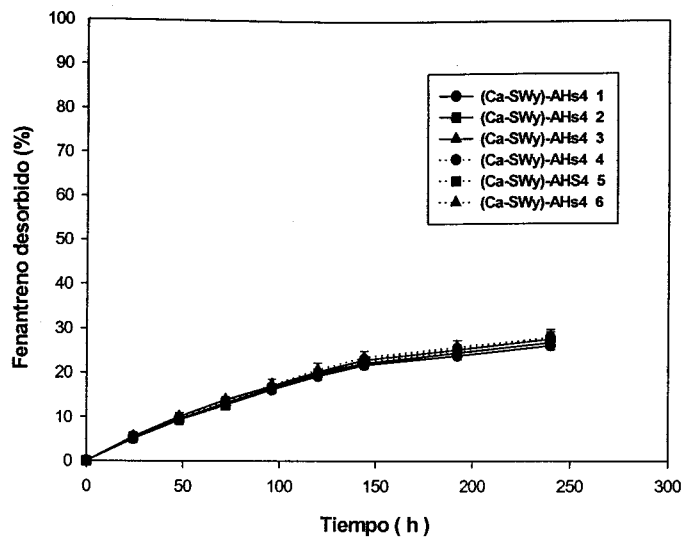


Fig II.2.4.2A: Extracción de la fracción lábil mediante lavados sucesivos con agua a partir del complejo (Ca-SWy)-AHS4.

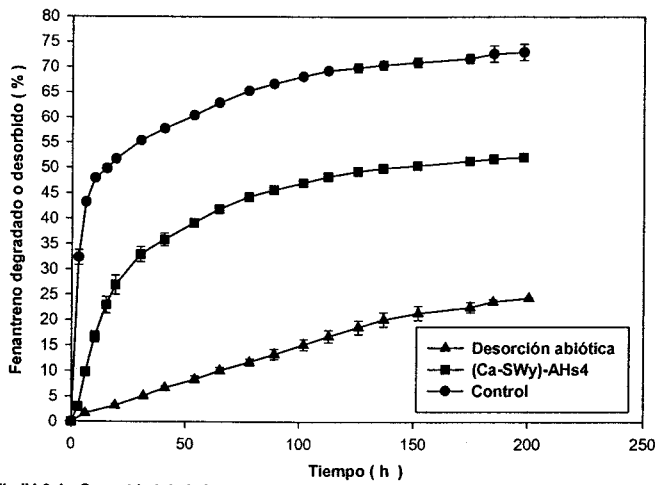


Fig IV-6-1c: Capacidad de la bacteria *Clavibacter xyli* S1 para degradar la fracción de fenantreno resistente a la desorción en el complejo (Ca-SWy)-AHS4.

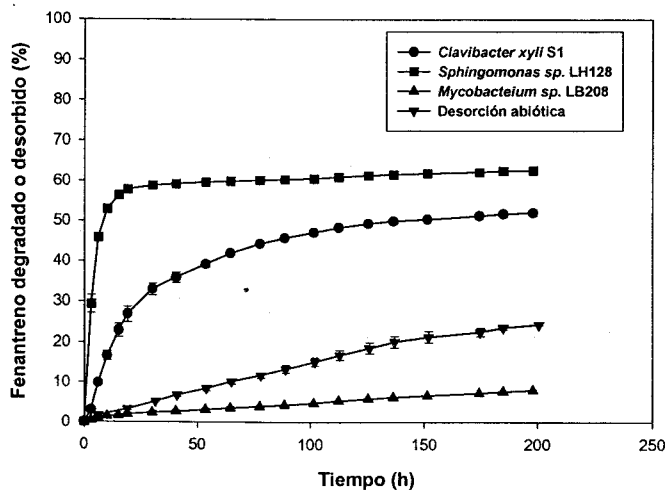


Fig II.2.4.2C: Biodegradación por tres tipos de bacterias de la fracción resistente de fenantreno adsorbido por el complejo (Ca-SWy)-AHS4.

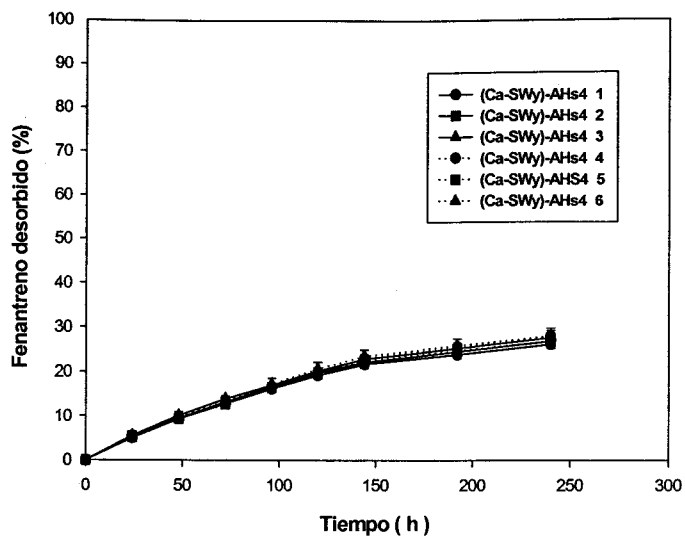


Fig II.2.4.2A: Extracción de la fracción lábil mediante lavados sucesivos con agua a partir del complejo (Ca-SWy)-AHs4.

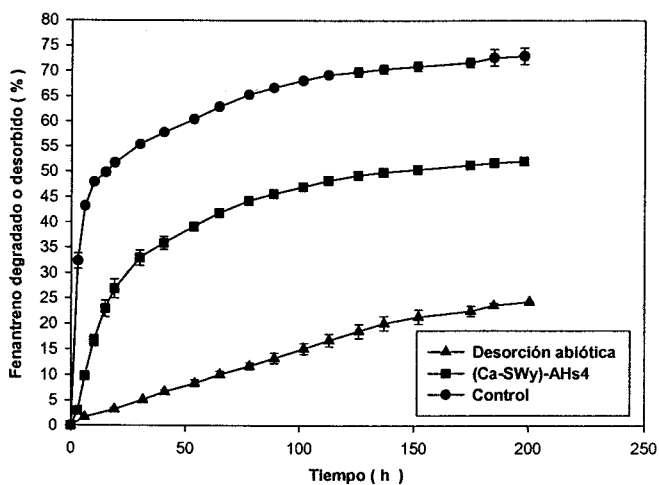


Fig IV-6-1c: Capacidad de la bacteria *Clavibacter xyli* S1 para degradar la fracción de fenantreno resistente a la desorción en el complejo (Ca-SWy)-AHs4.

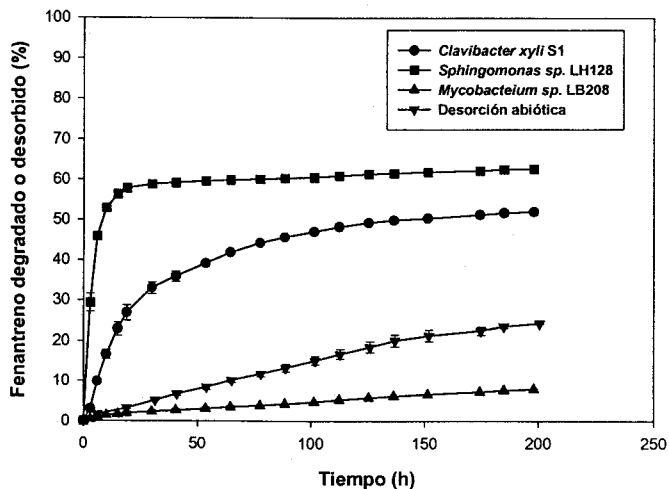


Fig II.2.4.2C: Biodegradación por tres tipos de bacterias de la fracción resistente de fenantreno adsorbido por el complejo (Ca-SWy)-AHs4.

Con concentraciones de arcilla a 5 g/l y a 10 g/l se observó un efecto estimulante de la arcilla a nivel de tasa y de amplitud de mineralización con respecto al control. Dichos resultados revelan que existe una concentración límite de arcilla, por encima de la cual la respuesta de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* en presencia de la arcilla es similar (Fig. II.2.1.1.1).

### II.2.1.1.2/ Efecto de los ácidos fulvicos en solución.

El ácido fúlvico disuelto (AFr) originó a 10  $\mu\text{g/ml}$  una ligera estimulación de la tasa de mineralización y pero no tuvo efecto sobre la amplitud (Fig. II.2.1.1.2). En cambio, a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ , la estimulación fué pronunciada a nivel de la velocidad de mineralización (Tabla II.2.1.1.2).

**Tabla II.2.1.1.2:** Efecto de distintos componentes del suelo sobre la biodegradación de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  de fenantreno.

Tratamiento	[Sorbentes] (g/l)	Tasa (%/h)	Amplitud (%)
Control	0	0.168 $\pm$ 0.04	10.55 $\pm$ 1.997
AFr1	0.01	0.177 $\pm$ 0.056	10.34 $\pm$ 3.226
AFr3	0.1	0.332 $\pm$ 0.189	14.74 $\pm$ 0.075
(Ca-SWy)-AFr1	1	0.620 $\pm$ 0.042	16.13 $\pm$ 0.135
(Ca-SWy)-AFr1	10	1.429 $\pm$ 0.689	37.30 $\pm$ 11.56

### II.2.1.1.3. Efecto de los complejos arcillo-fulvicos

Se realizaron experimentos con partículas de arcilla a los que previamente se había adsorbido ácidos fúlvicos. Estas partículas o complejos se obtuvieron tras equilibrar soluciones de ácido fúlvico con la arcilla Ca-SWy (1g/l) y descartar por centrifugación el ácido fúlvico no adsorbido (ver Materiales y Métodos). De esta forma, se obtuvieron los complejos (Ca-SWy)-AFr2 (concentración inicial de ácido fúlvico, 50  $\mu\text{g/ml}$ ) y (Ca-SWy)-AFr3 (100  $\mu\text{g/ml}$ ). En ambos casos, se observó que la presencia de los complejos estimuló la transformación de fenantreno (tabla II.2.1.1.3), tanto en cuanto a la tasa como a la amplitud de mineralización (Fig. II.2.1.1.3A).

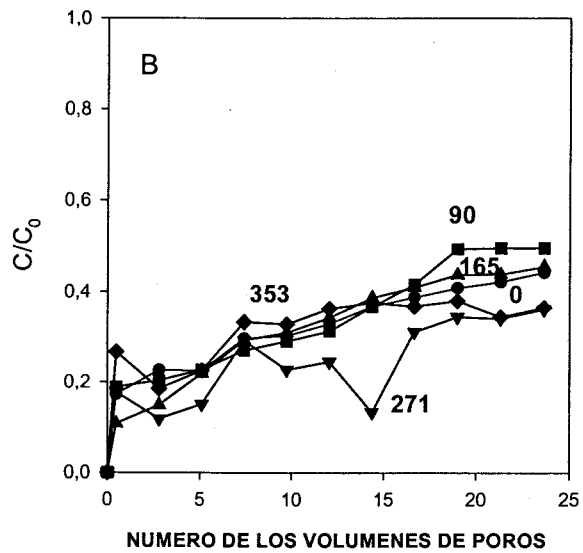
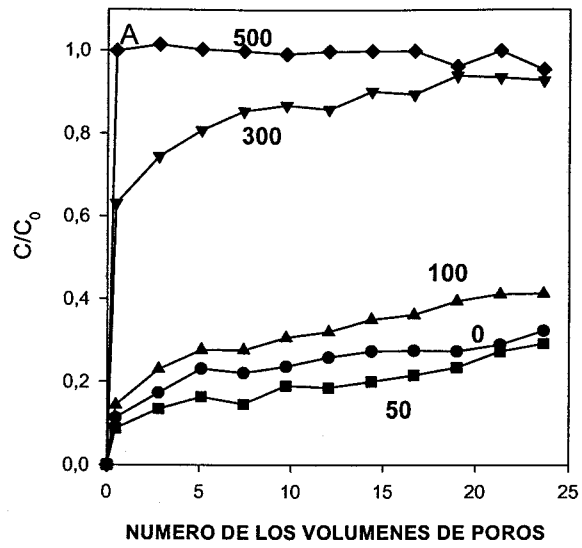


Fig. II.3.6A: Efecto del Triton X-100 sobre el transporte bacteriano a través suelo. A, *Mycobacterium* sp. LB208; B, *Sphingomonas* sp. LB126. Los numeros se refieren a la concentración del surfactante en µg/ml.

Con el objetivo de ver si la presencia de materia orgánica disuelta de la etapa de centrifugación previa a la obtención de los complejos afectaba la estimulación, se añadió el complejo (Ca-SWy)-AFr3 (C 100 $\mu$ g/ml) directamente a los matraces, sin centrifugación. En este caso (Fig. II.2.1.1.3 B) se observó una cierta disminución de la tasa y de la amplitud de mineralización, en comparación con el mismo complejo usado después de la etapa de centrifugación (tabla II.2.1.1.3).

El aumento de la concentración del ácido fúlvico equilibrado con la arcilla hasta 1 g/l ((Ca-SWy)-AFr1) provocó una estimulación de la tasa de mineralización en comparación con los complejos anteriores (tabla II.2.1.1.2). Esta estimulación fue mucho mayor al aumentar la concentración de sólidos en suspensión a 10 g/l (Fig. II.2.1.1.3 C). El aumento de nuevo de la concentración del ácido fúlvico equilibrado con la arcilla hasta 10 g/l ((Ca-SWy)-AFr4) provocó una estimulación de la tasa y de la

**Tabla II.2.1.1.3:** Efecto de la concentración del ácido fúlvico adsorbido en el complejo (Ca-SWy)-AFr sobre la biodegradación de 0.1  $\mu$ g/ml de fenantreno.

Tratamiento	[Sorbentes] (g/l)	Tasa (%/h)	Amplitud (%)
Control	0	0.137 $\pm$ 0.033	12.47 $\pm$ 4.609
(Ca-SWy)-AFr2	1	0.380 $\pm$ 0.067	19.92 $\pm$ 2.63
(Ca-SWy)-AFr3	1	0.300 $\pm$ 0.194	24.19 $\pm$ 3.009
(Ca-SWy)-AFr3 (Sin centrifugar)	1	0.267 $\pm$ 0.238	19.61 $\pm$ 4.713

amplitud de mineralización en comparación con el complejo (Ca-SWy)-AFr1 a una concentración de 1g/l. En comparación con el control, se observó un incremento pronunciado de la tasa de mineralización (tabla II.2.1.1.1).. Esta estimulación también ocurrió a concentraciones mayores de complejo (2.5 y 5 g/l), aunque a la concentración máxima probada (10 g/l) no sólo esta estimulación desapareció, sino que hubo una clara inhibición (Fig. II.2.1.1.3 D).

### II.2.1.2. Biodegradación de fenantreno a una concentración de 1 $\mu$ g/ml

#### II.2.1-2-1/ Efecto de las arcillas.

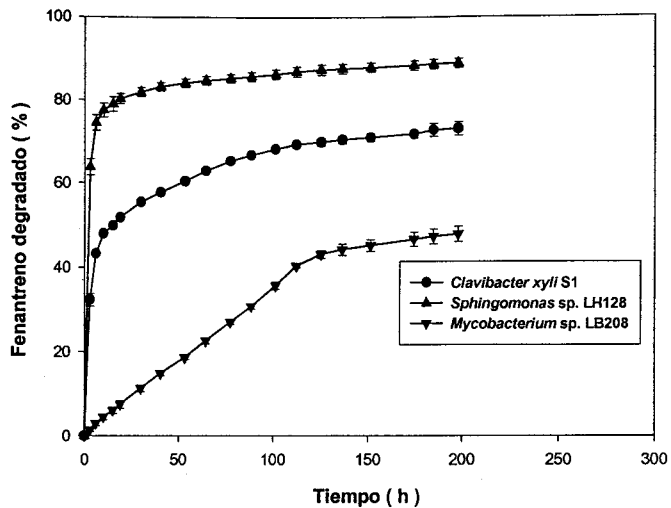


Fig. II.2.4.2D: Comportamiento de tres bacterias a respecto a la degradación de fenantreno disuelto.

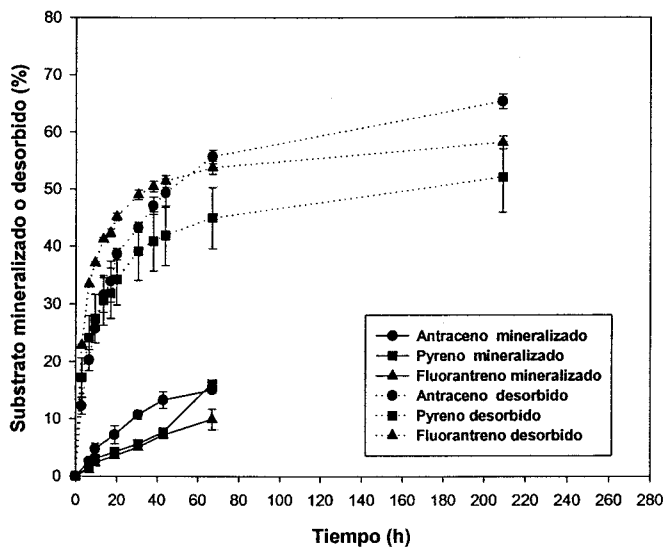


Fig. II.2.4.2E: Mineralización y desorción abiótica de la fracción resistente a la desorción adsorbida al complejo (Ca-SWy)-AHs4 de tres HPAs.

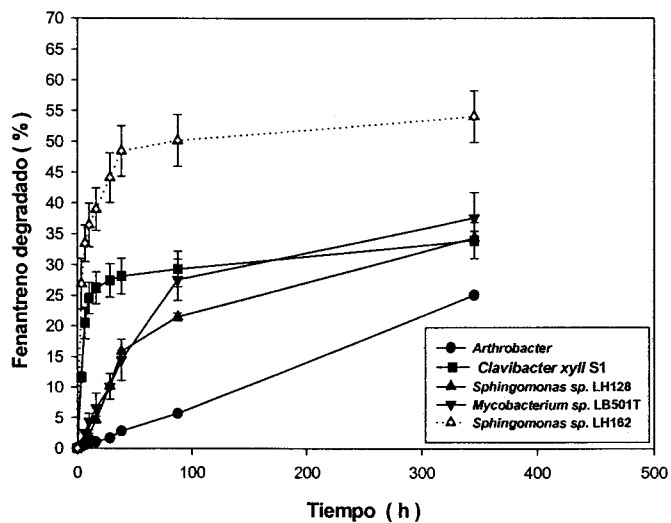


Fig II.2.4.3A: Biodegradación de fenantreno disuelto por las cinco bacterias.

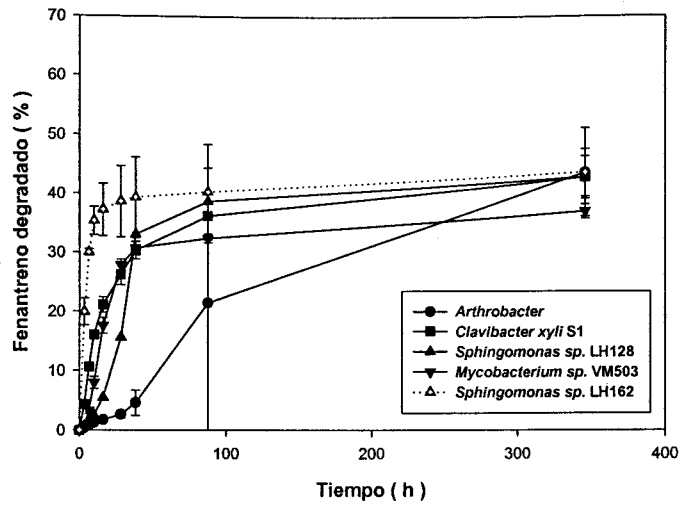


Fig II.2.4.3B: Biodegradación de fenantreno de la fracción lábil de fenantreno adsorbido al (Ca-SWy)-AHs5 por las cinco bacterias.

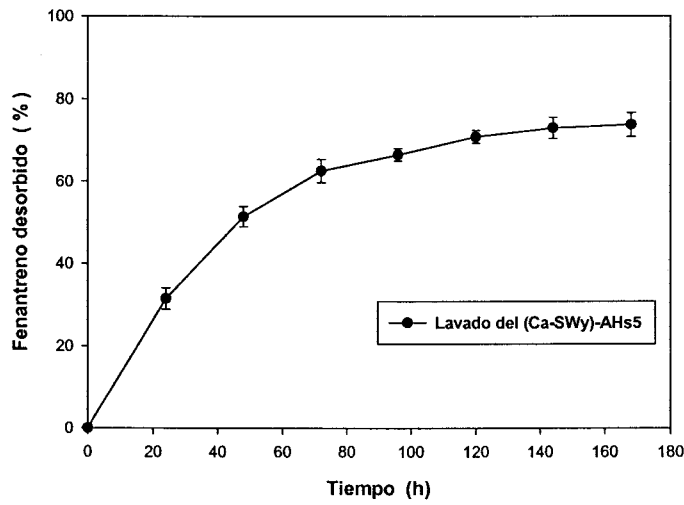


Fig II.2.4.3C: Cinética de desorción de fenantreno a partir del complejo (Ca-SWy)-AHs5.

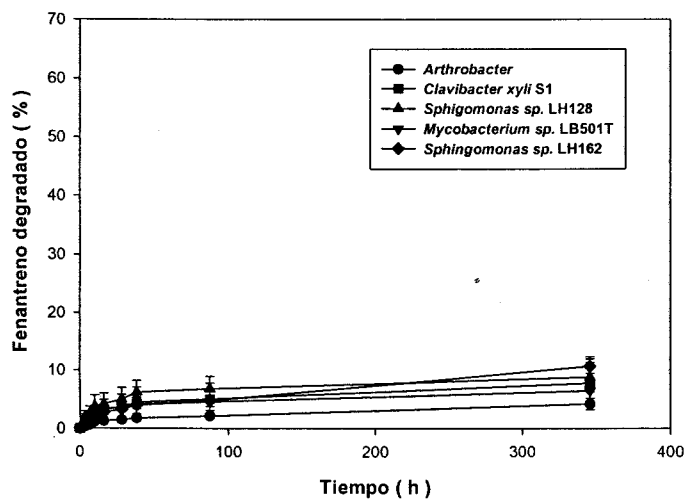


Fig II.2.4.3D: Degradación de fenantreno resistente a la desorción en el complejo (Ca-SWy)-AHs5 por las cinco bacterias.



El efecto de las suspensiones de arcilla a distintas concentraciones (0, 1, 5 y 10 g/l) consistió en una estimulación progresiva y casi proporcional a la concentración de arcilla utilizada. Esta estimulación se tradujo en un aumento de la tasa ( $0.131 \pm 0.028$ ,  $0.276 \pm 0.003$ ,  $0.943 \pm 0.182$  y  $1.493 \pm 0.312$  %/h, respectivamente) pero no tanto de la amplitud de mineralización ( $11.20 \pm 0.365$ ,  $16.63 \pm 2.246$ ,  $32.00 \pm 3.682$  y  $31.78 \pm 2.464$  %, respectivamente) (Fig. II.2.1.2.1). La estimulación observada fué por tanto mayor que la que se dio a  $0.1 \mu\text{g/ml}$  de fenantreno.

**Tabla II.2.1.2.1:** Efecto del ácido fúlvico adsorbido en el complejo (Ca-SWy)-AFr sobre la disponibilidad de fenantreno en presencia de una alta concentración del sustrato

Tratamiento	[Sorbentes] (g/l)	Tasa (%/h)	Amplitud (%)
Ca-SWy	0	$0.131 \pm 0.028$	$11.20 \pm 0.365$
Ca-SWy	1	$0.276 \pm 0.003$	$16.63 \pm 2.246$
Ca-SWy	5	$0.943 \pm 0.182$	$32.00 \pm 3.682$
Ca-SWy	10	$1.493 \pm 0.312$	$31.78 \pm 2.464$
(Ca-SWy)-AFr4	1	$0.974 \pm 0.013$	$38.92 \pm 0.048$
(Ca-SWy)-AFr4	5	$1.313 \pm 0.139$	$47.30 \pm 0.058$
(Ca-SWy)-AFr4	10	$0.084 \pm 0.001$	$04.42 \pm 2.083$

#### II.2.1.2.2. Efecto de los ácidos fulvicos en solución

El tratamiento AFR1 (ácido fúlvico en solución a una concentración de  $10 \mu\text{g/ml}$ ) indujo una estimulación de la tasa de mineralización ( $0.199 \pm 0.083$  %/h) y amplitud ( $16.51 \pm 2.107$  %) en comparación con el control ( $0.08 \pm 0.042$  %/h y  $9.43 \pm 0.019$  %, respectivamente). Estos resultados reflejan un comportamiento diferente de aquel presentado con  $0.1 \mu\text{g/ml}$  de fenantreno, donde la tasa y amplitud de mineralización no se modificaron significativamente. Esta estimulación también ocurrió a una concentración mayor de ácido fúlvico (AFR3-  $100 \mu\text{g/ml}$ ), aunque la estimulación fue menos acusada (Tabla II.2.1.2.2).

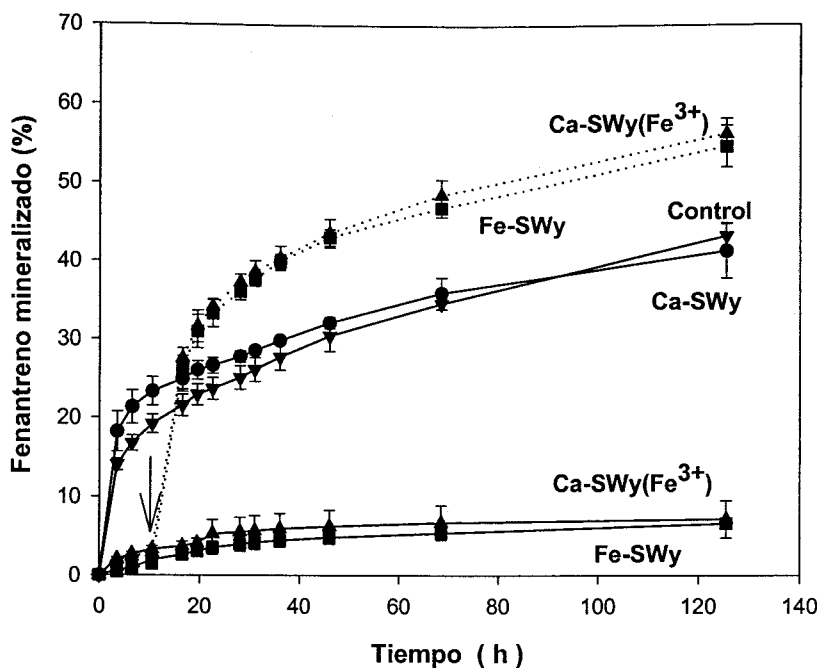


Fig II.2.4.4A: Mineralización de fenantreno adsorbido a Ca-SWy, Ca-SWy(Fe<sup>3+</sup>), Fe-SWy, y en los controles sin sorbentes. Las líneas continuas representan la mineralización del compuesto inicialmente adsorbido, y las líneas discontinuas representan la mineralización después de añadir (indicado por la flecha) el compuesto completamente disuelto en la fase acuosa.

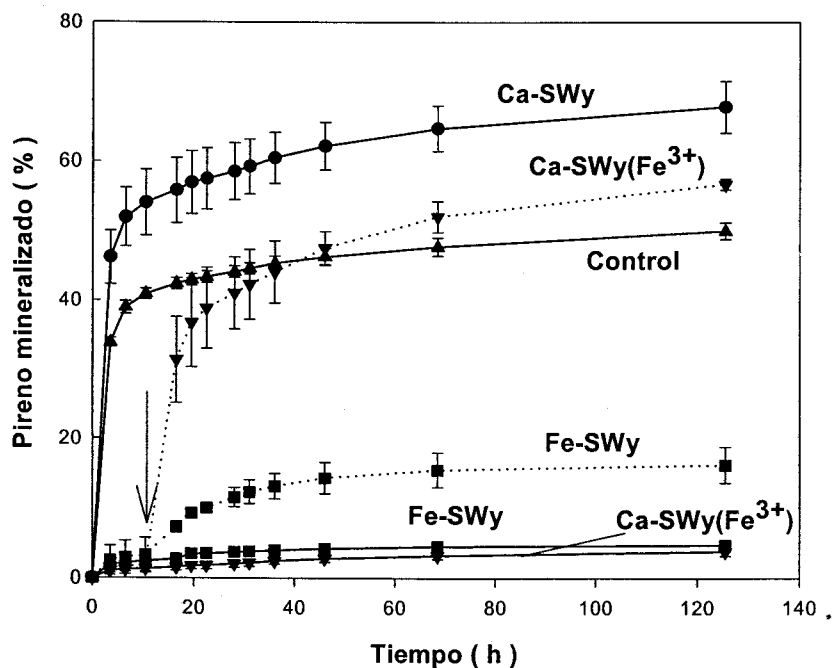


Fig II.2.4.4B: Mineralización de pireno adsorbido a Ca-SWy, Ca-SWy(Fe<sup>3+</sup>), Fe-SWy, y en los controles sin sorbentes. Las líneas continuas representan la mineralización del compuesto inicialmente adsorbido, y las líneas discontinuas representan la mineralización después de añadir (indicado por la flecha) el compuesto completamente disuelto en la fase acuosa.

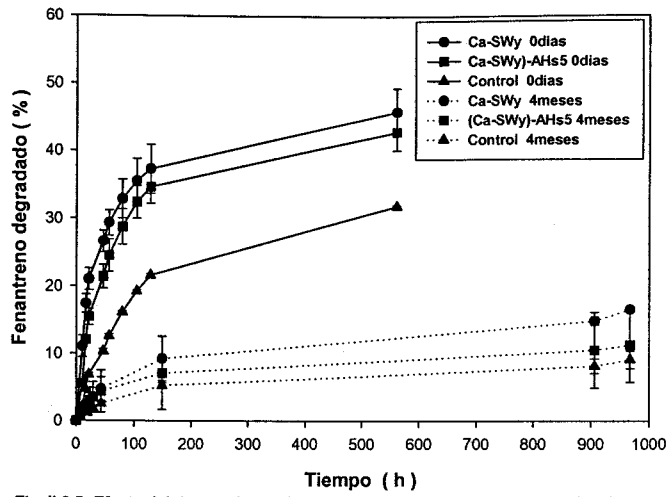


Fig. II.2.5: Efecto del tiempo de residencia de fenantreno añadido como solución acuosa o adorbido a arcilla o a complejos arcillo-húmicos en el suelo sobre su biodegradación.

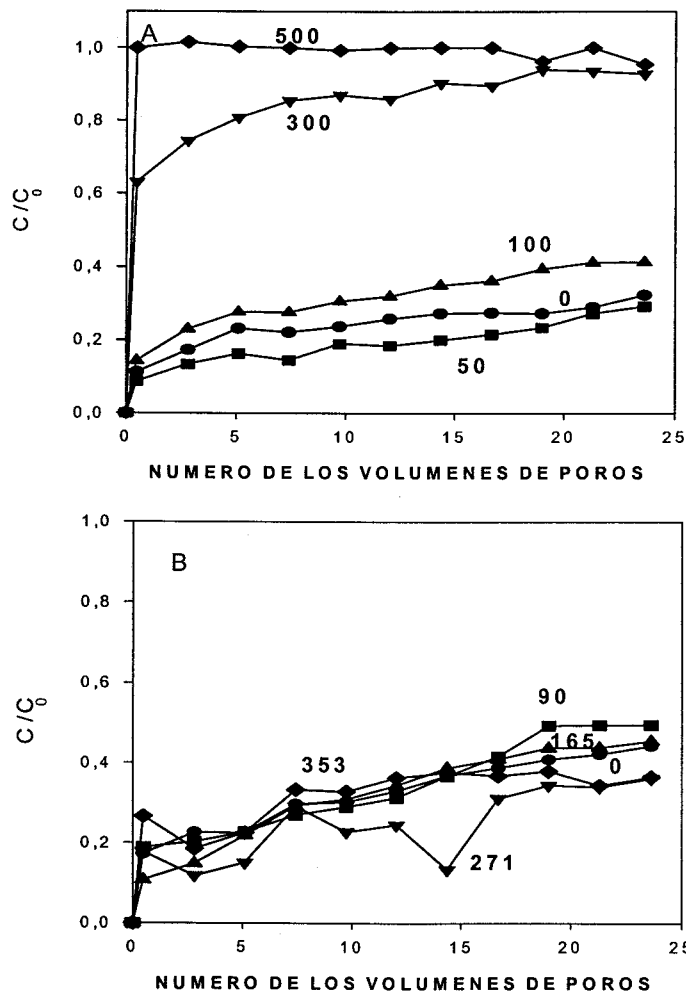


Fig. II.3.6A: Efecto de Triton X-100 sobre el transporte bacteriano a través del suelo. A, *Mycobacterium* sp. LB208; B, *Sphingomonas* sp. LB126. Los numeros indican la concentración del tensioactivo en µg/ml.

**Tabla II.2.1.2.2:** Efecto de la concentración del ácido fúlvico en suspensión y adsorbido al complejo (Ca-SWy)-AFr sobre la disponibilidad de fenantreno en presencia de una alta concentración del sustrato.

Tratamiento	[Sorbentes] (g/l)	Tasa (%/h)	Amplitud (%)
Control	0	0.080 ± 0.042	09.43 ± 0.019
AFr1	0.01	0.199 ± 0.083	16.51 ± 2.107
AFr3	0.1	0.141 ± 0.153	17.19 ± 7.687
(Ca-SWy)-AFr1	1	1.824 ± 0.333	47.36 ± 2.804
(Ca-SWy)-AFr1	10	2.068	47.16

### II.2.1.2.3. Efecto de los complejos arcillo-fulvicos

De igual forma que con 0.1 µg/ml de fenantreno (apartado II.2.1.1.3), se estudió la influencia sobre la biodegradación de complejos de arcilla y ácidos fúlvicos. La presenciade estos complejos en suspensión indujo, como en aquel caso, una clara

**Tabla II.2.1.2.3:** Efecto de la concentración del ácido fúlvico adsorbido al complejo (Ca-SWy)-AFr sobre la disponibilidad de fenantreno en presencia de una alta concentración del sustrato.

Tratamiento	[Sorbentes] (g/l)	Tasa (%/h)	Amplitud (%)
Control	0	0.153 ± 0.056	11.92 ± 2.121
(Ca-SWy)-AFr2	1	0.426 ± 0.083	17.83 ± 2.602
(Ca-SWy)-AFr3	1	0.377 ± 0.221	17.70 ± 2.835
(Ca-SWy)-AFr3	10	0.791 ± 0.017	27.72 ± 0.389
(Ca-SWy)-AFr3 (Sin centrifugar)	1	0.313 ± 0.209	16.45 ± 2.652

estimulación de la biodegradación en los distintos tratamientos, que incluían diferentes entidades de ácido fúlvico adsorbido a las arcillas y diferentes concentraciones de

sólidos en suspensiones (Tabla II.2.1.2.1 , II.2.1.2.2 y II.2.1.2.3) y (Fig. II.2.1.2.3 A, B , C, E). De la misma manera el efecto inhibitorio de complejo (Ca-SWy)-AFr4 a la concentración 10g/l se observó a esta concentración.

**Tabla II.2.1.2.3:** Efecto de la concentración del ácido fúlvico adsorbido al complejo (Ca-SWy)-AFr sobre la disponibilidad de fenantreno en presencia de una alta concentración del sustrato.

Tratamiento	[Sorbentes] (g/l)	Tasa (%/h)	Amplitud (%)
Control	0	0.153 ± 0.056	11.92 ± 2.121
(Ca-SWy)-AFr2	1	0.426 ± 0.083	17.83 ± 2.602
(Ca-SWy)-AFr3	1	0.377 ± 0.221	17.70 ± 2.835
(Ca-SWy)-AFr3	10	0.791 ± 0.017	27.72 ± 0.389
(Ca-SWy)-AFr3 (Sin centrifugar)	1	0.313 ± 0.209	16.45 ± 2.652

### II.2.2- Efecto del contenido en materia orgánica sobre la biodegradación de fenantreno adsorbido a complejos arcillo-húmico

Las tasas de mineralización de fenantreno adsorbido a las partículas de arcilla y a los complejos (Ca-SWy)-AHs1, (Ca-SWy)-AHs2 y (Ca-SWy)-AHs3 y de fenantreno en el control fueron 8.557±0.087, 8.632±0.059, 9.225±0.028, 9.871 y 10.726±0.219 %/h respectivamente, mientras que las amplitudes de mineralización fueron 50.13±0.418, 49.054±2.853, 50.113±1.703, 57.1 y 61.464±0.55 %, respectivamente. El aspecto de las curvas de mineralización corresponde con una cinética de primer orden, con una tasa inicial de degradación del sustrato alta durante las primeras horas, lo que corresponde a la degradación de la fracción labil seguida por una fase de degradación muy lenta (Fig. II.2.2).

### II.2.3- Modelización de las curvas de mineralización de fenantreno inicialmente adsorbido a componentes modelo del suelo

Con el objetivo de estimar la biodisponibilidad de fenantreno adsorbido a las partículas modelo de suelo, se realizaron una serie de experimentos de biodegradación análogos a los descritos anteriormente, con cuyos resultados se aplicó un modelo matemático que tiene en cuenta la desorción del sustrato (ver materiales y métodos). Estos experimentos se realizaron con sorbentes modelo que ya habían sido estudiados (en la sección II.1.1.1) en cuanto al contenido en materia orgánica y el proceso de adsorción-desorción de HPAs. Los ensayos se realizaron en suspensiones acuosas equilibradas que contenían diferentes proporciones solución:sorbente, y con controles sin sorbentes. En este caso, se utilizaron suspensiones de la bacteria *Clavibacter xyli*.

La proporcionalidad directa entre la concentración acuosa y la tasa de mineralización inicial en ausencia de sorbente se determinó mediante la medida de mineralización de fenantreno en un rango de concentraciones que incluían aquellas que se habían usado en las suspensiones con sorbentes. El valor más alto de este rango fue de un 1  $\mu\text{g/ml}$ . Las tasas iniciales de mineralización se calcularon por regresión lineal a partir de los puntos de cada curva que dan la tasa máxima. Los resultados muestran una correlación estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ) entre la concentración acuosa y las tasas de mineralización, con un coeficiente de correlación de 0,956 (Fig. II.2.3). La mineralización de fenantreno en las suspensiones equilibradas de las partículas de arcilla con o sin fracciones húmicas fue rápida y ocurrió sin fase de aclimatación (Fig. II.2.3a). El aspecto de las curvas de mineralización corresponde a una cinética de primer orden, con altas tasas iniciales de producción del  $\text{CO}_2$  durante las primeras 30 horas, seguidas por tasas de mineralización progresivamente más lentas. La cantidad final de sustrato mineralizado osciló entre 30 y 60%. Estos porcentajes son comparables a aquellos encontrados en otros estudios sobre la mineralización de compuestos hidrófobos. Las pérdidas detectadas en los controles que son atribuidas a la volatilización o a la adsorción a las paredes de los tubos de vidrio pueden ser consideradas como una estimación máxima, porque en presencia de la bacteria, tales pérdidas eran probablemente mínimas debido a la rápida biodegradación observada. Se puede también notar que la fase inicial de mineralización (la más importante en nuestro estudio) ocurre durante las 30 primeras horas (Fig. II.2.3a, A, B, C, D, E y F), un intervalo de tiempo similar a aquel usado para el control de las pérdidas.

Las tasas de mineralización se han calculado a partir de los valores de  $v_1$  obtenidos a partir de la regresión no lineal de las curvas de mineralización del modelo de primer orden de degradación – desorción (ecuación 1). Al principio, se aplicó a los

datos un modelo más sencillo de primer orden (ecuación 2). Sin embargo, el uso de este modelo condujo a desviaciones significativamente mayores con respecto a los valores experimentales que con el modelo degradación - desorción. Estas mayores desviaciones se tradujeron en unos mayores valores de la suma de los cuadrados residuales (RSS) calculados con la Ecuación 2. Como ejemplo de la buena adaptación de nuestros resultados a la ecuación 1, se representan en la Fig. II.2.3b los resultados de los experimentos de mineralización de fenantreno realizados a una concentración de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  en presencia de 1 g/l de los complejos arcillo-húmicos, y las curvas ajustadas a ambos modelos. La ecuación 1 se utilizó, por tanto, para calcular las tasas iniciales de mineralización.

Los parámetros estimados para los experimentos de mineralización que figuran en la Fig. II.2.3a están presentados en la tabla II.2.3, además de la mineralización máxima (amplitud) obtenida directamente a partir del último punto de cada curva. Las comparaciones estadísticas de las  $v_1$  estimadas confirman que, bajo estas condiciones, la presencia de los sorbentes no tuvo un efecto negativo sobre la mineralización de fenantreno. En algunos casos, las tasas de mineralización en presencia de arcillas y de complejos arcillo-fúlvicos son mayores que aquellas del control sin sorbentes a una concentración inicial de fenantreno de 0.1  $\mu\text{g/ml}$ . La estimulación también se reflejó en unos valores altos de  $v_1/k$ , indicando un aumento en la accesibilidad del sustrato que está relacionado con la presencia de estos sorbentes. Estos efectos estimulantes no se observaron a la misma escala cuando la concentración inicial de fenantreno era 1  $\mu\text{g/ml}$ , tanto con los complejos arcillo-fúlvicos como con la arcilla (Tabla II.2.3). Las tasas de mineralización inicial en presencia de los complejos arcillo-húmicos no fueron diferentes de las del control sin sorbente a ambas concentraciones. La correlación observada entre las tasas de mineralización inicial y las concentraciones de fenantreno en medio acuoso en ausencia de sorbente no existió en las suspensiones con sorbentes cuando la concentración de fenantreno inicial en el sistema fue 0.1  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. II.2.3c) y (Fig. II.2.3d) ó 1  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. II.2.3e) y (Fig. II.2.3f). Se concluye que, bajo estas condiciones, las bacterias experimentaron una concentración diferente a la de la fase acuosa.

**Tabla II.2.3:** Parametros estimados con el modelo de degradación-desorción y amplitudes de mineralización de fenantreno adsorbido a componentes modelo del suelo.

[sorbente] <sup>b</sup>	[Fenan] <sup>c</sup>	V <sub>1</sub> <sup>d</sup>	V <sub>2</sub> <sup>e</sup>	k <sup>f</sup>	RSS <sup>g</sup>	V <sub>1</sub> /k <sup>h</sup>	Ampli <sup>i</sup>
SWy							
0	0.1	3.320 ± 0.042	0.115 ± 0.007	0.162 ± 0.030	4.37	20.4	38.30
1	0.1	4.075 ± 0.332	0.155 ± 0.020	0.128 ± 0.040	17.10	31.8	56.20
5	0.1	4.455 ± 0.035	0.160 ± 0.000	0.189 ± 0.010	22.87	23.6	47.10
10	0.1	2.350 ± 0.876	0.100 ± 0.010	0.135 ± 0.060	10.96	17.4	32.60
0	1	2.448 ± 0.773	0.105 ± 0.023	0.136 ± 0.037	1.15	18.0	33.25
1	1	3.198 ± 0.024	0.127 ± 0.027	0.170 ± 0.044	1.31	18.8	37.44
5	1	2.527 ± 0.401	0.128 ± 0.018	0.117 ± 0.044	1.33	21.6	41.09
10	1	2.026 ± 0.367	0.142 ± 0.027	0.092 ± 0.023	5.84	22.0	42.27
SWy-AHt							
0	0.1	3.315 ± 0.042	0.115 ± 0.009	0.162 ± 0.030	4.37	20.5	38.30
1	0.1	3.247 ± 0.403	0.141 ± 0.007	0.167 ± 0.020	13.72	19.4	40.20
2,5	0.1	3.231 ± 0.581	0.120 ± 0.027	0.189 ± 0.014	2.17	17.8	33.54
5	0.1	3.191 ± 0.347	0.117 ± 0.017	0.165 ± 0.020	8.02	19.3	36.80
10	0.1	3.529 ± 0.196	0.084 ± 0.004	0.158 ± 0.030	4.33	22.3	35.20
0	1	2.448 ± 0.773	0.105 ± 0.023	0.136 ± 0.037	1.15	18	33.25
1	1	2.165 ± 0.402	0.106 ± 0.015	0.109 ± 0.032	2.05	19.9	35.94
5	1	2.440 ± 0.481	0.116 ± 0.012	0.137 ± 0.056	1.24	17.8	35.67
10	1	2.569 ± 0.325	0.089 ± 0.01	0.132 ± 0.033	1.87	19.5	32.81
SWy-AFt							
0	0.1	1.964 ± 0.425	0.098 ± 0.002	0.100 ± 0.020	2.19	19.6	34.30
1	0.1	3.074 ± 0.874	0.077 ± 0.017	0.110 ± 0.040	0.92	27.9	40.38
2,5	0.1	2.593 ± 0.008	0.082 ± 0.006	0.109 ± 0.011	1.14	23.8	36.41
5	0.1	3.106 ± 0.010	0.067 ± 0.004	0.108 ± 0.010	1.55	28.7	39.29
10	0.1	3.297 ± 0.091	0.068 ± 0.001	0.101 ± 0.010	2.00	32.6	42.02
0	1	1.947 ± 0.040	0.077 ± 0.003	0.086 ± 0.004	7.70	22.6	35.15
1	1	2.043 ± 0.029	0.083 ± 0.006	0.090 ± 0.010	5.60	22.7	36.02
5	1	1.982 ± 0.883	0.088 ± 0.023	0.100 ± 0.030	5.04	19.8	38.05
10	1	2.458 ± 0.607	0.080 ± 0.006	0.095 ± 0.030	6.78	25.9	38.51

(a) Los valores están presentados como las medias ±DS.



- (b) Las concentraciones del sorbente en g/l. SWy-AHt = complejos arcillo-ácido humico; SWy-AFt = complejos arcillo-ácido fulvico.
- (c) Las concentraciones inicial de fenantreno en  $\mu\text{g/ml}$ .
- (d) La tasa inicial de mineralización en porcentaje/h.
- (e) La tasa de mineralización de fenantreno desorriendo lentamente en porcentaje/h.
- (f) La tasa de la contante de primer orden en 1/h.
- (g) La suma de los cuadrados residual de la curva no linear adaptada.
- (h) Los valores predicados por la amplitud de mineralización después de la fase exponencial en %.
- (i) Las amplitudes de mineralización de fenantreno medidas después de un periodo experimental en %.
- (j) Más grande estadísticamente que el control sin sorbente a  $p = 0.10$ .
- (k) Más grande estadísticamente que el control sin sorbente a  $p = 0.05$ .
- (L) Sin diferencia estadística con el control sin sorbente a  $p = 0.05$ .

## II.2.4. Biodegradación de la fracción resistente a la desorción

Las estimaciones de  $v_2$  detectadas por el modelo fueron menos de diez veces los valores correspondientes a  $v_1$  (Tabla II.2.3). Esto sugiere una pequeña contribución del compuesto de se desorbía lentamente a la producción total de  $\text{CO}_2$  durante los estados iniciales de la transformación. Debe señalarse que las estimaciones de  $v_2$  en los controles sin sorbente fueron mayores que cero, como ha sido observado previamente (Gerin y Boyd, 1992), siendo explicado como una limitación del modelo para distinguir entre la biodegradación del substrato liberado lentamente y el ruido experimental. Otra limitación consistió en las desviaciones observadas en los controles sin sorbente entre los valores de  $v_1/k$  y las amplitudes finales de mineralización (Tabla II.2.3). No obstante, este modelo sirvió como instrumento empírico útil para calcular las tasas iniciales de mineralización. Las tasas de mineralización de fenantreno resistente a la desorción pudieron estimarse con más precisión después de lavar toda la fracción labíl mediante extracciones acuosas sucesivas.

### II.2.4.1. Biodegradación de fenantreno con partículas con valores moderados de $f_{oc}$

Los experimentos con la fracción resistente se realizaron inicialmente con la arcilla (Fig. II.2.4.1a), los complejos arcillo-fulvicos (Fig. II.2.4.1b) y los complejos arcillo-húmicos (Fig. II.2.4.1c). Estos últimos se estudiaron en detalle debido a la gran fracción de fenantreno resistente a la desorción originado en los experimentos de desorción. El fenantreno en esta forma fué mineralizado lentamente y de forma lineal (Fig. II.2.4.1c). La linealidad se mantuvo durante más de 540 horas. La mineralización en los controles sin sorbentes con el fenantreno disuelto fué rápida y extensiva,

siguiendo una cinética de primer orden. Las tasas de mineralización de fenantreno resistente a la desorción presente en 50 y 500 mg de sorbente han sido  $0,012 \pm 0,006$  y  $0,016 \pm 0,003$  ng/ml/h, respectivamente. En cambio, en los controles correspondientes, las tasas iniciales de mineralización fueron  $1.68 \pm 0.39$  y  $5.23 \pm 3.95$  ng/ml/h, respectivamente. Una fracción bastante importante del sustrato resistente a la desorción resultó también totalmente resistente a la biodegradación. De hecho, la amplitud final de mineralización después de 1020 h fué  $3.3 \pm 0.6$  y  $3.7 \pm 0.8$  % con 50 y 500 mg de sorbente, respectivamente. La baja biodegradabilidad del compuesto

**Tabla II.2.4.1A:** Biodegradación de la fracción resistente a la desorción obtenida mediante la desorción en sistema batch.

	Antes de 500 horas		Después de 500 horas	
	Amplitud de degradación(%)	Tasa de degradación(%/h)	Amplitud de Degradación(%)	Tasa de Degradación(%/h)
Ca-SWy	$4.37 \pm 0.538$	$0.012 \pm 0.000$	$15.11 \pm 0.412$	$0.031 \pm 0.003$
(Ca-SWy)-AHs1	$5.42 \pm 0.563$	$0.027 \pm 0.033$	$16.87 \pm 1.453$	$0.030 \pm 0.000$
(Ca-SWy)-AHs2	$4.05 \pm 0.518$	$0.010 \pm 0.003$	$13.69 \pm 0.152$	$0.027 \pm 0.000$
(Ca-SWy)-AHs3	$3.58 \pm 1.013$	$0.015 \pm 0.001$	$12.76 \pm 1.364$	$0.028 \pm 0.001$
Control	$17.69 \pm 0.362$	$0.626 \pm 0.012$	$35.72 \pm 0.523$	$0.055 \pm 0.001$

resistente a la desorción está de acuerdo con su resistencia a la extracción con solventes orgánicos. La extracción secuencial con n-butanol y diclorometano permitió la recuperación de  $9.6 \pm 2.7$  y de  $49.0 \pm 1.2$  % de fenantreno resistente a la desorción presente en 50 y 500 mg de los complejos, respectivamente. Estos resultados indican que la bacteria *Clavibacter xyli* S1 era incapaz de degradar significativamente la fracción de fenantreno resistente a la desorción presente en los tres sorbentes estudiados.

La mineralización de la fracción de fenantreno resistente a la desorción, teniendo en cuenta que la cantidad de fenantreno resistente a la desorción está considerada como el 100 % de fenantreno adsorbido, en las distintas muestras obtenidas en otro

experimento de desorción realizado en sistema batch (sección II.1.1.3) fué también muy lenta durante las 500 primeras horas, en comparación con el control con todo el substrato disuelto en el medio de cultivo a una concentración parecida de aquella resistente a la desorción (tabla II.2.4.1A). Para confirmar que la baja tasa de mineralización no era debida a problemas de toxicidad en la suspensión después de 500h se añadió un nuevo inóculo bacteriano con  $3.4 \cdot 10^8$  células por mililitro de la bacteria *Clavibacter xyli* S1. Se observó una ligera subida de la mineralización de

**Tabla II.2.4.1B:** Degradación de la fracción resistente a la desorción de fenantreno presente a las muestras obtenidas mediante desorción en columnas.

	Tasa de degradación (%/h)	Amplitud de degradación (%)
Ca-SWy	$0.195 \pm 0.126$	$08.79 \pm 2.524$ (0.50)
(Ca-SWy)-AHs1	$0.134 \pm 0.048$	$07.00 \pm 1.794$ (0.63)
(Ca-SWy)-AHs2	$0.135 \pm 0.008$	$07.34 \pm 0.601$ (0.47)
(Ca-SWy)-AHs3	0.154	07.54 (0.30)
NAPL	$0.693 \pm 0.011$	$26.90 \pm 0.209$ (0.07)
Control	$0.260 \pm 0.155$	$14.60 \pm 10.334$ (1.07)
(Ca-SWy)-AH'	$0.083 \pm 0.010$	$04.75 \pm 0.217$ (0.71)
Arena	$0.181 \pm 0.047$	$11.54 \pm 1.501$ (2.82)

Los valores entre paréntesis se obtuvieron del experimento realizado durante las primeras 188 h.

fenantreno en todos los casos. Esto podría explicarse por una posible desorción por difusión del substrato a partir de los distintos sorbentes. En el control se produjo una degradación importante, lo que indica el buen estado fisiológico de las bacterias (Tabla II.2.4.1A).

De forma análoga a los experimentos de mineralización con la fracción resistente obtenida por desorción en batch, se estudió la mineralización de fenantreno presente en las distintas muestras obtenidas del experimento de desorción realizado en las columnas (Sección II.1.1.4). Estos experimentos se realizaron en matraces de 250ml, donde se transfirieron el contenido de las columnas. La inoculación se realizó inicialmente en fase sólida. Como resultado, se observó una cinética de mineralización

lineal con los distintos sorbentes y del control durante 188 horas (tabla II.2.4.1B). En la segunda fase de este experimento se trabajó en suspensión, añadiendo 50 ml de medio de cultivo conteniendo un inóculo de  $2 \cdot 10^8$  células por mililitro, y se puso el conjunto en agitación.

Como resultado se constató una estimulación importante de la degradación de fenantreno secuestrado en el HMN cuya tasa y amplitud de mineralización están presentadas en la (tabla II.2.4.1B). La estimulación observada en los otros sorbentes fue menos pronunciada que en el NAPL. La comparación de la amplitud de mineralización de los distintos sorbentes (arcilla, los complejos arcillo-húmicos y la arena) entre sí tampoco reveló una diferencia significativa.

#### II.2.4.2. Biodegradación de HPA con partículas de alto $f_{oc}$ : (Ca-SWy)-AHs4 ( $f_{oc} = 0.211$ )

También se estudió la biodegradación de fracciones resistentes a la desorción con el complejo (Ca-SWy)-AHs4, que tenía un contenido muy superior en materia orgánica a los anteriores. El resultado de los lavados iniciales reveló una baja capacidad de desorción de fenantreno. En concreto, sólo se desorbió el 26/28 % de fenantreno inicialmente adsorbido, a una tasa de  $0,194 \pm 0.015$  %/h (Fig. II.2.4.2A). Las extracciones de fenantreno adsorbido al complejo (Ca-SWy)-AHs4 con diclorometano recuperaron casi 95 % de la cantidad adsorbida .

La bacteria *Clavibacter xyli* S1 aumentó la tasa de desorción de fenantreno resistente a la desorción presente en el complejo (Ca-SWy)-AHs4 hasta  $1,633 \pm 0.093$  %/h , mientras que la tasa de desorción abiótica de fenantreno bajo las mismas condiciones fue de  $0,161 \pm 0.013$  %/h. La tasa de mineralización en el experimento control con el fenantreno disuelto a la misma concentración, fue  $7,201 \pm 0.066$  %/h . Estos resultados demuestran la gran capacidad de la bacteria *Clavibacter xyli* S1 de estimular la degradación de una fracción bastante importante de fenantreno, lentamente desorbido (Fig. II.2.4.2B).

La tasa de mineralización de fenantreno adsorbido por (Ca-SWy)-AHs4 resistente a la desorción por la bacteria *Sphingomonas sp.* LH128 fue 44.7 veces mayor ( $7.201 \pm 0.066$  %/h) que la tasa de desorción abiótica ( $0.161 \pm 0.013$  %/h). La tasa de mineralización en el control sin sorbentes también fue muy alta,  $7.644 \pm 0.129$  %/h. La

amplitud de mineralización fué  $62.67 \pm 0.727$  y  $88.72 \pm 1.092$  % para el fenantreno adsorbido al complejo y de fenantreno disuelto en el control, respectivamente, mientras que la cantidad de fenantreno desorbido por lavados fué  $4.35 \pm 0.113$  %.

La bacteria *Mycobacterium sp.* 208LB se comportó de forma diferente a *Clavibacter xyli* S1 y *Sphingomonas sp.* 128LH, con una tasa de mineralización de fenantreno adsorbido al complejo muy baja ( $0.153 \pm 0.038$  %/h). En el control la tasa de mineralización fué  $0.484 \pm 0.086$  %/h. La amplitud de mineralización fué  $7.87 \pm 0.178$  y  $47.77 \pm 1.798$  % con el complejo y en el control respectivamente (Fig. II.2.4.2C y D).

El estudio de la capacidad de degradación de antraceno adsorbido al complejo mostró con *Mycobacterium sp.* LB501T una tasa de degradación de  $3.093 \pm 0.277$  %/h, mientras que la tasa de desorción fué  $0.479 \pm 0.09$  %/h. La amplitud de mineralización fué  $65.39 \pm 1.318$  % mientras que la cantidad desorbida de antraceno fué  $15.06 \pm 0.534$  %.

*Mycobacterium sp.* LB208 se comportó de forma parecida a *Mycobacterium sp.* LB501T, con una tasa y amplitud de mineralización de pireno fueron  $3.665 \pm 0.58$  %/h y  $52.12 \pm 6.168$  %, respectivamente, mientras que la tasa y la amplitud de desorción de la fracción resistente de pireno fueron  $0.298 \pm 0.05$  %/h y  $16.15 \pm 0.319$  %, respectivamente. En la misma línea de trabajo se estudió la capacidad degradadora de fluoranteno por *Mycobacterium VM 446*, detectandose una tasa y amplitud de mineralización de  $5.082 \pm 0.007$  %/h y  $58.16 \pm 1.1$  %, respectivamente. La tasa y la amplitud de desorción de la fracción resistente fueron  $0.229 \pm 0.049$  %/h y  $9.91 \pm 1.809$  %, respectivamente (Fig. II.2.4.2F).

Las tres bacterias mencionadas anteriormente degradaron activamente el substrato disuelto, a unas tasas de mineralización de  $5.099 \pm 0.008$  %/h de antraceno,  $10.816 \pm 0.531$  %/h de pireno y  $7.031 \pm 0.686$  %/h de fluoranteno por *Mycobacterium sp.* LB501T, *Mycobacterium sp.* LB208 y *Mycobacterium VM446*, respectivamente. Las amplitudes de mineralización fueron  $84.71 \pm 0.596$  % de antraceno,  $85.62 \pm 3.583$  % de pireno y  $62.27 \pm 4.447$  % de fluoranteno, respectivamente.

### II.2.4.3. Estudio comparativo de cinco bacterias degradadoras de fenantreno

Se estudiaron cinco estirpes con distintas características fisico-químicas y con distintas capacidades de adhesión a los componentes del suelo (ver sección II.3.2). Se planteó estudiar el comportamiento de estas bacterias en cuanto a su capacidad de

degradar fenantreno en distintas formas, tales como disuelto en medio acuoso o adsorbido al complejo (Ca-SWy)-AHs5, para ver sus comportamientos con respecto a la fracción labil y a la fracción resistente.

Las tasas de degradación de fenantreno disuelto en el medio acuoso fueron  $0.092 \pm 0.018$ ,  $3.153 \pm 0.39$ ,  $0.508 \pm 0.018$ ,  $0.597 \pm 0.181$  y  $5.216 \pm 0.479$  %/h para *Arthrobacter polychromogenes* (Art), *Clavobacter xyli* S1 (S1), *Sphingomonas sp.* LH128 (LH128), *Mycobacterium sp.* LB501T (LB501T) y *Sphingomonas sp.* LH162 (LH162), respectivamente. Las amplitudes de mineralización fueron  $16.92 \pm 11.537$ ,  $33.97 \pm 2.915$ ,  $34.41 \pm 1.045$ ,  $37.6 \pm 4.142$  y  $54.06 \pm 4.191$  %, respectivamente, después de 346 h de mineralización (Fig. II.2.4.3A). En un experimento paralelo a este último, se estudió el comportamiento de las cinco bacterias a respecto a la fracción lábil presente en (Ca-SWy)-AHs5. Se observó unos menores tasas de mineralización con las estirpes Art, LH128 y LB501T ( $0.323 \pm 0.39$ ,  $0.806 \pm 0.614$  y  $1.513 \pm 0.084$  %/h, respectivamente). En cambio, las tasas presentadas por LH162 y S1 fueron menores ( $4.644 \pm 0.063$  y  $1.798 \pm 0.023$  %/h, respectivamente). La comparación al nivel de la amplitud de mineralización reveló resultados parecidos, entre  $36.91 \pm 1.192$  y  $43.56 \pm 7.484$  % (Fig. II.2.4.3B).

El estudio comparativo de la capacidad de degradación de la fracción resistente a la desorción (obtenida a partir de los lavados sucesivos del complejo (Ca-SWy)-AHs5 y constituyendo el  $73.75 \pm 2.922$  % de la cantidad inicialmente adsorbida (Fig. II.2.4.3C)) por las bacterias mencionadas anteriormente presentó las siguientes tasas de mineralización:  $0.125 \pm 0.036$ ,  $0.229 \pm 0.129$ ,  $0.399 \pm 0.185$ ,  $0.311 \pm 0.13$  y  $0.226 \pm 0.079$  %/h para las estirpes Art, S1, LH128, LB501T y LH162, respectivamente. Por tanto, las bacterias LH128 y LB501T fueron las bacterias que tienen una mayor capacidad de degradar la fracción resistente. La amplitud de mineralización no reveló grandes diferencias entre las distintas bacterias (que giran entre  $4.19 \pm 0.361$  y  $10.72 \pm 1.24$  %) (Fig. II.2.4.3D).

#### **II.2.4.4. Biodegradación de HPA adsorbidos a arcillas en presencia de hierro: Ca-SWy(Fe<sup>3+</sup>) y Fe-SWy.**

Los experimentos de mineralización realizados con los HPAs inicialmente adsorbidos a estos dos sorbentes mostraron una clara concordancia con el

comportamiento de desorción de los compuestos estudiados anteriormente (sección II.1.2.4), sugiriendo que los PAHs estaban disponibles para las bacterias sólo después de desorberse. La mineralización de fenantreno y de pireno fué rápida y extensa, obedeciendo a una cinética de primer orden, en las suspensiones de Ca-SWy y en los controles sin sorbente (Fig. II.2.4.4). Con Ca-SWy, las tasas de mineralización fueron ligeramente mayores que las del control. Este efecto estimulante fué mas claro con pireno que con fenantreno. En cambio, cuando estos últimos estaban adsorbidos a Ca-SWy(Fe<sup>3+</sup>) y a Fe-SWy, ambos HPAs fueron mineralizados lentamente y a una amplitud de degradación muy baja. Una fracción bastante importante de los compuestos adsorbidos quedó totalmente resistente a la biodegradación bajo estas condiciones, dado que las amplitudes finales de mineralización obtenidas después de 125.5 horas fueron respectivamente,  $7.144 \pm 2.377$  % y  $6.61 \pm 0.283$  % para el fenantreno adsorbido a Ca-SWy(Fe<sup>3+</sup>) y Fe-SWy, y así como  $3.882 \pm 0.635$  % y  $4.727 \pm 0.803$  % para el pireno adsorbido a la Ca-SWy(Fe<sup>3+</sup>) y Fe-SWy.

Con el objetivo de confirmar que estas tasas bajas de mineralización no eran debidas a una posible toxicidad para la bacteria por la presencia de hierro, se añadió el HPA en solución, diez horas después de la inoculación, lo cual indujo una clara e inmediata estimulación en la producción de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, tanto con fenantreno como con pireno (Fig. II.2.4.4). No obstante, con la arcilla férrica se originó una tasa de mineralización algo más lenta después del aporte de pireno disuelto.

## II.2.5. Efecto del envejecimiento sobre la biodegradación de HPAs adsorbidos

Los procesos de envejecimiento de los hidrocarburos son uno de los factores claves que controlan la disponibilidad de estos compuestos para las bacterias del suelo. Por tanto, nos planteamos estudiar el envejecimiento con dos partículas modelo del suelo, la arcilla y el complejo arcillo-húmico (Ca-SWy)-AHs5, utilizando como control el suelo intacto de la estación experimental. El tiempo de envejecimiento (o residencia) en este experimento fué de 4 meses. Como resultado, se observó la clara influencia del tiempo de residencia sobre la biodegradación. Las tasas de mineralización de fenantreno envejecido en la arcilla, el complejo y el substrato disuelto fué  $0.133 \pm 0.05$ ,  $0.124 \pm 0.068$  y  $0.061 \pm 0.007$  %/h, respectivamente. En cambio, las tasas de mineralización presentadas en las mismas muestras, pero conteniendo el fenantreno recientemente añadido fué  $1.054 \pm 0.092$ ,  $0.706 \pm 0.006$  y  $0.276 \pm 0.008$  %/h, respectivamente. Se observó

también un efecto del envejecimiento sobre la amplitud de mineralización, cuyos valores obtenidos, después de 967 h de biodegradación, fueron  $16.53 \pm 0.374$ ,  $11.25 \pm 5.456$  y  $9.11 \pm 1.293$  % para la arcilla, el complejo (Ca-SWy)-AHs5 y para el control, respectivamente. Las amplitudes de mineralización de las mismas muestras con el substrato nuevamente añadido fueron  $45.79 \pm 3.479$ ,  $42.77 \pm 2.753$  y  $31.76 \pm 0.163$  %, respectivamente, después de 561h de mineralización (Fig. II.2.5).

### II.3. Transporte bacteriano (adhesión)

Una vez estudiados los efectos de distintos componentes modelo del suelo sobre la adsorción y la biodegradación, se realizó un estudio sobre las interacciones físicas entre estos componentes y distintas estirpes bacterianas capaces de degradar HPAs. Este estudio se realizó principalmente en experiencias con columnas saturadas que contenían los distintos componentes.

#### II.3.1. Características fisico-químicas de las bacterias.

Las doce bacterias seleccionadas diferían en el potencial zeta de su superficie celular, en la hidrofobicidad y en las dimensiones de las células (Tabla II.3.1). Según una clasificación anteriormente propuesta (10), las estirpes LB208, LB307T, LB501T, VM502, VM503 y VM446, del género *Mycobacterium*, y *Sphingomonas* LH162 son altamente hidrófobas, con valores de ángulo de contacto por encima del  $70^\circ$ , mientras que las estirpes *Sphingomonas* sp. LB126 y sp. LH128, *Clavibacter xyli* S1, *Mycobacterium* VM505 y *Arthrobacter polychromogenes* son hidrófilas, con valores de ángulo de contacto por debajo de  $35^\circ$ . En las condiciones experimentales utilizadas, todas las estirpes tienen un potencial zeta negativo, que gira desde el valor relativamente alto de las células de *Sphingomonas* sp. LB126 hasta el extremadamente bajo de las células de *Mycobacterium* sp. LB501T. Esta bacteria degradadora de antraceno combina un potencial zeta bajo con una gran hidrofobicidad (9).



Tabla II.3.1: Efecto de las características de las bacterias degradadoras de PAH sobre su transporte a través de las columnas de suelo saturado

bacteria	Substrato	Metodo de aislamiento <sup>a</sup>	Ancho de la célula (μm)	Longitud de la célula (μm)	aspect ratio <sup>b</sup>	θ <sub>w</sub> <sup>c,f</sup> (°)	ζ <sup>d,f</sup> (mV)	transporte <sup>e,f</sup>		
								C/C <sub>0</sub>	α <sub>t</sub> <sup>g</sup>	PV <sup>h</sup>
<i>Sphingomonas</i> sp. LH162	Fenantreno	L	0.4	1.2	3	77.0	-23.6	0.72 (0.99)	0.152 (0.003)	6.6 (25.1)
<i>Mycobacterium</i> sp. VM505	Antraceno	L	0.8	1.2	1.5	35.3	-33.6	0.416 (0.908)	0.484 (0.053)	2.788 (23.6)
<i>Mycobacterium</i> sp. LB 307T	Fenantreno	T	0.8	1.0	1.25	85.7	-22.3	0.45 (0.57)	0.473 (0.326)	3.9 (24.8)
<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	Fenantreno	L	0.4	1.6	4	28.2	-22.6	0.19 (0.35)	0.811 (0.515)	6.3 (24.8)
<i>Mycobacterium</i> sp. VM502	Pireno	L	1.2	1.6	1.33	86.3	-27.1	0.171 (0.245)	1.298 (1.033)	2.788 (23.6)
<i>Sphingomonas</i> sp. LB126	Fluoreno	L	1.0	1.2	1.2	23.4	-2.6	0.18 (0.18)	1.101 (1.140)	4.0 (24.8)
<i>Mycobacterium</i> sp. LB501T	Antraceno	T	0.6	2.0	3.33	75.9	-60.2	0.11 (0.11)	1.33 (1.35)	3.0 (23.6)
<i>Mycobacterium</i> sp. LB208	Pireno	L	1.0	1.2	1.2	83.0	-40.6	0.04 (0.09)	2.079 (1.532)	1.7 (24.8)
<i>Mycobacterium</i> sp. VM503	Fluoranteno	L	0.8	1.6	2	80.0	-45.8	0.071 (0.072)	1.717 (1.704)	2.788 (23.6)
<i>Mycobacterium</i> VM446	Fluoranteno	L	0.3	1.0	0.3	89.0	-49.2	0.373 (0.509)	0.467 (0.319)	3.8 (15.4)
<i>Sphingomonas</i> sp. LH128	Fenantreno	L	0.4	1.6	0.3	32.3	-22.9	0.376 (0.699)	0.857 (0.314)	1.7 (12.1)
<i>Clavibacter xyli</i> S1	Fenantreno	L	0.8	2	0.4	22.0	-17.1	0.92 (0.999)	0.056 (0.001)	3.8 (15.4)

<sup>a</sup>L, Extracción líquida; T, Extracción con Teflon. <sup>b</sup> longitud de la célula dividido por el ancho de la célula. <sup>c</sup>θ<sub>w</sub>, Angulo de contacto. <sup>d</sup>ζ, zeta potencial. <sup>e</sup> los valores experimental final están dados en parentesis como una indicación de las dinamicas del filtro bloqueador. <sup>f</sup> Determinaciones se habían realizado a pH 7.2. <sup>g</sup>α<sub>t</sub>, eficiencia de adhesión. <sup>h</sup>PV, volumen de poro.

### II.3.2. Transporte de las bacterias a través de suelo saturado.

Las suspensiones celulares bombeadas a través de columnas de suelo de la finca experimental (arena limosa) atravesaron las mismas (alcanzando  $0.5 \times C/C_0$  max) después de un volumen de poro (VP). Los diferentes valores finales de  $C/C_0$  se diferenciaron de una manera pronunciada, desde 0.04 para la estirpe *Mycobacterium* LB208 hasta 0.92 para *Clavibacter xyli* S1, lo que indica un amplio rango en la eficiencia de secuestro (Tabla II.3.1). La eficiencia de adhesión relativa ( $\alpha_t$ ) se calculó usando los valores  $C/C_0$ . Al contrario que  $C/C_0$ , que es una medida global del secuestro de las células, el cálculo de  $\alpha_t$  toma en cuenta las frecuencias de contacto diferencial de bacterias de distintos tamaños con el material de la columna. Por tanto,  $\alpha_t$  representa la afinidad relativa de las bacterias por el material del suelo. Los valores de  $\alpha_t$  oscilaron dentro de un amplio rango (Tabla II.3.1). Además, no se observó ninguna relación clara entre cualquiera de las características físico-químicas bacterianas estudiadas y la  $\alpha_t$ . Por ejemplo, las estirpes *Sphingomonas* sp. LH162 y *Mycobacterium* sp. VM503 presentaron una hidrofobicidad similar pero también una muy baja y una muy alta eficiencia de adhesión, respectivamente. Las estirpes representativas de diferentes comportamientos de transporte en las columnas de suelo se seleccionaron para otros experimentos con componentes aislados de suelo.

### II.3.3. Efecto de los componentes del suelo sobre el transporte microbiano.

Los experimentos que utilizaron arcillas se realizaron en columnas conteniendo bolas de cristal cubiertas con una mezcla de alcohol de polivinilo (PVA) y de arcilla. Las micrografías realizadas con el microscopio electrónico de estos materiales no mostraron ninguna diferencia en el espesor de las capas formadas por los agregados de arcilla y de los complejos arcillo-húmicos sobre las superficies de las bolas de cristal. La superficie de las bolas estaba cubierta por una capa discontinua, con un espesor de más de 10  $\mu\text{m}$ . En cambio, la arcilla agregada tenía una superficie más rugosa que los complejos arcillo-húmicos agregados (Fig. II.3.3 FOTOS).

Los experimentos de transporte con todas las combinaciones de bacterias y de materiales revelaron que las arcillas agregadas tienen una gran tendencia para retener las bacterias. El transporte bacteriano fué, sin embargo, muy específico para cada

**Tabla II.3.3:** Influencia de los componentes modelo sobre el transporte a través de columnas saturadas, en comparación a las bolas de cristal y el Teflon

bacterias	$\theta_w^{b,a}$ (grado)	$\zeta^{c,a}$ (mV)	arcilla <sup>d</sup>			Arcilla-ácido húmico1 <sup>d</sup>			Arcilla-ácido húmico2 <sup>d</sup>			Arena 1 <sup>d</sup>			Bolas de cristal		Teflon	
			C/C <sub>0</sub>	$\alpha_t^e$	PV <sup>h</sup>	C/C0	$\alpha_t^e$	PV <sup>f</sup>	C/C0	$\alpha_t^e$	PV <sup>f</sup>	C/C0	$\alpha_t^e$	PV <sup>f</sup>	C/C0	$\alpha_t^e$	C/C0	$\alpha_t^e$
<i>Sphingomonas</i> sp. LH162	77.0 (59.1)	-23.6 (-36.2)	0.62 (0.95)	0.384 (0.040)	1.73 (13.4)	1	g	g	1	g	G	0.63 (0.99)	0.238 (0.003)	2.94 (18.96)	0.98	0.028	0.98	0.029
<i>Mycobacterium</i> sp. LB 307T	85.7 (102.9)	-22.3 (-28.7)	0.47 (0.61)	0.798 (0.523)	1.43 (13.1)	1	g	g	1	g	g	1	G	G	0.37	0.454	0.17	0.846
<i>Arthrobacter</i> <i>polychromogenes</i>	28.2	-22.6	0.26 (0.31)	1.156 (1.015)	1.43 (13.1)	0.82 (0.98)	0.197 (0.015)	1.29 (12.4)	1	g	G	1	g	G	NDh	NDh	NDh	NDh
<i>Mycobacterium</i> sp. LB208	83.0 (88.3)	-40.6 (-44.1)	0.19 (0.24)	1.993 (1.726)	1.43 (13.1)	0.70 (0.91)	0.510 (0.138)	1.29 (12.44)	1	g	g	0.66 (0.97)	0.307 (0.016)	2.64 (18.66)	0.58	0.559	0.32	0.773
<i>Sphingomonas</i> sp. LB126	23.4 (35.5)	-2.6 (-11.03)	0.03 (0.07)	3.944 (3.127)	1.43 (13.1)	0.62 (0.97)	0.701 (0.035)	1.29 (12.4)	0.7 (0.96)	0.442 (0.045)	1.45 (13.18)	0.77 (0.99)	0.196 (0.003)	2.64 (18.66)	0.99	0.024	0.63	0.467
<i>Mycobacterium</i> sp. LB501T	75.9 (88.5)	-60.2 (-65.5)	0.01 (0.11)	3.075 (2.395)	1.53 (13.2)	0.27 (0.47)	1.702 (0.997)	1.89 (13.04)	0.48 (0.61)	0.831 (0.573)	2.05 (13.79)	0.57 (0.86)	0.379 (0.102)	4.22 (18.46)	0.32	0.488	0.19	0.82
VM446	89.0	-49.2	0.28 (0.34)	1.09 (0.918)	1.73 (6.9)	0.75 (0.85)	0.298 (0.167)	1.6 (7.79)	0.77 (0.86)	0.238 (0.136)	1.76 (10.88)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Sphingomonas</i> sp. LH128	32.3	-22.9	0.38 (0.70)	0.857 (0.314)	1.73 (12.1)	0.78 (0.91)	0.261 (0.103)	1.6 (12.7)	0.83 (0.93)	0.175 (0.067)	1.76 (13.49)	0.76 (0.99)	0.151 (0.007)	2.45 (13.13)	ND	ND	ND	ND
<i>Clavibacter</i> <i>xyli</i> S1	22.0	-17.1	0.43 (0.83)	1.046 (0.235)	1.73 (13.4)	0.81 (0.97)	0.32 (0.044)	1.6 (11.5)	0.86 (0.97)	0.204 (0.036)	1.76 (13.49)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

<sup>a</sup> Los datos en parentesis de  $\theta_w$  y  $\zeta$ , y los datos de transporte a través las bolas de cristal y el Teflon están obtenidos de Bastianens et al. (9).

<sup>b</sup>  $\theta_w$ , ángulo de contacto. <sup>c</sup>  $\zeta$ , zeta potencial. <sup>d</sup> Los valores experimentales final están dados en parentesis como una indicación de la dinamicas del de bloqueo del filtro. <sup>e</sup>  $\alpha_t$  eficiencia de adhesión. <sup>f</sup> PV, volumen de poro. <sup>g</sup>  $\alpha_t$  valores que podrían no ser determinadas por las columnas usadas.

<sup>h</sup> ND, no determinado.

estirpe (Tabla II.3.3). Con la arcilla, los valores  $\alpha_t$  fueron mayores que con el suelo para la mayoría de las estirpes analizadas, aunque las diferencias relativas entre las estirpes observadas en el suelo se conservaron básicamente. Esto sugiere que las bacterias tienen una fuerte afinidad por las superficies de la arcilla presente en el suelo, a pesar de su contenido moderado en arcilla (6.7%), incluso no estando saturada con cationes antes de su uso. Las células de algunas estirpes se acumularon bastante en las columnas de arcilla lo que condujo a la formación de biofilms que cubrían completamente la arcilla agregada (Figura. II.3.3D). Cuando las superficies de arcilla estaban cubiertas por fracciones húmicas, el transporte bacteriano se facilitó notablemente, como se deduce de los valores altos de  $C/C_0$ . La arcilla cubierta por ácidos húmicos no cambió significativamente la porosidad del material o la estereometría del conjunto (empaquetado), lo que hubiera podido estar acompañado por un cambio de la probabilidad de colisión de las bacterias con las superficies. Parece, por tanto, que los ácidos húmicos adsorbidos interfieren en la asociación de las bacterias a la arcilla.

Con la arena se obtuvieron valores mas bajos de  $\alpha_t$  que con los agregados de arcilla (Tabla II.3.3 y II.3.4), aunque tanto la porosidad como la conductividad hidráulica de la arena eran significativamente menores que las de los agregados de arcilla. Esto confirma la suposición que la arcilla es el agente principal en la retención de las bacterias en el suelo.

#### **II.3.4. Influencia del contenido en materia orgánica ( $f_{oc}$ ) de la arena sobre el transporte bacteriano.**

Se planteó estudiar otros tres tipos de arena cuya diferencia radicaba en el contenido en materia orgánica ( $f_{oc}$ ). La idea de usar la arena asociada a distintas cantidades de materia orgánica surgió de las micrografías realizadas sobre estos materiales con microscopio electrónico, que revelaron la ausencia de relieves en la superficie de la arena (Fig. II.3.4 FOTO). Para estos experimentos se seleccionaron siete bacterias con distintas características fisico-químicas: *Mycobacterium* sp. LB208, LB307T y LB501T, *Sphingomonas* sp. LB126, sp. LH162 y sp. LH128 y *Arthrobacter polychromogenes*. El resultado de este experimento no mostró ningún efecto de los distintos tipos de arenas sobre el valor de  $\alpha_t$ . Sin embargo, se pudo observar también algunos valores ligeramente altos, del orden de 0.307 y 0.379, en presencia de la arena 1

para las estirpes *Mycobacterium* sp. LB208 y *Mycobacterium* sp. LB501T, respectivamente. Estas dos bacterias mostraron cierta afinidad por las otras arenas (arena 2, arena 3 y arena 4), aunque de menos importancia que la observada con la C1. En resumen, con estas dos bacterias se observaron valores más altos de  $\alpha_t$  con los cuatro tipos de arenas estudiadas (tabla II.3.3 y II.3.4).

### **II.3.5. Influencia de la fuente de carbono de pre-cultivo sobre el transporte bacteriano.**

Como se mencionó anteriormente, la estirpe *Clavibacter xyli* S1 presentó una gran versatilidad metabólica, siendo capaz de degradar fácilmente tanto naftaleno como fenantreno. Esta capacidad se utilizó para estudiar si la fuente de carbono usada durante el crecimiento afectaba al transporte bacteriano a través del suelo. Esta información puede ser útil en el uso de inoculantes microbianos en técnicas de biorrecuperación. Se observó que cuando la estirpe se cultivaba en presencia de naftaleno y se utilizaba en experimentos de transporte en presencia de naftaleno o de fenantreno, los valores de  $\alpha_t$  eran muy parecidos: 0.531 y 0.511, respectivamente. Un valor muy parecido (0.537) se obtuvo cuando se cultivó en presencia de fenantreno y se utilizó en columnas del suelo en presencia del naftaleno. En cambio, al crecer con fenantreno y el transporte hacerse con fenantreno, el coeficiente de adhesión fue diez veces menor, 0.056 (Tabla II.3.5A). En la misma línea de experimentos, se evaluó este efecto con el caso de fenantreno como fuente de carbono y de energía sobre el transporte a través de las columnas empaquetadas con bolas de cristal envueltas por agregados de arcilla, en presencia de fenantreno o naftaleno. Como resultado, se observó una gran afinidad de adhesión cuando la fuente de carbono de cultivo y la que estaba presente en las columnas era la misma (fenantreno/fenantreno), mientras que la afinidad descendía al cambiar la fuente de carbono (fenantreno/naftaleno) (Tabla II.3.5A).

Esta estirpe presentó una gran afinidad por la arena 4 en comparación con el resto de las arenas usadas cuando esta bacteria se había cultivado con fenantreno (Tabla II.3.5B). Resultados similares se obtuvieron con los complejos (más fenantreno o naftaleno) para esta estirpe cultivada con fenantreno (Tabla II.3.5A).

**Tabla II.3.4:** Influencia de las superficies de distintas arenas sobre el transporte a través de columnas saturadas

bacterium	$\theta_w^{a,b}$ (grado)	$\zeta^{a,c}$ (mV)	Arena 2 <sup>d</sup>			Arena 3 <sup>d</sup>			Arena 4 <sup>d</sup>		
			C/C <sub>0</sub>	$\alpha_t^e$	PV <sup>f</sup>	C/C <sub>0</sub>	$\alpha_t^e$	PV <sup>f</sup>	C/C <sub>0</sub>	$\alpha_t^e$	PV <sup>b</sup>
<i>Sphingomonas</i> sp. LH162	77.0 (59.1)	-23.6 (-36.2)	0.82 (1.0)	0.075 (0.0)	4.97 (21.68)	0.91 (1.0)	0.054 (0.0)	2.49 (16.87)	0.62 (1.0)	0.157 (0.0)	5.62 (26.95)
<i>Mycobacterium</i> sp. LB 307T	85.7 (102.9)	-22.3 (-28.7)	(0)	(0)	(0)						
<i>Arthrobacter</i> <i>polychromogenes</i>	28.2	-22.6	0.96 (1.0)	0.018 (0.0)	4.97 (30.04)	0.9 (1.0)	0.07 (0.0)	2.49 (18.66)	0.94 (1.0)	0.023 (0.0)	5.62 (14.76)
<i>Mycobacterium</i> sp. LB208	83.0 (88.3)	-40.6 (-44.1)	0.55 (0.98)	0.315 (0.01)	4.97 (30.04)	0.8 (1.0)	0.191 (0.0)	2.49 (18.66)	0.66 (1.0)	0.189 (0.0)	5.62 (33.04)
<i>Sphingomonas</i> sp. LB126	23.4 (35.5)	-2.6 (-11.02)	(0)	(3)	(1)	(0)		(1)	(0)	(0)	(0)
<i>Mycobacterium</i> sp. LB501T	75.9 (88.5)	-60.2 (-65.5)	0.66 (0.91)	0.202 (0.045)	4.97 (30.04)	0.82 (0.95)	0.157 (0.04)	2.49 (18.66)	0.77 (1.0)	0.188 (0.0)	5.62 (33.04)
<i>Sphingomonas</i> sp. LH128	32.3	-22.9	0.8 (0.99)	0.088 (0.005)	2.18 (24.47)	0.79 (0.98)	0.148 (0.011)	2.49 (18.66)	0.75 (0.98)	0.101 (0.008)	5.62 (33.04)

<sup>a</sup> Los datos en parentesis de  $\theta_w$  y  $\zeta$ , y los datos de transporte a través las bolas de cristal y el Teflon están obtenidos por Bastianens et al. (19).

<sup>b</sup>  $\theta_w$ , ángulo de contacto. <sup>c</sup>  $\zeta$ , zeta potencial. <sup>d</sup> Los valores experimental final están dados en parentesis como una indicación de las dinámicas del filtro bloqueador. <sup>e</sup>  $\alpha_t$  eficiencia de adhesión. <sup>f</sup> PV, volumen de poro. <sup>g</sup>  $\alpha_t$  valores que podrían no ser determinadas por las columnas usadas. <sup>h</sup> ND, no determinado.

**Tabla II.3.5A:** Efecto combinado de la fuente de carbono de precultivo, del sustrato usado en la columna y de los distintos sorbentes sobre el transporte de *Clavibacter xyli* S1 a través de columnas saturadas

Sustrato		$\theta_w^a$ (grado)	$\zeta^b$ (mV)	Arcilla <sup>c</sup>			Arcilla-ácido hímico 1 <sup>c</sup>			Arcilla-ácido hímico 2 <sup>c</sup>			Suelo		
Sustrato 1 de precultivo	Sustrato 2 de transporte			C/C <sub>0</sub>	$\alpha_t^d$	PV <sup>e</sup>	C/C <sub>0</sub>	$\alpha_t^d$	PV <sup>e</sup>	C/C <sub>0</sub>	$\alpha_t^d$	PV <sup>e</sup>	C/C <sub>0</sub>	$\alpha_t^d$	PV <sup>e</sup>
Fenantreno	Fenantreno	22.0	-17.1	0.43 (0.83)	1.046 (0.235)	1.73 (13.4)	0.81 (0.97)	0.32 (0.044)	1.6 (11.5)	0.86 (0.97)	0.204 (0.036)	1.76 (13.49)	0.92 (1.0)	0.056 (0.001)	3.79 (8.42)
Fenantreno	Naftaleno	22.0	-17.1	0.62 (0.85)	0.58 (0.2)	1.73 (12.1)	0.77 (0.95)	0.383 (0.081)	1.6 (11.5)	0.85 (0.95)	0.207 (0.07)	1.76 (9.6)	0.45 (0.94)	0.537 (0.039)	3.79 (13.1)
Naftaleno	Fenantreno	22.0	-17.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.47 (0.64)	0.511 (0.303)	3.79 (20.0)
Naftaleno	Naftaleno	22.0	-17.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.45 (0.61)	0.531 (0.329)	3.79 (15.36)

<sup>a</sup>  $\theta_w$ , ángulo de contacto. <sup>b</sup>  $\zeta$ , zeta potencial. <sup>c</sup> Los valores experimentales final están dados en parentesis como una indicación de las dinamicas de bloqueo del filtro. <sup>d</sup>  $\alpha_t$ , eficiencia de adhesión. <sup>e</sup> PV, volumen de poro. <sup>g</sup> ND, no determinado.

**Tabla II.3.5B:** Efecto combinado de la fuente de carbono de precultivo, del sustrato usado en la columna y la superficie de la arena sobre el transporte de la *Clavibacter Xyli* a través de columnas saturadas

Sustrato		$\theta_w^a$ (grado)	$\zeta^b$ (mV)	Arena 1 <sup>c</sup>			Arena 2 <sup>c</sup>			Arena 3 <sup>c</sup>			Arena 4		
Sustrato 1 de precultivo	Sustrato 2 de transporte			C/C <sub>0</sub>	$\alpha_t^d$	PV <sup>e</sup>	C/C <sub>0</sub>	$\alpha_t^d$	PV <sup>e</sup>	C/C <sub>0</sub>	$\alpha_t^d$	PV <sup>e</sup>	C/C <sub>0</sub>	$\alpha_t^d$	PV <sup>e</sup>
Fenantreno	Naftaleno	22.0	-17.1	0.79 (0.99)	0.177 (0.005)	2.95 (17.2)	0.75 (0.97)	0.155 (0.014)	5.47 (19.4)	0.88 (0.99)	0.115 (0.01)	2.99 (17.4)	0.18 (1.0)	0.788 (0.0)	2.57 (20.9)

<sup>a</sup>  $\theta_w$ , ángulo de contacto. <sup>b</sup>  $\zeta$ , zeta potencial. <sup>c</sup> Los valores experimental final están dados en paréntesis como una indicación de la dinamicas de bloqueo del filtro. <sup>d</sup>  $\alpha_t$ , eficiencia de adhesión. <sup>e</sup> PV, volumen de poro.

### II.3.6. Efecto del tensioactivo Triton X-100 sobre el transporte bacteriano.

Se seleccionaron dos estirpes con una gran eficiencia de adhesión al suelo pero con características físico-químicas de la superficie celular diferentes: la estirpe extremadamente hidrófoba *Mycobacterium* sp. LB208 y la hidrófila *Sphingomonas* sp. LB126. Suspensiones bacterianas de estas dos estirpes, conteniendo distintas concentraciones de Triton X-100, se bombearon a través de columnas de suelo de la finca experimental. Ambas respondieron de forma diferente a la presencia del tensioactivo (Fig. II.3.6A). El transporte de *Mycobacterium* sp. LB208 se facilitó claramente, alcanzando un valor de  $C/C_0$  de 1 a una concentración de 500  $\mu\text{g/ml}$  de tensioactivo. En cambio, el transporte de *Sphingomonas* sp. LB126 no se afectó en presencia del tensioactivo, incluso a concentraciones por encima de su CMC (200 $\mu\text{g/ml}$ ).

La estirpe *Mycobacterium* sp. LB501T, que presentaba características extremas en su superficie celular, mostró también afinidades muy altas por las superficies de la arcilla y de los complejos (Tabla II.3.3). Se realizó un experimento para estimar el efecto del tensioactivo sobre la adhesión de esta estirpe al suelo y a los componentes individuales del suelo. Triton X-100, a una concentración de 300  $\mu\text{g/ml}$ , disminuyó la retención bacteriana en el suelo y en la arcilla, y, en menor grado, en los complejos arcillo-húmicos (Fig. II.3.6B). El aumento progresivo en los valores de  $C/C_0$  con las suspensiones de tensioactivo bombeadas a través de las columnas de arcilla puede ser atribuida a la adsorción progresiva del tensioactivo a las superficies colectoras. Alternativamente, la liberación o el desprendimiento de las bacterias puede también haber causado este progresivo aumento en los valores de  $C/C_0$ , una posibilidad que no se puede excluir en base a nuestros resultados.

## III.- Estudio de suelos contaminados como aproximación a las condiciones reales.

### III.1.- Estudio del potencial de biodegradación de las bacterias autóctonas.

En esta parte de este trabajo se planteó estudiar el potencial de degradación de distintos tipos de hidrocarburos policíclicos aromáticos por las bacterias autóctonas presentes en tres tipos de suelos contaminados (S1, S2 y S3). La diferencia entre estos radicaba en el tiempo en el que las bacterias del suelo habían estado en contacto con el



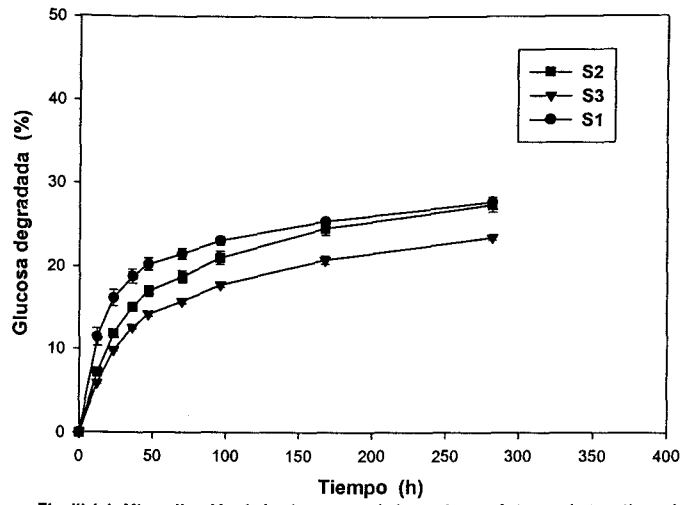


Fig. III.1.1: Mineralización de la glucosa por la bacterias autóctonas de tres tipos de suelos contaminados.

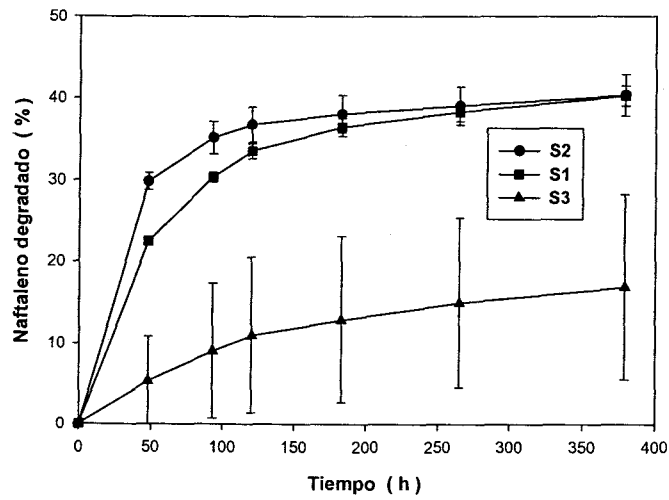


Fig II.1.2: Mineralización de naftaleno por las bacterias autóctonas de tres tipos de suelos contaminados.

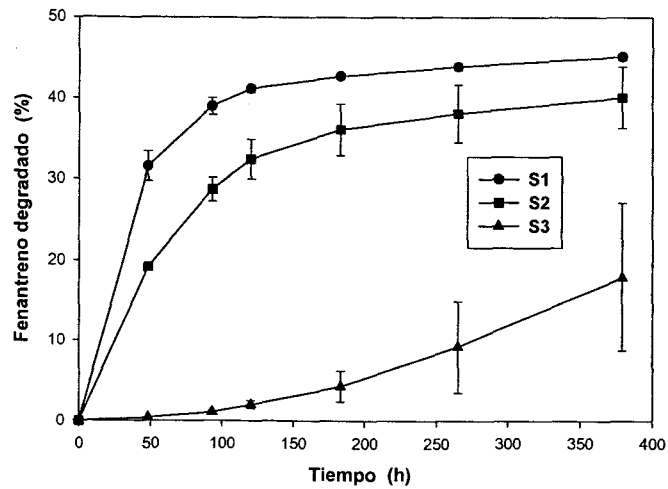


Fig. III.1.3: Mineralización de fenantreno por las bacterias autóctonas de tres tipos de suelos contaminados.

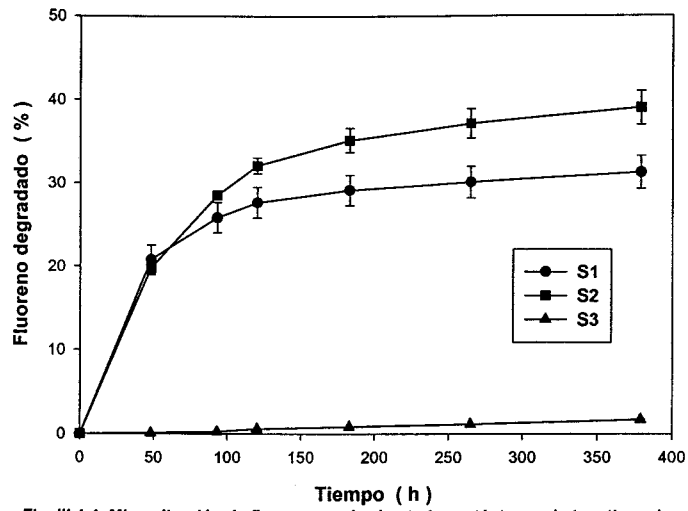


Fig. III.1.4: Mineralización de fluoreno por las bacterias autóctonas de tres tipos de suelos contaminados.

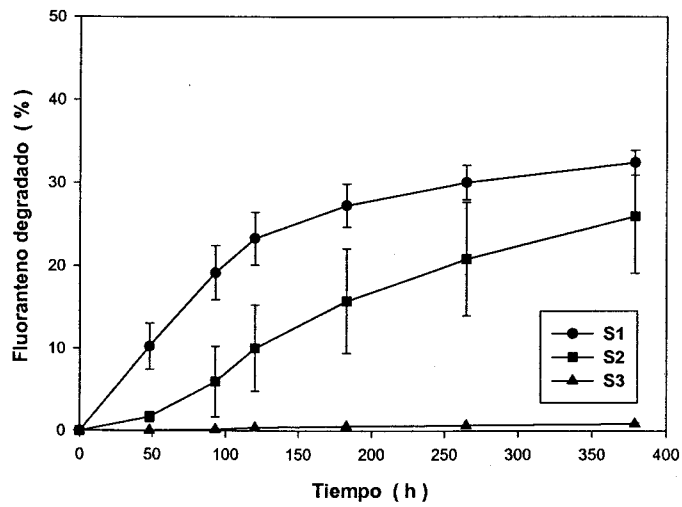


Fig. III.1.5: Mineralización de fluoranteno por las bacterias autóctonas de tres tipos de suelos contaminados.

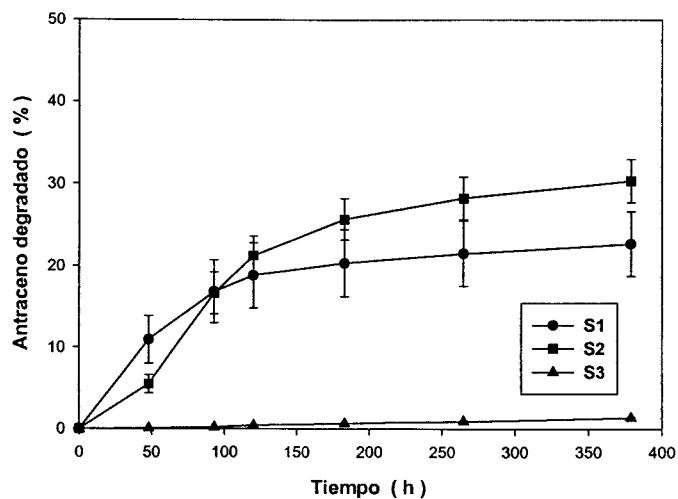


Fig. III.1.6: Mineralización de antraceno por las bacterias autóctonas de tres tipos de suelos contaminados.

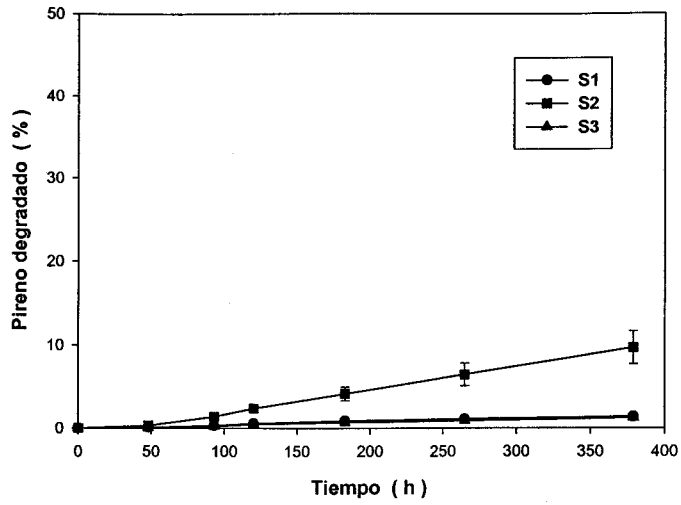


Fig III.1.7: Mineralización de pireno por las bacterias autóctonas de tres tipos de suelos contaminados.

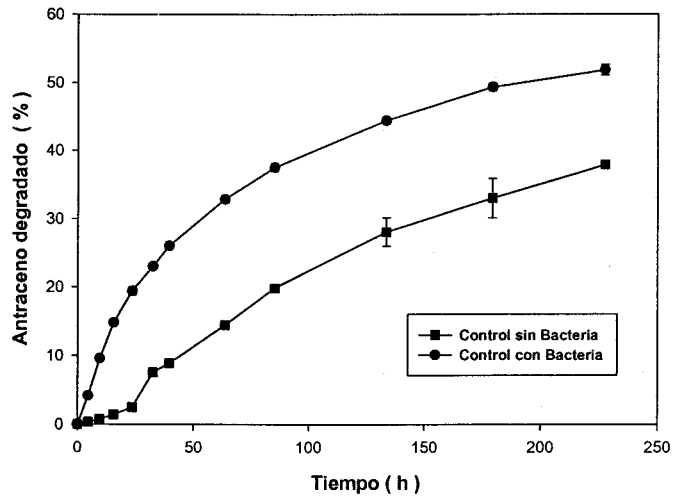


Fig. III.2.A: La inoculación con la *Mycobacterium* sp. LB501T sobre la degradación de antraceno en el suelo contaminado S1.

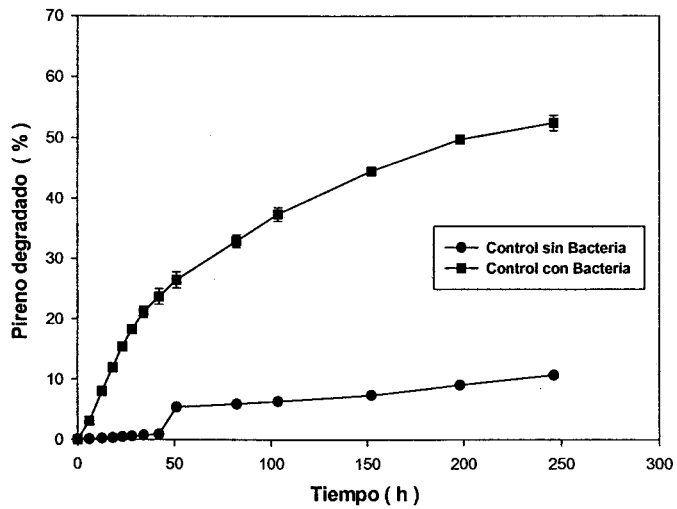


Fig. III.2.B: Inoculación con la *Mycobacterium* sp. LB208 sobre la degradación de pireno en el suelo contaminado S1.

**Tabla III.1:** Comparación del potencial de biodegradación de distintos HPAs por las bacterias autóctonas de distintos suelos.

		S1	S2	S3
Glucosa	Tasa (%/h)	0.704 ± 0.044	0.512 ± 0.021	0.427 ± 0.008
	Amplitud (%)	27.65 ± 0.005	27.3 ± 0.897	23.38 ± 0.339
Naftaleno	Tasa (%/h)	0.380 ± 0.021	0.328 ± 0.006	0.092 ± 0.096
	Amplitud (%)	40.34 ± 2.528	40.25 ± 1.221	16.87 ± 11.338
Fenantreno	Tasa (%/h)	0.421 ± 0.011	0.310 ± 0.016	0.070 ± 0.037
	Amplitud (%)	45.10 ± 0.417	40.04 ± 3.973	17.95 ± 9.16
Fluoreno	Tasa (%/h)	0.297 ± 0.02	0.307 ± 0.002	0.003 ± 0.001
	Amplitud (%)	31.25 ± 1.971	38.97 ± 2.033	1.69 ± 0.077
Fluoranteno	Tasa (%/h)	0.206 ± 0.035	0.114 ± 0.065	0.002 ± 0
	Amplitud (%)	32.43 ± 1.508	25.93 ± 6.81	0.86 ± 0.101
Antraceno	Tasa (%/h)	0.182 ± 0.042	0.222 ± 0.019	0.005 ± 0
	Amplitud (%)	22.7 ± 3.935	30.33 ± 2.614	1.37 ± 0.123
Pireno	Tasa (%/h)	0.007 ± 0.001	0.031 ± 0.006	0.006 ± 0.001
	Amplitud (%)	1.38 ± 0.198	9.68 ± 1.978	1.24 ± 0.169

hidrocarburo. El suelo S3 era un suelo recientemente contaminado que provenía de un accidente, provocado por un escape de un oleoducto, el suelo S2 provenía del borde de un río contaminado por los residuos de una refinería, y el tercer suelo S1 procedía del fondo del río mencionado anteriormente.

Se estudiaron seis distintos hidrocarburos en separado para comprobar el potencial de degradación presentado por la flora microbiana autóctona de los tres suelos. Se utilizó también la glucosa para determinar la capacidad respiratoria global del suelo.

El uso de la glucosa como fuente de carbono fácilmente degradable para evaluar el tamaño de la flora microbiana degradadora de los compuestos orgánicos mostró entre valores muy altos en el suelo S1 y relativamente altos en los suelos en los suelos S2 y S3 (Fig III.1.1) y (Tabla III.1). La evaluación de las tasas de degradación de los

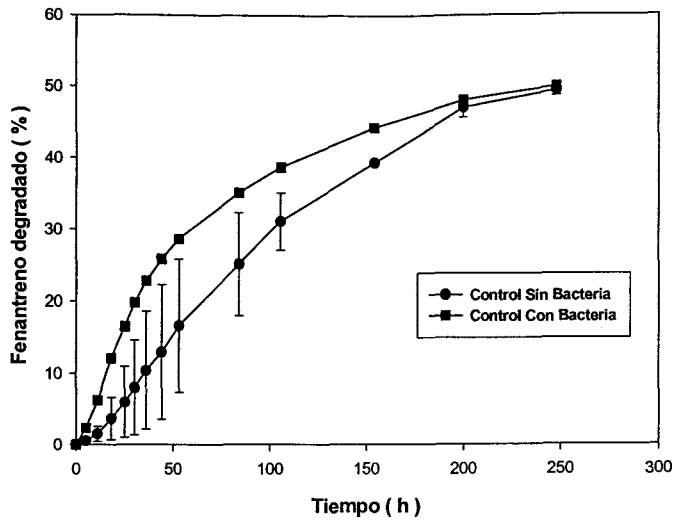


Fig. III.2.C: La inoculación con la *Sphingomonas* sp. LH128 sobre la degradación de fenantreno en el suelo contaminado S1.

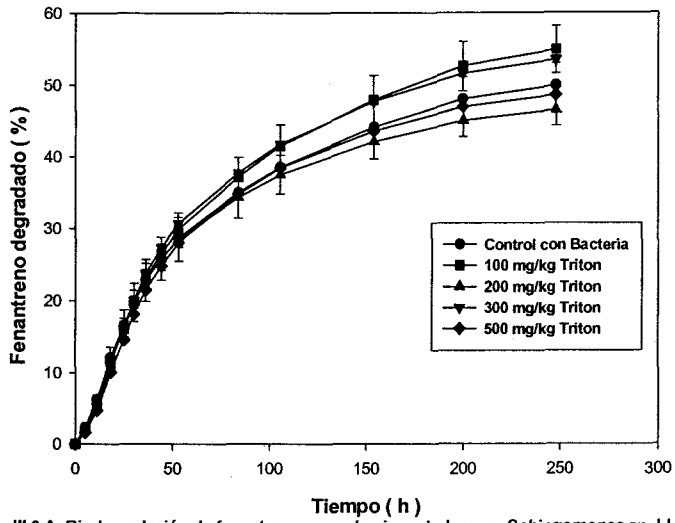


Fig. III.3.A: Biodegradación de fenantreno en suelos inoculados con *Sphingomonas* sp. LH128 y en presencia de distintas concentraciones de Triton X-100.

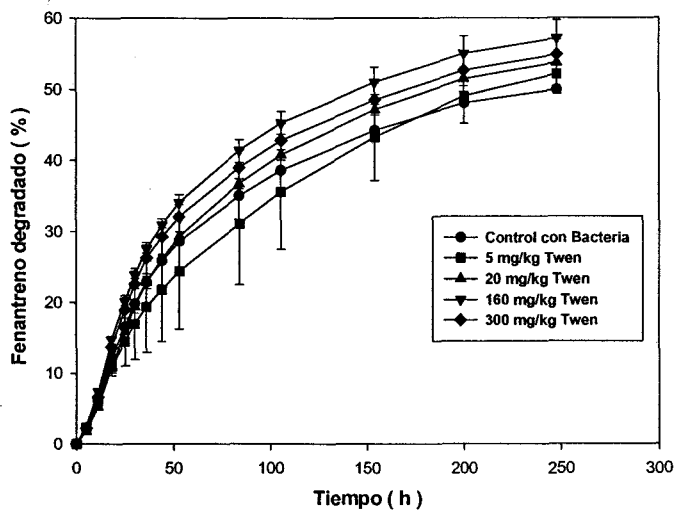


Fig. III.3.B: Biodegradación de fenantreno en suelos inoculados con *Sphingomonas* sp. LH128 y en presencia de distintas concentraciones de Tween 80.

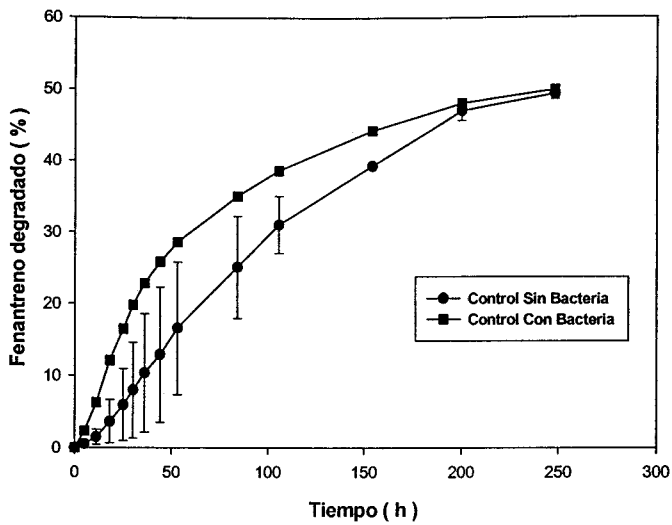


Fig. III.2.C: La inoculación con la *Sphingomonas* sp. LH128 sobre la degradación de fenantreno en el suelo contaminado S1.

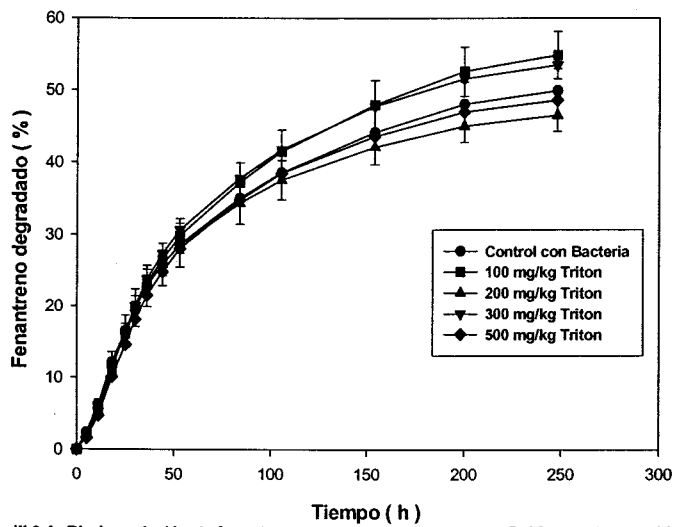


Fig. III.3.A: Biodegradación de fenantreno en suelos inoculados con *Sphingomonas* sp. LH128 y en presencia de distintas concentraciones de Triton X-100.

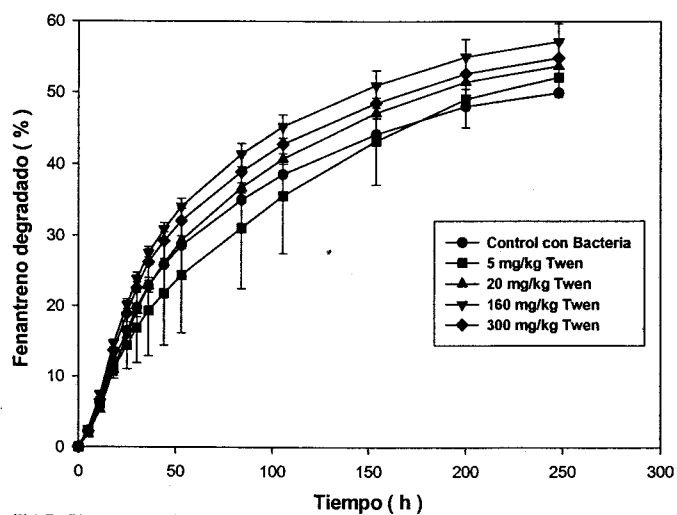


Fig. III.3.B: Biodegradación de fenantreno en suelos inoculados con *Sphingomonas* sp. LH128 y en presencia de distintas concentraciones de Tween 80.

distintos HPA estudiados en el suelo S1 mostró valores altos para naftaleno, fenantreno y fluoreno, ligeramente altos para fluoranteno y antraceno y muy baja para el pireno. La comparación de las amplitudes de degradación mostró valores altos en todos los casos excepto el pireno (Fig III.1.2, III.1.3, III.1.4, III.1.5, III.1.6 y III.1.7) y (Tabla III.1). En el suelo S2 se observó un comportamiento parecido al suelo S1: Tasas de degradación de naftaleno, fenantreno y fluoreno altas, ligeramente alta para antraceno y baja para fluoranteno mientras con el pireno se observó la tasa mas baja. La comparación a nivel de la amplitud de mineralización presentó casi los mismos resultados que los obtenidos en el suelo S1 (Tabla III.1). Las tasas y amplitudes de degradación en suelo S3 fueron muy bajas en todos los casos en comparación con los suelos S1 y S2 (Tabla III.1).

### **III.2.- Efecto de un aporte bacteriano exógeno como medida para remediar los suelos que presentan una carencia de bacterias que degradan los hidrocarburos**

Al observarse la incapacidad de los microorganismos autóctonos en los tres suelos estudiados de degradar significativamente algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos, como antraceno y pireno, se estudiaron formas posibles para aumentar las tasas de degradación de estos hidrocarburos. Con este objetivo se planteó añadir tres tipos de bacterias en separado para ver su contribución en el aumento de la degradación.

El aporte de la bacteria LB501T al suelo S1 provocó una subida de la tasa de degradación de antraceno hasta  $1.013 \pm 0.019$  %/h en comparación con la tasa de degradación presentada por las bacterias autóctonas que fué  $0.41 \pm 0.034$  %/h. También esta subida afectó la amplitud de mineralización, que aumentó de  $37.91 \pm 0.313$  hasta  $51.87 \pm 0.764$  % (Fig. III.2A). De la misma manera, el aporte de la bacteria degradadora de pireno LB208 provocó un aumento muy importante de la tasa mineralización:  $0.643 \pm 0.025$  %/h frente a  $0.097 \pm 0.005$  %/h en ausencia de inoculación. La amplitud de mineralización ascendió de  $10.73 \pm 0.335$  hasta  $52.41 \pm 1.238$  % (Fig. III.2B).

Por último, se comprobó la capacidad de degradación de la bacteria LH128 degradadora de fenantreno en el suelo contaminado S1. Como resultado, se observó un cierto aumento de la tasa de degradación hasta  $0.753 \pm 0.00$  %/h, mientras que en ausencia de la bacteria LH128 era  $0.358 \pm 0.303$  %/h. Sin embargo, la amplitud no fué

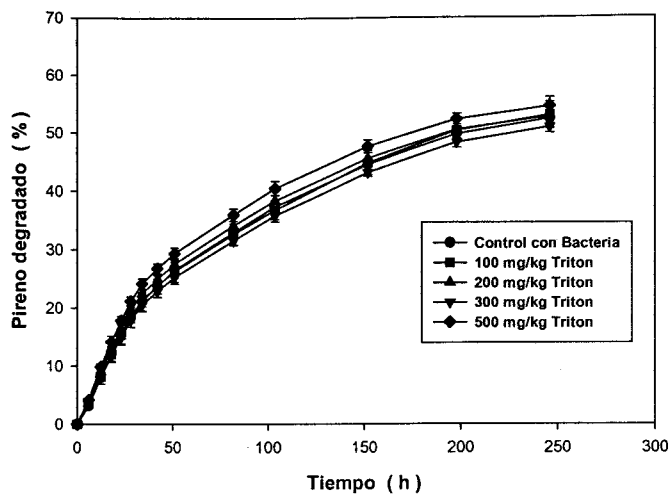


Fig. III.3.C: Biodegradación de pireno en suelos contaminados inoculados con *Mycobacterium* sp. LB208. y en presencia de distintas concentraciones de Triton X-100.

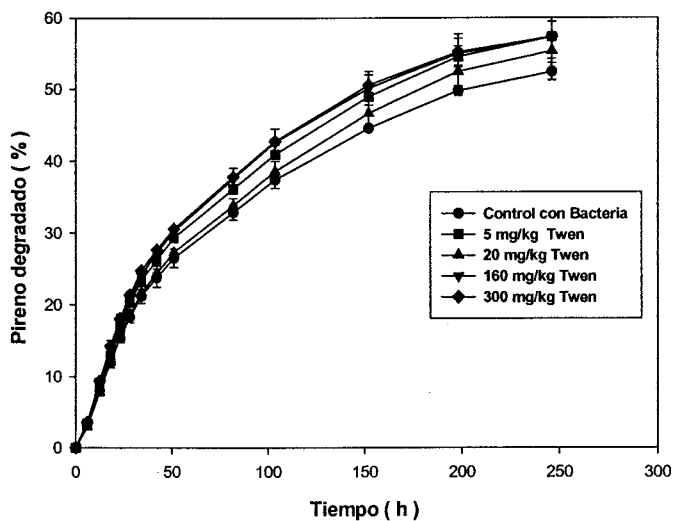


Fig. III.3.D: Biodegradación de pireno en suelos inoculados con *Mycobacterium* sp. LB208 y en presencia de distintas concentraciones de Tween 80.

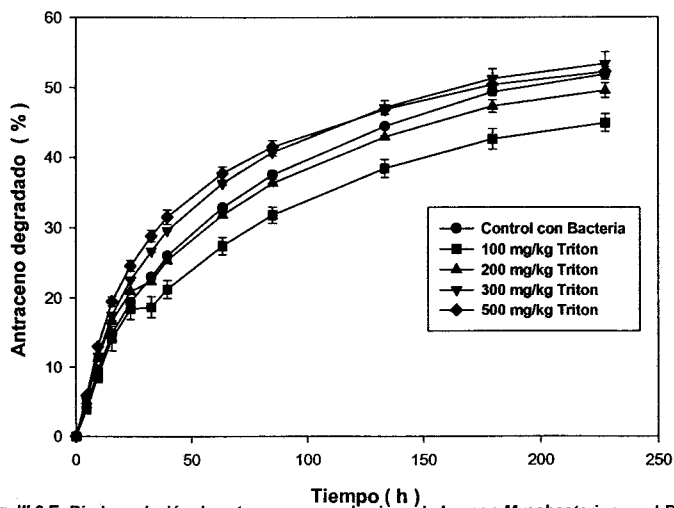


Fig. III.3.E: Biodegradación de antraceno en suelos inoculados con *Mycobacterium* sp. LB501T y en presencia de distintas concentraciones de Triton X-100.



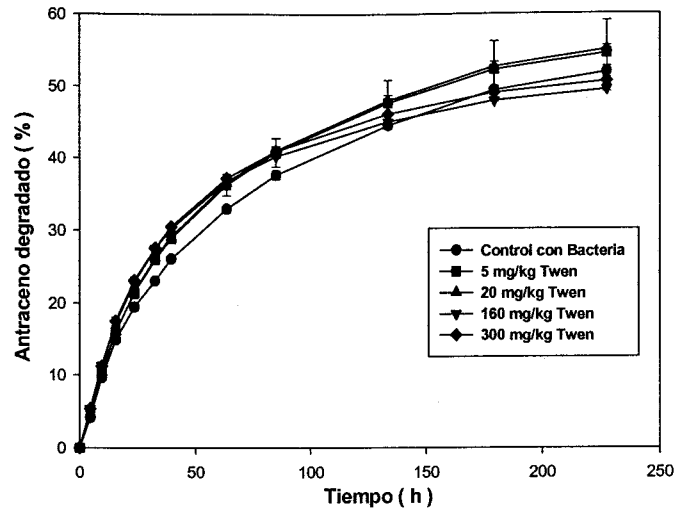


Fig. III.3.F: Biodegradación de antraceno en suelos inoculados con *Mycobacterium* sp. LB501T en presencia de distintas concentraciones de Tween 80.

diferente ( $49.93 \pm 0.116$  y  $49.34 \pm 0.721$  % en presencia y en ausencia de la bacteria LH128, respectivamente) (Fig. III.2C).

### **III.3.- Efecto de los tensioactivos Triton X-100 y Tween 80 sobre la biodegradación de los hidrocarburos en suelos contaminados**

También se usó un rango de concentraciones de 100, 200, 300 y 500 mg/kg de Triton X-100 y 5, 20, 160 y 300 mg/kg de Tween 80 a la misma muestra del suelo (S1), pero en presencia de tres tipos de hidrocarburos: fenantreno, antraceno y pireno, inoculando, respectivamente, con las estirpes LH128, LB208 y LB501. No obstante, no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos ((Fig. III.3A, B, C, D, E y F)).

## **DISCUSIÓN**

El comportamiento de los componentes del suelo respecto a los compuestos orgánicos hidrófobos ha sido desde hace tiempo objeto de interés para muchos investigadores. No obstante, existen pocos estudios en los que se combinan los procesos físico-químicos implicados (adsorción) con los biológicos (biodegradación, transporte). Por esta razón surgió el estudio descrito en la presente memoria.

## **I.- Efecto de los distintos componentes del suelo sobre la biodisponibilidad de fenantreno.**

### **I.1.- Biodegradación de fenantreno en suelos de diferente composición.**

En los cinco suelos estudiados, el fenantreno fué mineralizado por la población microbiana autóctona presente en los suelos. Las tasas y las amplitudes de mineralización obtenidas fueron estadísticamente más bajas en los suelos con un mayor contenido en materia orgánica. También se observaron diferencias en la mineralización en los suelos con un similar contenido en materia orgánica, pero con diferente contenido en arcilla, lo que indica que este componente también juega un papel en el control de la biodisponibilidad de este compuesto hidrófobo.

La mineralización de fenantreno con *Pseudomonas fluorescens* comenzó sin fase de aclimatación, tanto en un medio líquido como en los suelos inoculados. La tasa de mineralización en los suelos fué más baja que en medio líquido debido a que el fenantreno es un compuesto altamente hidrófobo, y esta propiedad provoca su rápida asociación a las superficies sólidas en el suelo. La reducción de la concentración de sustrato de la fase acuosa debido a adsorción podría ser la causa de la disminución en la tasa y en la amplitud de la transformación microbiana. El mayor contenido en materia orgánica en algunos suelos condujo a una mineralización reducida, debido a la gran capacidad de adsorción que presenta la materia orgánica del suelo.

La inoculación de los suelos con bacterias exógenas eliminó la larga fase de aclimatación para la destrucción biológica de fenantreno en los suelos. No obstante, los resultados sugieren que las bacterias exógenas tienen las mismas limitaciones que aquellas presentes en la población bacteriana autóctona. En ambos casos la biodegradación fue claramente inhibida en suelos con mayor contenido en materia orgánica. Esto es significativo, dado que el cultivo a gran escala de microorganismos

degradadores para su introducción en los suelos contaminados, que es una práctica común de las compañías de biorremediación (167).

## **I.2.- Capacidad de adsorción de los suelos.**

Para estimar que si la biodegradabilidad diferencial observada en nuestro estudio podía ser atribuida a la adsorción a las partículas del suelo, la capacidad de adsorción de los cinco suelos se estimó por determinación de la concentración acuosa de fenantreno en suspensiones de los suelos. Los resultados mostraron de nuevo el efecto de la materia orgánica. Estos datos están en acuerdo con estudios anteriores sobre la adsorción de compuestos hidrófobos por los suelos en sistemas acuosos (39). Los datos de mineralización diferentes en los suelos 1, 2 y 3 pueden ser explicados en términos de adsorción a la materia orgánica del suelo (MO), dado que las bajas concentraciones de fenantreno en solución están relacionadas con unas bajas tasas y amplitudes de mineralización. Estos resultados están en acuerdo con los obtenidos por Weissenfels y col. (215), que observaron una fuerte adsorción de HPAs, incluyendo fenantreno, a la MO, y, consecuentemente, una disminución en la biodegradación. Encontraron que en un suelo contaminado, conteniendo un gran porcentaje de OM, la biodegradación no se produjo incluso después de añadir nutrientes y bacterias degradadoras de HPA. En cambio, la extracción de los HPAs y la adición del material extraído al suelo condujo a una rápida biodegradación por las bacterias introducidas. Los autores concluyeron que los enlaces físicos o la adsorción de los HPA al suelo fueron la causa de la falta de mineralización inicial. Manilal y Alexander (131) compararon las tasas de mineralización de fenantreno en cuatro suelos, y encontraron una clara reducción en el suelo con gran contenido de MO, en comparación a otros tres suelos con menos contenido en MO. La adsorción en el suelo también ha afectado negativamente la transformación bacteriana de otros contaminantes orgánicos, tales como naftaleno (80), tolueno (173), estireno (67) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (152).

Las diferencias en la mineralización de fenantreno entre los suelos 2, 4 y 5 ( con similar contenido en MO pero con distintas cantidades de arcilla) no pueden ser explicadas solamente sobre las bases de adsorción. Por otra parte, la arcilla parece no ser el único factor que ha reducido la mineralización en estos suelos, dada la activa biodegradación observada en el suelo nº 1, con un contenido en arcilla parecido a aquel del suelo nº 4. Los datos sugieren que una cierta cantidad de MO es necesaria para la

observación de este efecto. Estos resultados pueden ser explicados por el aumento de la tortuosidad causada por el gran contenido en arcilla. Este concepto ha sido postulado por (1) como un factor importante en la biodisponibilidad en ecosistemas particulados (suelos, subsuelos y sedimentos). Se refiere a un aumento en el camino de difusión de las moléculas debido a la presencia de las partículas. La combinación de adsorción-desorción, difusión y tortuosidad pueden afectar la adquisición de los contaminantes biodegradables por las bacterias del suelo, las cuales están adsorbidas a la superficie de las partículas y dependen del flujo de los nutrientes a través de las estructuras del suelo. Este aumento en la tortuosidad puede ser la causa de la mineralización reducida en los suelos n° 4 y 5, donde la combinación de la MO y la arcilla reduce la accesibilidad de fenantreno a las bacterias, debido a un aumento en las superficies donde el compuesto puede ser retenido durante su tránsito antes de su biodegradación.

El compuesto modelo también se añadió a un suelo de baja cantidad en MO - 0,8 % (suelo n°1), adsorbido a la arcilla o a los complejos. El fenantreno adsorbido a la arcilla fué más biodisponible y fácilmente degradado que el adsorbido al complejo arcillo-húmico, (Ca-Swy)-AH. Esto sugiere que la interacción entre el fenantreno y las partículas añadidas es más fuerte cuando contienen el ácido húmico, incluso considerando la baja proporción de ácido húmico que está presente en las partículas. Esto podría ser explicado por una mayor tasa de desorción a partir de la arcilla que a partir de los complejos arcillo-húmicos. La causa de estas diferencias podría ser las limitaciones de la transferencia de masa dentro de las partículas causada por la presencia del ácido húmico. Los complejos sintéticos pueden haber funcionado como los complejos naturales del suelo, a partir de los cuales la tasa de desorción de los compuestos orgánicos hidrófobos está retardada por su reparto entre los poros fluidos intra-agregados y los sólidos rodeando a los agregados (223).

La naturaleza de la fracción húmica presente en los complejos también afecta la transformación. El fenantreno adsorbido al complejo arcillo-fúlvico fue más fácilmente degradado que aquel adsorbido al complejo arcillo-húmico. Los ácidos fúlvicos son menos hidrófobos que los ácidos húmicos (162), y su interacción con el fenantreno podría ser más débil. Aunque la influencia de la adsorción de la materia orgánica del suelo sobre la biodegradación fue clara, nuestros resultados sugieren que las interacciones entre las fracciones húmicas y la arcilla en los suelos son también un factor importante en la biodegradación de los contaminantes hidrófobos en los suelos.

### **I.3.- Efecto de los líquidos en fase no acuosa (NAPLs) sobre la biodisponibilidad de HPA en suelos**

#### **I.3.1.- Efecto de la identidad y dispersión del NAPL**

Cuando se comparó el efecto de diferentes NAPLs modelo sobre la biodisponibilidad de fenantreno, se observó una mayor tasa de mineralización en presencia del HD, en comparación a DBP y HMN. Este efecto de la identidad de los NAPLs sobre la biodegradación de sus constituyentes se ha observado previamente (57,117). En otro trabajo (117), se ha observado que la mineralización en suelo de fenantreno disuelto en HMN es más rápida que cuando el mismo compuesto está inicialmente disuelto en ftalato de di-2-etilhexilo (DEHP) o en DBP.

El uso de diclorometano como forma de incrementar la superficie del NAPL resultó en una inhibición casi completa de la degradación. Es posible que esta inhibición se deba a un posible incorporación del diclorometano al DBP por reparto, lo cual hubiera impedido su eliminación total a pesar de que se dejó evaporar durante un tiempo prolongado (dos días) antes de la inoculación. Al estar presente en el NAPL, la volatilidad del compuesto se redujo notablemente (al cambiar su constante de la Ley de Henry (184), que marca el intercambio líquido-gas). De esta forma, el diclorometano ejerció su efecto tóxico sobre las bacterias de forma continua, por el lento reparto del NAPL a la fase acuosa y gaseosa del suelo, impidiendo la mineralización de los HPA. Estos resultados evidencian el efecto notable que ejercen los NAPLs sobre el comportamiento físico-químico de los contaminantes en el suelo. Asimismo, sugieren las dificultades que pueden surgir con el uso de solventes orgánicos durante procesos de recuperación de emplazamientos contaminados por NAPLs.

### **I.3.2.- Efecto de tensioactivos biológicos sobre la biodegradación de HPAs en NAPLs**

Diferentes hipótesis pueden explicar el efecto inhibitorio de la bacteria degradadora de HD, que posiblemente producía biotensioactivos, sobre la biodegradación de fenantreno secuestrado en los tres NAPLs estudiados: HMN, HD y DBP. En primer lugar, esto se puede atribuir a la posible competencia por nutrientes y oxígeno del medio. En segundo lugar, puede haber ocurrido la adsorción del sustrato por las bacterias degradadoras del HD (196). Además, la adhesión de estas bacterias a la interfase NAPL-agua puede haber limitado el reparto de fenantreno hacia la fase acuosa, así como puede también haber afectado negativamente el contacto directo de la bacteria degradadora de HPA con el NAPL, lo cual le permitiría la toma directa del sustrato. Por último, también se puede pensar que el biotensioactivo actuó disminuyendo la concentración del sustrato en el medio acuoso, al concentrar el sustrato en la fracción micelar. Se concluye que el uso de bacterias productoras de biotensioactivos no siempre resulta beneficioso para la estimulación de la biodisponibilidad.

No obstante, el uso de la bacteria degradadora de hexadecano en presencia de HMN provocó una estimulación muy importante de la biodegradación de naftaleno por *Clavibacterium xyli* S1. Esta estimulación se puede explicar por el posible efecto del biotensioactivo producido por la bacteria degradadora de HD, aumentando el reparto del naftaleno a la fase acuosa. El mismo efecto se ha visto también con el HD y el DBP como NAPL, pero menos pronunciado. Las diferencias observadas entre los dos compuestos modelo estudiados pueden deberse a sus distintas propiedades fisicoquímicas, incluyendo su solubilidad y coeficiente de reparto octanol-agua, que pueden haber modificado el efecto de los biotensioactivos ya descrito, en un sentido u otro.

### **I.3.3.- Efecto de tensioactivos sintéticos sobre la biodegradación de HPAs en NAPLs**

En la misma línea de estudio de los factores que puedan aumentar la biodisponibilidad de fenantreno en NAPLs, la adición del tensioactivo sintético Triton X-100 no mostró un efecto importante en presencia de HD o DBP. No obstante, la



aplicación de agitación a las muestras con HD o DBP provocó una clara estimulación de la degradación de fenantreno. Esta estimulación posiblemente se debió a un incremento la tasa de reparto desde el NAPL al medio acuoso, lo que permitió una toma continua por las bacterias degradadoras de HPA desde la fase acuosa, y/o al aumento del contacto directo de los NAPLs con la pared celular, que permitió el uso directo del substrato desde el NAPL. El estudio del efecto combinado de la agitación y de la bacteria degradadora de HD reveló una cierta regresión de la tasa de mineralización respecto a la agitación sola, lo que se puede explicar de la misma forma mencionada anteriormente.

El efecto combinado de la agitación y de Triton X-100 respecto al HD resultó inhibitorio respecto al control sin tensioactivo. Este efecto se puede explicar por la limitación de la difusión del substrato a la bacteria desde las micelas del tensioactivo, así como por la interacción de este último con biomoléculas esenciales para la degradación de fenantreno. En el trabajo de Kwee et al (116) se menciona que el Triton X-100 podría asociarse a las proteínas de la membrana a concentraciones por muy por debajo de la concentración crítica micelar (CMC) lo que se puede hablar de una inhibición que asociada a los monómeros. De esta forma, los monómeros de tensioactivo podrían ser más perjudiciales para los componentes de la superficie celular relacionados con la degradación fenantreno que las estructuras micelares. El Triton X-100 puede solubilizar la bicapa lipídica de la membrana celular mediante su incorporación a dicha bicapa, destruyendo su orientación natural y alterando su permeabilidad. A altas concentraciones de tensioactivo, la membrana se satura del mismo, lo que provoca su disolución (6,82,91,99,186). Además de los lípidos, las proteínas asociadas a la membrana pueden interaccionar con los tensioactivos sintéticos, como el caso del Triton X-100, formando complejos que podrían provocar un cambio en su conformación y posiblemente su desplazamiento de membrana (176). Tal interacción sería inhibitoria para la biodegradación si las proteínas fueran enzimas esenciales para la transformación o el transporte del substrato.

Al contrario que Triton X-100, Tween 80 provocó una estimulación de la tasa de degradación de fenantreno, debido a su carácter no tóxico. En este caso, las estructuras de ácido graso presentes en los ésteres de polioxietileno de sorbitol (Tween 80) pueden incorporarse al interior de la membrana bacteriana, (6,82,99) pero sin ningún efecto sobre la disolución de la membrana lipídica (222). Por tanto, la compatibilidad del tensioactivo con la estructuras bioquímica de la membrana celular bacteriana podría ser

una importante consideración en la selección de los agentes deseados para aumentar la biodegradación de contaminantes hidrófobos en suelos.

También existe la posibilidad de que el tensioactivo impida la adhesión de la bacteria al NAPL, lo que obliga a utilizar solamente el sustrato presente en la fase acuosa (56). No obstante, la agitación y la adición de Triton X-100 en presencia de DBP indujo ningún cambio respecto a la agitación sola, lo que indica que con este NAPL se inactivaron los mecanismos postulados anteriormente para el HD. Estos resultados confirman una vez más el efecto de la identidad del NAPL en la biodisponibilidad del sustrato.

El efecto del Triton X-100 sobre la mineralización de naftaleno fue, a diferencia que con fenantreno, claramente estimulador, y más pronunciado con el DBP que con el HD. Esta estimulación se puede explicar por al menos dos mecanismos (i) la dispersión del NAPL, conduciendo a un aumento de la superficie de contacto, lo cual está causado por una reducción de la tensión de la superficie entre la fase acuosa y no acuosa y (ii) el transporte facilitado del contaminante desde la fase sólida hacia la fase acuosa, lo cual puede ser causado por un número de fenómenos, tal como la disminución de la tensión de superficie del agua del poro en las partículas del suelo, la interacción del tensioactivo con las interfases sólidas y la interacción del contaminante con las moléculas individuales del tensioactivo. La diferencia observada en la tasa de degradación entre el HD y el DBP se puede explicar por el efecto negativo que tiene el Triton X-100 sobre la adhesión de la bacteria al HD, lo que afecta negativamente el uso del sustrato directamente del NAPL.

#### **I.3.4- Efecto combinado de la fuente de carbono de pre-cultivo de la bacteria y de Triton X-100 o de Tween 80 sobre la biodisponibilidad de fenantreno disuelto en DBP**

El hecho de cultivar la bacteria en presencia de naftaleno indujo una cierta estimulación de la tasa de degradación de fenantreno en comparación con la misma bacteria cultivada con el fenantreno y usada en el experimento de mineralización con el mismo sustrato. Este resultado se puede atribuir a una posible expresión de alguna proteína de membrana o una exoenzima que no funcionaba en el experimento de mineralización no cruzado.

En este trabajo, la sensibilidad al Triton X-100 puede haber sido provocada por un mecanismo fisiológico desencadenado probablemente durante la fase de crecimiento de la bacteria. Durante ésta una serie de enzimas que participan en la estabilidad y la protección de la pared celular no se han producido en presencia del naftaleno como fuente de carbono y de energía. Otra posibilidad es que cuando la bacteria crece en presencia de naftaleno algunas proteínas que suelen estar protegidas de los tensioactivos se encuentran expuestas a ellos.

### **I.3.5- Efecto combinado de la fuente de carbono de pre-cultivo de la bacteria y de Triton X-100 o de Tween 80 sobre la disponibilidad de naftaleno disuelto en DBP**

El hecho de cultivar la bacteria con fenantreno ha permitido estimular la tasa y la amplitud de mineralización de naftaleno en un volumen de 3 ml. Sin embargo, en un volumen de 0,5 ml no se notó un efecto importante sobre la tasa de mineralización. Esto se puede explicar porque en presencia de pequeños volúmenes de NAPL la bacteria no tiene grandes dificultades para usar el substrato secuestrado mientras que en presencia de grandes volúmenes la biodisponibilidad disminuye. La estimulación observada al volumen de 3 ml se puede explicar por el hecho que la bacteria podría haber utilizado algunas proteínas que activan la degradación de naftaleno que no se expresaron cuando la bacteria se pre-cultivó con el naftaleno.

Visto los efectos interesantes encontrados con fenantreno, donde se vió que el efecto de la fuente de carbono aumentó la sensibilidad de *Clavibacterium xyli S1* al Triton X-100 que se manifestó en la disminución de su capacidad degradadora. En esta parte del trabajo se vió la ausencia del efecto inhibitorio excesivo de Triton X-100 sobre la tasa de mineralización de naftaleno. Estos resultados se pueden explicar por la presencia de un mecanismo protector de la bacteria, contra el efecto de Triton X-100, que se desarrolló cuando la fuente de carbono de pre-cultivo era fenantreno y se inhibió cuando la fuente de carbono de pre-cultivo era naftaleno .

El tensioactivo tween 80, a un volumen de NAPL de 3 ml indujo una estimulación clara, sobre todo a una concentración de 160 mg/ kg. Esto muestra que Tween 80 es más eficaz en las condiciones de secuestro mas complejas (3 ml de DBP) (11) y (155), aumentando la difusión del substrato o la dispersión del NAPL, lo que ha podido aumentar la biodisponibilidad de naftaleno.

Muchos autores han comentado que el aumento de la disponibilidad es muy específico de la estirpe bacteriana y es dependiente de la composición de la pared celular y de las características de la superficie celular y de los mecanismos de la obtención del substrato (219). Nuestro trabajo aporta una nueva información, indicando que, según el tipo de la fuente de carbono y de energía, la misma bacteria puede orientar el mecanismo de producción de las proteínas y las enzimas de membrana hacia proteínas que puedan mantener o disminuir su resistencia al Triton X-100.

## **II.- EFECTO DE PARTICULAS MODELO DEL SUELO SOBRE LA BIODISPONIBILIDAD DE HPA**

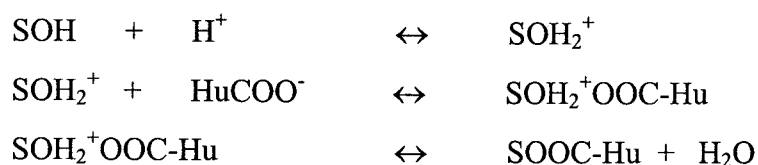
Los resultados mostrados en el presente trabajo indican que la adsorción a las superficies de las partículas puede incrementar, disminuir o no tener efecto sobre la biodisponibilidad de fenantreno, dependiendo de la cantidad y la calidad de la fracción húmica adsorbida y de la concentración inicial de substrato. El efecto general de la adsorción sobre la biodisponibilidad parece estar más controlado por el comportamiento de desorción del compuesto que por la concentración acuosa alcanzada en el equilibrio de la adsorción agua-sólido. La adsorción del compuesto como forma fácilmente desorbible o bien no presenta efecto sobre la biodisponibilidad o bien la aumenta. En cambio, la adsorción como forma resistente a la desorción hace que el compuesto esté altamente no biodisponible.

### **II.1. Mecanismos de adsorción-desorción**

#### **II.1.1. Papel de la materia orgánica**

La mayor capacidad de los complejos arcillo-húmicos, en comparación al de las partículas de arcilla, de adsorber HPAs puede ser atribuida a la presencia de materia orgánica en las partículas a las que este compuesto hidrófobo puede estar asociado. Esta asociación ha sido encontrada anteriormente entre los compuestos hidrófobos y sorbentes modelos y naturales con diferentes contenidos de materia orgánica, y ha sido explicada en términos de adsorción hidrófoba o reparto (45,145).

La distribución de las zonas hidroxilo de la superficie de la arcilla, que representan los puntos de asociación de los grupos carboxilo de la sustancia húmica, afectan la configuración de la interfase de la capa húmica posiblemente, alterando el tamaño o la accesibilidad del dominio hidrófilo (7). En nuestro estudio, se utilizó una solución acuosa a pH alto como medio de adsorción a la arcilla para permitir a la macromolécula húmica adoptar una conformación abierta, debido a la repulsión electrostática entre las cargas de los grupos ácidos. En la solución acuosa la asociación de las superficies hidrófobas del ácido húmico tiene lugar a través de atracción hidrófoba. La mayoría de las zonas hidrófobas de las moléculas del ácido húmico están escondidas de los contactos con las moléculas de agua por los grupos hidrófilos, es decir, las zonas hidrófobas tienen tendencia de estar en la parte inerte de la molécula donde el contenido en agua es bajo. Por tanto, en la superficie externa de las moléculas del ácido húmico están expuestos principalmente los grupos hidrófilos. La asociación hidrófoba puede tener lugar solamente después de algunas reorganizaciones estructurales de las moléculas de ácido húmico. Sposito (191) ha propuesto las siguientes etapas para la formación de complejos, en la que las superficies de los oxihidróxidos de metal y las superficies de los bordes de las partículas de la arcilla pueden reaccionar con los ácidos orgánicos cargados negativamente a través de un mecanismo de intercambio de ligandos entre los grupos protonados  $\text{OH}_2^+$  y  $\text{COOH}$ :



Donde SOH representa el grupo hidroxilo de la superficie del sorbente y  $\text{Hu-COO}^-$  es el grupo carboxilo húmico.

Una vez adsorbido sobre una superficie inorgánica, algunas características del ácido húmico, incluyendo su capacidad de adsorber HPA, pueden ser alteradas con respecto a su condición original en la fase acuosa. Como los compuestos orgánicos usados en este trabajo son exclusivamente hidrófobos, entonces las asociaciones de las superficies de los componentes del suelo con los HPA estudiados tienen lugar a través de atracción hidrófoba. Esta atracción se realiza a través de dos mecanismos fundamentales: reparto y adsorción hidrófoba. El reparto es la transferencia de un soluto

desde la fase acuosa que lo rodea en una orientación tridimensional. La adsorción hidrófoba es una reacción de superficie que ocurre en competencia con el agua en una región de la superficie (sea orgánica o inorgánica) que expone una baja energía de hidratación.

Los valores de  $K_{oc}$  de los complejos arcillo-húmicos y arcillo-fúlvicos están muy cerca del valor teórico de 23.0 ml/g, estimado a partir del coeficiente de reparto agua-octanol ( $K_{ow}$ ) de fenantreno(109), lo cual soporta la idea de que ha habido un reparto substancial de fenantreno dentro de las fracciones húmicas. En cambio la sobreestimación con respecto al valor de reparto predicho por  $K_{oc}$ , en el caso de los complejos que contienen el ácido fúlvico, sugiere que la adsorción hidrófoba también ocurre en el sistema. Con valores bajos de  $f_{oc}$  ( $f_{oc} < 0.01$ ), como aquellos encontrados en los complejos arcillo-fúlvicos, la adsorción hidrófoba ocurre como resultado de la reducción de la fase orgánica en la cual los solutos pueden adsorberse por reparto, lo cual causa un incremento progresivo de los  $K_{oc}$  experimentales y desviarse de los valores predichos de  $K_{ow}$  (153). La gran polaridad de los ácidos fúlvicos, reflejado en la proporción elemental O:C (43), podría también haber contribuido a los enlaces hidrófobos, como ya se ha encontrado con respecto a la adsorción de pireno a la materia orgánica disuelta (71).

El importante papel de la materia orgánica sobre la adsorción también se reflejó en que los coeficientes de distribución ( $K_d$ ) de fenantreno aumentaban con una mayor cantidad del carbono orgánico en el sistema. La adsorción de fenantreno a los complejos arcillo-húmicos aumentó a mayores valores de  $f_{oc}$ . A gran  $f_{oc}$ , las isothermas son de tipo C, lo que indica la ocurrencia de reparto. En los sistemas de baja  $f_{oc}$  como el caso de Ca-SWy y (Ca-SWy)-AH1 las isothermas son tanto del tipo C-S (76) como del tipo L y S (153), lo que indica una adsorción y una condensación.

El estudio de la desorción en sistema batch mostró el efecto claro del contenido en materia orgánica sobre la desorción. En los complejos con más materia orgánica existen más zonas hidrófobas y huecos con paredes hidrófobas que limitan la desorción. No obstante, el estudio de la desorción en columnas de suelo en presencia de los distintos componentes del suelo no mostró tan claramente el efecto del contenido de la MO sobre la desorción. Esto es explicable en base a procesos de readsorción del compuesto durante su migración a través de las columnas.

La adsorción de fenantreno a las partículas de arcilla sin materia orgánica en los sistemas acuosos ha sido baja, aunque detectable. Este resultado puede ser atribuido a la

gran superficie expuesta por las partículas de arcilla, la cual permite la adsorción hidrófoba. Esta capacidad de las superficies minerales de adsorber los compuestos hidrófobos en las suspensiones acuosas ha sido anteriormente mencionada en un estudio de adsorción de antraceno (lo cual tiene un  $K_{ow}$  comparable al de fenantreno) a kaolinita y a hematita (144). Los hidrocarburos poliaromáticos de tres anillos parecen estar sujetos a una mayor adsorción hidrófoba a las superficies minerales que en el naftaleno, que es un hidrocarburo poliaromático de dos anillos, menos hidrófobo y que no se adsorbe a las partículas de arcilla en suspensión (81,130).

### II.1.2. Papel del hierro en solución

El fenantreno presentó diferentes isotermas de adsorción a Ca-SWy en agua o en ausencia de  $Fe^{3+}$  en solución. En agua, en ausencia de  $Fe^{3+}$ , la isoterma exhibió una curvatura cóncava, indicando una resistencia inicial de las moléculas de fenantreno a ser adsorbidas por competencia con el solvente, lo que ha resultado en una tipología C-S. La isoterma de tipo-S indica una débil atracción del adsorbato por la superficie del adsorbente, pero una vez las primeras moléculas están adsorbidas se favorece la adsorción por fuerte asociación entre las moléculas adsorbidas (76). En presencia de hierro el aspecto de la isoterma de adsorción cambia drásticamente al tipo H-L, lo que indica interacciones específicas y muy fuertes entre adsorbato y adsorbente (76). Por tanto, la presencia de hierro ha aumentado la adsorción de fenantreno incluso a concentraciones muy bajas. El hierro en solución podría haber entrado entre las láminas de la esmectita por intercambio de  $Ca^{2+}$ , aumentando la superficie de atracción de la arcilla por las moléculas de fenantreno. Esto lo sugiere la disminución de la concentración del hierro en el medio. El intercambio de  $Ca^{2+}$  por  $Fe^{3+}$  implica una disminución de la hidratación del agua asociada con los cationes intercambiables, aumentando la disponibilidad de las superficies siloxano no cargadas (31,49). Además, la saturación de las arcillas con  $Fe^{3+}$  generalmente implica la presencia de algunos protones en el espacio interlaminares (92,208), los cuales favorecen la liberación de la superficie de siloxano. La adsorción fenantreno podría haber estado asociada a las zonas hidrófobas de los espacios interlaminares de la esmectita. El papel de  $Fe^{3+}$  como cation intercambiable entre láminas se ha confirmado por la isoterma de adsorción de fenantreno sobre Fe-SWy, lo que indica que la simultaneidad de intercambio de  $Ca^{2+}$  por  $Fe^{3+}$  con la adsorción fenantreno favorece la entrada de las moléculas del HPA a

baja concentración. Además, la interacción hidrófoba es suficiente para sobrepasar el impedimento estérico causado por el intercambio de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Fe}^{3+}$ , lo cual aumenta el espacio interlaminar de 1.4 nm de  $\text{SwyCa}^{2+}$  a 12.8 nm de  $\text{SWy-Fe}^{3+}$  (49). El aumento de la adsorción de los compuestos orgánicos en las esmectitas saturadas en  $\text{Fe}^{3+}$  ha sido demostrado con herbicidas de baja solubilidad en agua, tales como atrazina y simazina (30,31,49) y 2-4 D (49).

Los difractogramas de rayos-X de las esmectitas Ca-SWy y Fe-SWy después de diversos tratamientos mostraron cambios muy importantes en sus espacios basales. Los resultados indican que las moléculas de fenantreno han entrado entre las láminas, pero con una distribución irregular; el primer valor a 1.36 nm corresponde al espacio interlaminar con pocas moléculas de fenantreno, y el segundo valor a 1.08 nm podría corresponder a algunos espacios interlaminares dilatados de segundo orden, conteniendo más moléculas de fenantreno concentradas. Por tanto, el espacio de primer orden (cerca de 2.0 nm) no se ha desarrollado. El análisis de la muestra de Ca-SWy sucesivamente tratada con fenantreno en presencia del  $\text{Fe}^{3+}$  confirmó la entrada regular de las moléculas de fenantreno en el espacio interlaminar, mostrando una dilatación de más de 1.0 nm.

La adsorción de fenantreno estimada por determinación del coeficiente de distribución, con el objetivo de comparar los diferentes sistemas tal como Ca-SWy y el complejo (Ca-SWy)-AHs3, indicó que el medio de cultivo elimina el efecto de la presencia del hierro sobre la adsorción. Este bloqueo podría ser debido a la presencia de otros cationes en la solución, tales como Na, Mg, Ca, K y  $\text{NH}_4^+$ , que compiten con el hierro por reacción de intercambio en las zonas de carga en la arcilla. Además, las sales inorgánicas presentes en el medio podrían haber causado una reducción en la concentración de hierro libre, disponible para el intercambio, debido a la precipitación. La disminución del efecto del hierro con (Ca-SWy)-AHs3 confirma una vez más el papel del hierro como especie interlaminar intercambiable. En efecto, la adsorción de fenantreno al complejo húmico (Ca-SWy)-AHs3 está principalmente asociada a la superficie externa de las partículas, lo que provoca que se bloquee parcialmente el acceso de las especies iónicas del hierro al espacio interlaminar (30,31).

La asociación del ácido húmico a la arcilla aumenta la adsorción de fenantreno en agua y en medio de cultivo debido a la contribución de la adsorción hidrófoba sobre el AH. Los cambios observados en la adsorción de fenantreno en presencia del medio de



cultivo pueden tener importantes implicaciones en la interpretación de los resultados de los experimentos de biodisponibilidad.

Cuando el medio de cultivo estaba presente durante la adsorción de fenantreno, la desorción ha sido mayor. Las notables diferencias observadas con Ca-SWy en presencia de hierro sin y con medio de cultivo se pueden explicar en base a que en el primer caso todo el fenantreno está en los espacios interlaminares de las esmectitas, estabilizado por fuertes interacciones hidrófobas con las superficies siloxano y es muy difícil de liberar. La desorción en el caso de pireno adsorbido a la arcilla ha resultado en una notable liberación, sugiriendo una débil adsorción externa. En cambio, en presencia de hierro en solución o con la presencia inicial de hierro en el espacio interlaminar como cation intercambiable, el pireno se ha comportado como el fenantreno, adsorbiéndose en el espacio interlaminar de las esmectitas.

## **II.2. Biodegradación de HPA en presencia de partículas modelo**

### **II.2.1.- Efectos estimulatorios de componentes modelo del suelo sobre la biodegradación de fenantreno en suspensiones bacterianas**

El estudio de la presencia de la arcilla en el medio reveló una importante estimulación de la mineralización, proporcional a la concentración de arcilla, hasta una concentración óptima de 5 g/l. Esta estimulación puede deberse a un posible cambio en la composición química del medio de mineralización inducido por la arcilla, favoreciendo la actividad metabólica de la bacteria. También se puede deber a la capacidad de adsorción de fenantreno por la arcilla, que puede aumentar la degradación del sustrato, como se ha sugerido previamente (4). Cuando la bacteria se adsorbe a la superficie de la arcilla es muy probable que las bacterias y los productos químicos sean adsorbidos en zonas adyacentes, lo que puede facilitar la biodegradación, si la adsorción es débil. Las bacterias adsorbidas pueden experimentar una alta concentración local del sustrato adsorbido, mayor que la presente en solución, lo que ha conducido a esta estimulación. Este efecto estimulatorio no se ha observado con contaminantes orgánicos no hidrófobos, tales como el diquat (169) o la bencilamina (124), cuya asociación a la arcilla por procesos de adsorción ha implicado un efecto inhibitorio.

A una baja concentración de fenantreno, ocurrió una estimulación en presencia de la arcilla y de los complejos arcillo-fúlvicos. La ocurrencia de adsorción hidrófoba,

que conduce a forma de fenantreno adsorbido localizado en superficie y fácilmente desorbible, puede ser la responsable de la estimulación, especialmente considerando que las bacterias y las partículas de arcilla aparecen físicamente asociadas en las suspensiones acuosas (61). La falta de estimulación por los complejos arcillo-húmicos fué probablemente debida a una baja proporción de fenantreno fácilmente desorbible en los complejos. El fenantreno adsorbido a las partículas sólidas podría estar completamente disponible a la biodegradación después de su desorción desde de las partículas depositadas sobre las bacterias, constituyendo de esta manera un aporte de substrato adicional a aquel ofrecido por difusión desde la fase acuosa. Una explicación alternativa a tal estimulación podría estar basada en la capacidad de intercambio de cationes de la montmorillonita y otro tipo de arcilla. Esta capacidad estimula indirectamente la respiración bacteriana en suspensiones no tamponadas al captar los protones producidos durante el metabolismo, manteniendo los niveles fisiológicos (195). Sin obstante, este efecto indirecto puede ser descartado en este estudio, dado que el medio estaba tamponado a pH 5.6.

El ácido fúlvico disuelto también indujo una estimulación de la mineralización de fenantreno a una concentración de 0.1 g/l. Esto se puede explicar por un posible cambio del metabolismo bacteriano inducido por la presencia del ácido fúlvico, como resultado de una acción de éste sobre algún precursor enzimático no disponible. La influencia de las sustancias húmicas sobre procesos fisiológicos microbianos tales como el crecimiento, la respiración, la fotosíntesis y la fijación del nitrógeno ha sido demostrada por muchos autores (63). Este efecto estimulador del metabolismo microbiano observado con bajas concentraciones de ácido fúlvico disuelto se mantuvo incluso en presencia de arcilla en suspensión, que posiblemente adsorbió también parte del ácido fúlvico. Por otra parte, a una concentración de arcilla de 10 g/l, y en presencia del ácido fúlvico, se alcanzó una inhibición total de la tasa y de la amplitud de mineralización con respecto al control. Estos resultados están en acuerdo hasta cierto de punto con las sugerencias de (209), que ha mencionado que los ácidos fúlvicos por debajo de una concentración estimulan probablemente más la actividad fisiológica. De la misma forma, Grunda (78) ha indicado que la actividad de la superficie celular es mayor con la fracción húmica de bajo peso molecular que aquella de gran peso molecular y también más alta con el ácido fúlvico que con el ácido húmico.

Los efectos fisiológicos de las sustancias húmicas observados pueden basarse en el mismo efecto que los producidos por los tensioactivos sintéticos, que aumentan la

permeabilidad de la membrana celular (78) (101). Este aumento se reflejó en una mayor disponibilidad de nutrientes, lo que indujo una estimulación del metabolismo. No obstante, a mayores concentraciones de ácido fúlvico, puede haberse provocado una desorganización de la membrana celular o una alteración de las enzimas implicadas en la actividad metabólica de la célula. También esta inhibición de la degradación de fenantreno se puede relacionar a una carencia del sustrato en el medio acuoso debido a su adsorción al complejo.

### **II.2.2.- Biodegradación de la fracción resistente a la desorción**

La presencia en nuestro estudio de una fracción resistente a la desorción está en acuerdo con los resultados de otros estudios, que indican la irreversibilidad de la adsorción de los hidrocarburos a los suelos y a los sedimentos (105). Esto sugiere una limitación causada por la lenta desorción. También se ha demostrado una biodegradabilidad limitada para la fracción resistente a la desorción de hidrocarburos policíclicos aromáticos presente en sedimentos (47) y en suelos y sólidos de acuíferos (217). Tal disminución de la biodisponibilidad ha sido atribuida al secuestro dentro de microporos o al reparto en la materia orgánica. En el presente estudio, los valores de Koc de los complejos arcillo-húmicos están de acuerdo con un reparto dentro del ácido húmico adsorbido. No obstante, no debe excluirse el secuestro del compuesto adsorbido entre las laminas de silicato de la montmorillonita, mediada por el ácido húmico. Mediante uno u otro mecanismo, una fracción importante del fenantreno resistente a la desorción quedó totalmente protegida para la biodegradación.

La cantidad de fenantreno adsorbido por el complejo (Ca-SWy)-AHs4 fue muy grande en comparación con (Ca-SWy)-AHs1, (Ca-SWy)-AHs2 y (Ca-SWy)-AHs3. Este comportamiento se puede atribuir a una probable reorganización de la superficie de la arcilla una vez asociada al ácido húmico, creando o liberando nuevas zonas hidrófobas accesibles al sustrato. Los mecanismos de reorganización del ácido húmico en las arcillas son distintos según la composición química del medio. Tal modificación de la superficie mineral por el AH se manifiesta por la ocupación de las zonas de adsorción anteriormente disponibles para el compuesto orgánico no iónico, mientras que, simultáneamente, ofrece nuevas zonas sobre el AH para la interacción. Generalmente hay poca o ninguna adsorción del compuesto orgánico a la superficie (153). El ácido húmico puede ofrecer muchos grupos funcionales capaces de interactuar con

compuestos orgánicos no iónicos. También se puede hablar de la presencia de una capa hidrófoba que adsorbe los compuestos hidrófobos, como el caso de fenantreno. En ese caso, el compuesto puede estar inmovilizado y por consecuencia disponible solamente por desorción mediante la difusión a través de las estructuras arcillo-húmicas (88). Las zonas hidrófobas presentes en los nanoporos de partículas modelo han sido determinantes en la disponibilidad de sustratos hidrófobos, y en ausencia de estas zonas el hidrocarburo puede estar solamente asociado a la superficie externa(148).

La gran concentración de materia orgánica usada en el complejo (Ca-SWy)-AHs4 puede causar la interacción entre las moléculas húmicas adsorbidas, resultando la formación de una estructura que juega el papel de una pseudomicela de materia orgánica. Esta estructura contiene un interior hidrófobo que puede jugar el papel de fase hidrófoba de reparto. Estos resultados están de acuerdo con otros trabajos que comentan que los mecanismos del secuestro de los compuestos hidrófobos necesitan el reparto al interior de la fracción orgánica del suelo (41).

El efecto de la concentración del ácido húmico sobre la reestructuración de éste último sobre la arcilla se ha manifestado también en la existencia de una fracción labil más reducida. A concentraciones altas de AH, se producen múltiples capas del AH sobre la superficie mineral. Los resultados obtenidos con los distintos complejos sugieren la existencia de un umbral de concentración de ácido húmico adsorbido, por encima del cual el comportamiento del ácido húmico cambia. Estos resultados están de acuerdo con el trabajo (157) que ha mencionado la importancia del contenido en MO en distintos suelos sobre la reducción de la biodisponibilidad. La importancia en el contenido en MO también se ha mostrado en los experimentos de envejecimiento realizado por Nam et al (149) donde se ha visto la existencia en los suelos de un umbral de 2 % de MO, por debajo del cual la adsorción se encuentra reducida. No obstante, este porcentaje es relativo, debido a la gran variabilidad en la estructura de la materia orgánica del suelo y a la influencia por las condiciones del medio.

Los resultados del experimento de mineralización de la fracción resistente a la desorción de fenantreno adsorbido a los complejos (Ca-SWy)-AHs2 y (Ca-SWy)-AHs3 concuerdan con los resultados de la desorción de la fracción resistente. Por contra, con (Ca-SWy)-AHs4 la mineralización no ha sido proporcional a la desorción. Esto se puede explicar por una desorción facilitada por las bacterias. Su actividad provocó una redistribución de fenantreno a partir del compartimento de lenta desorción hacia el compartimento de rápida desorción, y al final hacia el medio exterior, en nuestro caso el

medio acuoso (12). Nuestros resultados sugieren que la información ofrecida por la tasa de desorción de la fracción resistente, como estimación de la biodisponibilidad del sustrato adsorbido, queda condicionada por la cantidad de materia orgánica asociada a la arcilla. Mientras que se estableció una concordancia entre la mineralización y la desorción de la fracción resistente en los complejos (Ca-SWy)-AHs1, (Ca-SWy)-AHs2 y (Ca-SWy)-AHs3, con el complejo (Ca-SWy)-AHs4 la desorción fue muy lenta (por difusión) y las tasas de mineralización de fenantreno adsorbido fueron más de nueve veces mayor que la de desorción. Esto se puede explicar por la posible creación en el interior de (Ca-SWy)-AHs4 de un gradiente de concentración más acusado inducido por la bacteria, lo cual hubiera promovido la difusión y la mineralización de la fracción resistente (170).

También esta rápida biodegradación puede ser el resultado de la adquisición del sustrato por contacto directo de las bacterias con el sustrato, como indican Guerin y Boyd (80), o por desorción facilitada por un tensioactivo producido por los microorganismos (187). Nuestro estudio demuestra la existencia de algunas estructuras del ácido húmico asociado a la arcilla que pueden aumentar la biodisponibilidad del sustrato, al contrario de otros trabajos tal como (157) que confirma el efecto inhibitorio de la matriz orgánica a la hora de la degradación microbiana de fenantreno.

El estudio comparativo de las dos bacterias degradadoras de fenantreno *Sphingomonas* sp. LH 128 y *Mycobacterium* sp. LB208 frente a la fracción resistente de fenantreno adsorbida por (Ca-SWy)-AHs4 reveló que, al igual que *Calvibacter xyli* S1, eran también capaces de degradar la fracción resistente a la desorción. Esto también ocurrió con la mineralización de la fracción resistente a la desorción de otros HPA (antraceno, fluoranteno y pireno).

La alta adsorción del sustrato sobre el complejo se puede explicar por un posible aumento en la dilatación de la estructura del ácido húmico, lo que provoca, como se ha comentado (146), un aumento de su peso molecular aparente debido a una posible disminución de la presión iónica o a un aumento del pH. En estas condiciones, se da la repulsión electrostática máxima entre los grupos funcionales adyacentes, y el control de la biodisponibilidad del sustrato adsorbido probablemente depende de la configuración de la sustancia húmica adsorbida a la superficie inorgánica. Esta configuración puede depender de la densidad de la superficie, de la distribución de las zonas de reacción de la superficie presente en la superficie inorgánica, y de la estructura y la conformación de la sustancia húmica debido al número de las zonas de asociación y

al grado de ionización de los grupos carboxílicos y fenólicos en la materia húmica (103).

El estudio de la capacidad degradativa de fenantreno adsorbido a (Ca-SWy)-AHs5 por *Arthrobacter* sp., *Clavivter xyli* S1, *Sphingomonas* sp. LH128 y LH162 y *Mycobacterium* sp. LB501T no detectó ninguna correlación entre las propiedades fisicoquímicas de las cinco bacterias y la capacidad de degradación de las fracciones lábil y resistente a la desorción. Las bacterias que presentaron una mayor capacidad para degradar ambas fracciones (*Arthrobacter* sp., *Sphingomonas* sp. LH128 y *Mycobacterium* sp. LB501T) no presentaron ninguna característica en común. Estos resultados indican la existencia de un umbral de concentración de la materia orgánica asociada a la arcilla, donde, por encima, hay una mayor adsorción, una disminución en el tamaño de la fracción fácilmente desorbida y un aumento de la biodisponibilidad de la fracción resistente a la desorción. En cambio, por debajo del umbral, la adsorción es dependiente del valor de foc, existe una gran cantidad de la fracción fácilmente desorbida, y la fracción resistente a la desorción presenta una biodisponibilidad muy baja.

En cuanto al efecto del hierro en solución sobre la biodisponibilidad de HAP adsorbidos a arcillas, los resultados mostraron que la mineralización de los HPA inicialmente adsorbidos a Ca-SWy, Ca-SWy(Fe<sup>3+</sup>) y Fe-SWy tuvo una clara concordancia con el comportamiento de desorción de los substratos. Esto sugiere que el HPA adsorbido era disponible a la bacteria solamente después de ser desorbido, y que el mecanismo de la adsorción del HPA a la esmectita tiene una clara influencia sobre la biodisponibilidad. En ausencia de Fe<sup>3+</sup>, los compuestos se adsorbieron exteriormente y de una manera débil sobre Ca-SWy, siendo altamente disponibles para la bacteria. Esta estimulación se puede explicar en términos de una alta afinidad de las células bacterianas por las superficies de la arcilla. El compuesto adsorbido como forma fácilmente desorbida constituye un aporte adicional de substrato al ofrecido por difusión hacia las células (118,119).

El efecto de la toxicidad como la causa de la baja mineralización del substrato adsorbido a Ca-SWy(Fe<sup>3+</sup>) y Fe-SWy se puede descartar con los controles realizados. La baja tasa de mineralización observada después de añadir pireno disuelto en el caso de la arcilla férrica fué probablemente debida a la adsorción más rápida del substrato, en comparación a la actividad de mineralización intrínseca de la bacteria. La mayor tasa de mineralización de pireno con Ca-SWy puede también explicarse con los resultados de

adsorción, donde probablemente no se dio ningún aumento de adsorción por intercambio de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Fe}^{3+}$  en presencia de medio de cultivo.

En conclusión, nuestros resultados son coherentes con un secuestro de estos HPAs de la fase acuosa, basado en la adsorción potenciada por el intercambio de cationes en los espacios interlaminares de la esmectita. El mecanismo propuesto soporta la hipótesis del secuestro dentro de los nanoporos de los geosorbentes como una de las causas de la disminución de la biodisponibilidad de compuestos hidrófobos en el medio ambiente (125,148). Además, nuestros resultados sugieren que la presencia de arcilla puede reducir significativamente la biodisponibilidad de los HPAs bajo condiciones apropiadas en los suelos, lo cual tiene implicaciones profundas para las tecnologías de la biorremediación. El conocimiento de la composición química de la superficie de la arcilla va a ayudar no solamente en la predicción de los movimientos y la reactividad de las moléculas orgánicas en una situación ambiental pertinente pero también en el desarrollo de nuevas estrategias de prevención y de detoxificación. Por lo tanto la exploración de la química de la superficie de la arcilla puede conducir al desarrollo de nuevas tecnologías para la administración de las aguas residuales y las aguas subterráneas.

### **II.2.3.- Efecto del envejecimiento sobre la biodisponibilidad de fenantreno en presencia del Ca-SWy y del complejo (Ca-SWy)-AHs5.**

El estudio del factor tiempo sobre la biodisponibilidad de los hidrocarburos es un elemento más que está interesando a muchos investigadores debido a su importancia en el secuestro de los hidrocarburos. Los hidrocarburos incorporados a los suelos pasan por dos procesos cinéticamente distintos, en cuanto a su asociación a los distintos materiales del suelo: Un proceso rápido y uno lento. Se piensa que el proceso de adsorción inicial rápido ocurre sobre las zonas hidrófobas de las superficies del suelo, y que el siguiente proceso de adsorción está basado en la emigración de los contaminantes hidrófobos hacia las zonas menos accesibles dentro del suelo (108,173). En este último caso se habla de compuestos envejecidos.

Nuestro trabajo se ha realizado para ver el efecto del envejecimiento en tres sistemas: Suelo en presencia del complejo (Ca-SWy)-AHs5, suelo en presencia de arcilla Ca-SWy y suelo usado como control. Las tasas y las amplitudes de mineralización disminuyeron claramente con el aumento del tiempo de residencia en el

suelo en los tres casos. La reducción de la biodisponibilidad de fenantreno sugiere que la concentración del compuesto disponible a la bacteria que degrada es menor (3), (87,161,192). Estos resultados están en acuerdo con el trabajo de Hatzinger y Alexander (87), donde se ha determinado que la biodisponibilidad de fenantreno y de 4-nitrofenol a las bacterias también disminuyen cuando estos productos químicos quedan en el suelo durante largo tiempo.

Se conocen poco los mecanismos a través los cuales el compuesto queda secuestrado o envejecido en el suelo. Sin embargo, según nuestros resultados y el trabajo de Pignatello (165), la deposición del compuesto orgánico en los microporos del suelo puede ser la responsable más importante del secuestro, debido al lento reparto del compuesto químico dentro de la materia orgánica del suelo, un mecanismo que ha sido sugerido para los compuestos orgánicos hidrófobos (39). El secuestro se ha desarrollado probablemente por la difusión de la molécula dentro de espacios vacíos tan pequeños que incluso la bacteria más pequeña no puede entrar. El compuesto está por tanto no disponible, especialmente si la difusión del compuesto químico al exterior de los microporos se retrasa debido a la asociación a las paredes del poro y a la tortuosidad (192). También esta reducción de la disponibilidad se puede atribuir a la falta de la disolución del compuesto químico en la fase acuosa del interior de los nanoporos sólidos, lo que es un pre-requisito para su uso (1).

Vista la diversidad en las tasas y las amplitudes de secuestro entre los suelos y la importancia del secuestro en la determinación de la biodisponibilidad, y en el riesgo de la persistencia de los contaminantes en el suelo, es necesario un estudio para determinar el papel de las propiedades del suelo en el secuestro y establecer correlaciones para estimar el papel y la contribución de la materia orgánica, el contenido en arcilla, la nanoporosidad, la superficie, u otras propiedades del suelo que gobiernan la biodisponibilidad.

### **II.3.- Influencia de los componentes del suelo sobre el transporte de las bacterias degradadoras**

Los experimentos en columnas indicaron que los diferentes componentes sólidos del suelo ejercen distintas influencias sobre el transporte de las bacterias degradadoras de HPA. Las superficies de la arcilla retuvieron muchas de las bacterias estudiadas. Como la arcilla se ha usado en forma de agregados, adheridos a bolas relativamente



grandes de cristal, esta retención de las células no fué dominada por la intercepción directa, como se podría haber esperado con las arcillas puras, sino a la tendencia de muchas bacterias a asociarse a las superficies de arcilla. Esto está apoyado por (i) la casi nula retención de una de las estirpes, *Sphingomonas* sp. LH162, en las columnas saturadas de arcilla, (ii) las diferencias relativamente grandes en la afinidad por la arcilla entre estirpes individuales, y (iii) la despreciable tendencia a retener las bacterias de los agregados arcillo-húmicos, los cuales tienen similares dimensiones a los agregados de arcilla. Sin embargo, es posible que las superficies irregulares del suelo y de los componentes del suelo usados en este estudio puedan haber causado una retención bacteriana adicional en las columnas, diferente de aquellas atribuidas a las interacciones fisico-químicas. Esta limitación no invalida el uso de las eficiencias relativas de adhesión como indicadores del transporte bacteriano en este estudio, porque esta situación es aplicable a todas las estirpes estudiadas. El hecho que los valores de  $\alpha_t$  sobrepasen 1 solamente en las columnas con el suelo o la arcilla aislada (lo cual podría no ser posible teóricamente con esferas ideales) sugiere que algunos agregados de arcilla presente estaban actuando como un filtro por un mecanismo adicional. Cabe la posibilidad de que la arcilla haya causado alto secuestro bacteriano debido a los efectos combinados de alta eficacia de adhesión bacteriana a la columna empaquetada y a la gran probabilidad de contacto entre las bacterias y las columnas empaquetadas.

Las sustancias húmicas han estimulado notablemente el transporte de las estirpes que se habían retenido por las superficies de arcilla. De la baja retención general de las bacterias por los complejos arcillo-húmicos (la estirpe *Mycobacterium* sp. LB501T, con valores extremos de potencial zeta y de hidrofobicidad, fué una excepción), se puede ver que la asociación de la mayoría de las bacterias a los ácidos húmicos no es favorable y que los ácidos húmicos cubren de una manera eficaz las superficies de arcilla subyacente. Estos descubrimientos parecen no estar de acuerdo con las observaciones anteriores a respecto a la distribución espacial de las bacterias en el suelo, las cuales han reportado que 60 % de las bacterias del suelo están adheridas a las partículas cubiertas con la materia orgánica, aunque estas partículas contribuyen solamente al 15 % de la superficie total de la partícula (118). La divergencia puede ser resuelta por la suposición de que la mayoría de los organismos adheridos a la materia orgánica provienen más del crecimiento *in situ* que de la adhesión a partir de la fase líquida. Un vez ocurre la multiplicación, la mayoría de los microorganismos probablemente forman colonias que liberan sus descendientes al agua del suelo. La

materia orgánica puede liberar el sustrato necesario para el crecimiento de las poblaciones bacterianas adheridas y también ofrece un microclima favorable debido a su capacidad de retención de agua.

Las estirpes bacterianas usadas están cargadas negativamente, al igual que las superficies de arcilla (debido a la sustitución isomorfa en la capa octaédrica). A la fuerza iónica usada en los experimentos ( $10^{-2}$  M), esto podría conducir a una repulsión electrostática (201). Sin embargo, la atracción de van der Waals, protegiendo las fuerzas coulombicas por los cationes bivalentes y los puentes hidrógeno entre los polímeros de la superficie bacteriana y la superficie mineral pueden promover la adhesión celular (104). En nuestro estudio, estas fuerzas parecen funcionar específicamente con las superficies de arcilla, porque en las columnas saturadas de arena casi todas las bacterias pasaron sin obstáculo. Solamente *Mycobacterium* sp. LB501T tuvo una cierta tendencia a adsorberse a la arena.

Aunque nuestro sistema experimental es de similitud limitada con los suelos, sus resultados ofrecen una nueva perspectiva sobre las interacciones de las bacterias y de los componentes del suelo. Estos resultados están de acuerdo con los estudios que han mostrado un efecto estimulante de la materia orgánica asociada a los sedimentos sobre el transporte bacteriano (86,102). Sin embargo son un poco diferentes a aquellos obtenidos anteriormente en experimentos similares de columnas con teflon y bolas de cristal (9). Estos dos materiales se han considerado modelos representativos de las superficies hidrófilas (bolas de cristal) e hidrófobas (Teflon) (Tabla II.3.5A). Solamente la baja afinidad de la estirpe *Sphingomonas* sp. LH162 a estos dos materiales está de acuerdo con los resultados obtenidos con los componentes del suelo. Las interacciones de las otras estirpes con las bolas de cristal y teflon no se han reproducido con los materiales de suelo. Por ejemplo, la estirpe hidrófoba *Mycobacterium* sp. LB307T se adsorbe significativamente al cristal y al teflon pero mostró poca o ninguna afinidad hacia los componentes del suelo, mientras que *Sphingomonas* sp. LB126 presenta una baja afinidad al cristal y al teflon, pero fué fuertemente retenida en las columnas con suelo y arcilla. Esto sugiere que los mecanismos de adhesión que se desarrollan con estas superficies del suelo son diferentes de aquellos con el cristal y el teflon, donde la hidrofobicidad de la bacteria promueve en general la adhesión.

El tensioactivo no iónico Triton X-100 facilitó considerablemente el transporte de *Mycobacterium* sp. LB208 a través del suelo. En cambio, el transporte de *Sphingomonas* sp. LH126 a través del suelo casi no fué afectado por la presencia del

tensioactivo. La influencia sobre el transporte bacteriano a través del suelo puede ser explicada por la adsorción del tensioactivo a las células bacterianas y a las superficies del suelo. Por una parte, la adsorción del tensioactivo a las superficies del suelo hidrófobo probablemente aumenta su hidrofobicidad, a causa de la probable orientación de las mitades hidrófobas hacia la fase acuosa (55). Esta aumentada hidrofobicidad de la superficie puede haber introducido las interacciones hidrófobas (las cuales han parecido no funcionar en ausencia del tensioactivo) como un factor afectando el transporte bacteriano a través del suelo, de una manera similar a aquella que se ha podido observar con el Teflon. En otro lado, la adsorción de las moléculas de tensioactivo a las células bacterianas se puede realizar con la mitad hidrofílica o hidrófoba, cambiando las células hidrófobas a hidrofílicas y viceversa (150). Con respecto a este mecanismo, el resultado final ha sido por tanto una repulsión desde las superficies de suelo y un aumento del transporte de las células hidrófobas de *Mycobacterium* sp. LB208. En cambio, el transporte de la estirpe hidrofílica *Sphingomonas* sp. LB126 no se aumentó, debido al resultado de la afinidad modificada de las superficies del suelo y de las células. Nuestros resultados están de acuerdo con otros estudios donde este tensioactivo se ha descrito como responsable de la disminución de la asociación microbiana a la superficies sólidas y líquidas (154).

El tamaño de las células, la morfología, la hidrofobicidad y el potencial zeta se han considerado como propiedades que posiblemente afectaban el transporte bacteriano a través del suelo. Con la excepción de *Mycobacterium* sp. LB501T, degradadora de antraceno, la cual tiene un potencial zeta extremadamente negativo, estos factores estuvieron dentro del rango anteriormente observado en otros estudios sobre adhesión bacteriana (207,221). Esos estudios anteriores han sugerido que la hidrofobicidad es un factor clave de la adhesión bacteriana a las superficies sólidas. El transporte de las bacterias a través del suelo puede estar afectado por su tamaño celular (68) y la forma (213). En nuestro estudio, representado con el medio conteniendo la arcilla, estos parámetros usados convencionalmente no han sido útiles para predecir el transporte de las estirpes degradadoras de hidrocarburos. Nuestros resultados indican que la presencia de las superficies de arcilla puede impedir significativamente el transporte bacteriano a través del medio poroso saturado y que esta limitación se puede sobrepasar hasta cierto nivel por el uso de las estirpes específicas y o por la adición de los tensioactivos. La selección de las estirpes y de los tensioactivos no tóxicos apropiados parece una etapa

razonable durante el diseño de las estrategias de la bio-aumento en la descontaminación de los suelos contaminados con los HPAs.

En el estudio realizado con el microscopio electrónico para ver si las bacterias que han presentado una gran afinidad de adhesión a las partículas de arcilla pueden formar un biofilm ha mostrado la formación de una capa continua de microorganismos. Los relieves que suelen mostrar las partículas de arcilla han desaparecido, mientras que en las muestras de los complejos y de la arena no se ha notado la formación de ningún biofilm. La formación de un biofilm puede haber sido facilitada por la excreción de polisacáridos extracelulares, los cuales se acumulan alrededor de las microcolonias y forman lo que se llama glicocalix (206).

### **III. Biodegradación de HPA en tres tipos de suelos contaminados.**

Aunque los HPAs pueden sufrir oxidaciones químicas, fotólisis, y volatilización, la degradación microbiana es el proceso principal que afecta la persistencia de HPAs en la naturaleza (28). En la actualidad, se conocen muchos microorganismos con capacidades enzimáticas para oxidar los HPAs, desde el naftaleno hasta el benzo(a)pireno (33,75,214). Por esta razón se ha planteado evaluar la capacidad de degradación de la flora microbiana degradadora de los HPAs en dos zonas contaminadas.

La biodegradación de seis hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) ha sido estudiada en tres suelos contaminados de dos zonas diferentes. Los dos primeros, S1 y S2, se han obtenido de un río contaminado que se encuentra cerca de una refinería y el tercero fue obtenido de una zona contaminada por un vertido accidental. Las muestras obtenidas de la primera zona han mostrado una gran tasa de degradación de la mayoría de los HPAs estudiados por los microorganismos autóctonos. Se han notado además ciertas diferencias incluso entre las muestras de la misma zona (S1 y S2), que estaban separados sólo por algunos centímetros. Las posibles explicaciones a la que se puede atribuir estas diferencias son por una parte el gran número de bacterias degradadoras de los HPAs que se encuentra en la zona S1, debido a las grandes concentraciones permanentes de los HPAs en medio acuoso, y, por otra, el posible aporte continuo de nutrientes con el agua de río y la agitación continua que favorece la buena aireación del medio. Estos factores abióticos pueden favorecer el crecimiento de los microorganismos autóctonos. Aunque este suelo es rico en hierro, el efecto de la adsorción del suelo

ferrico no ha intervenido debido a la saturación de este suelo con los HPAs. Al contrario que la zona S1, la zona S2 suele estar en contacto con los HPAs solamente en invierno, cuando el río sube de nivel e invade los bordes, aunque después del invierno siempre queda una parte bastante significativa de los HPAs en los bordes. En esta muestra, probablemente la participación de muchos factores abióticos (Congreso hay que escribirlo lo tengo 5; 20 ) y la adsorción a las partículas del suelo y a la materia orgánica (133,151) ha hecho disminuir la concentración necesaria para mantener el nivel de crecimiento de la población degradadora.

La nula degradación de pireno en los suelos S1 y S2 se puede atribuir a la falta de bacterias degradadoras del compuesto, posiblemente atribuible a la ausencia de pireno en los HPAs usados en esta refinería. Otras explicaciones alternativas pueden ser que el pireno se haya adsorbido fuertemente a las partículas del suelo, o bien la existencia en el medio algún elemento químico que haya provocado la toxicidad para los microorganismos autóctonos degradadores de pireno. No obstante, esta limitación se ha podido eliminar en el suelo S1 mediante la inoculación con cultivos bacterianos bien seleccionados, resultado que sugiere que la falta de degradación fue debida a la falta de bacterias especializadas en el suelo, más que a otro factor limitante.

Los resultados de la muestra obtenida de la segunda zona han presentado una carencia de bacterias degradadoras de algunos tipos de HPA. En este último caso (S3) la baja biodisponibilidad se puede explicar por el gran contenido en este suelo en arcilla ferrica, un componente que existe de una manera abundante en los suelos agrícolas. En otra parte de esta tesis se indica el secuestro de HPAs notable que ocurre en arcillas férricas. También esta reducida actividad se puede atribuir a la falta de bacterias especializadas en la degradación de fenantreno, fluoreno, fluoranteno, antraceno y pireno, debido al hecho de que las bacterias de la zona S3 no están aclimatadas a los HPAs.

En resumen, la recuperación de zonas contaminadas que constituyen un peligro para la salud pública depende de la biotransformación de una variedad de contaminantes orgánicos, basada en la actividad de los microorganismos que los usan como fuente de carbono y de energía para su crecimiento (204). La limitación microbiana se puede sobrepasar por la mejora de las condiciones ambientales, como el aumento de la población microbiana con microorganismos seleccionados (171,189), o el aporte de la concentración óptima de los nutrientes y del oxígeno, mientras que la limitación de la transferencia de masas de los productos químicos a las bacterias se puede superar

mediante la aplicación de técnicas para cambiar la estructura física del material contaminado.

## CONCLUSIONES

Las conclusiones de esta tesis son:

1. La composición química del suelo es de gran importancia de cara al destino de los hidrocarburos policíclicos aromáticos en el mismo.
2. La selección de bacterias debe basarse sobre los criterios básicos de capacidad de degradación, de adhesión y de movilidad.
3. El criterio de capacidad de degradación de las bacterias es necesario pero no suficiente. De hecho, hemos de tener en cuenta las condiciones ambientales que rodean la bacteria ya que el metabolismo de está última puede encontrarse estimulado y por consiguiente favorecer la biodegradación.
4. El ensayo experimental de la biodegradación de un hidrocarburo adsorbido al complejo arcillo-húmico saturado en ácido húmico, con propiedades de baja desorción, ha mostrado una alta tasa de degradación en presencia de las bacterias.
5. La bacteria *Calvibacter xyli* S1 pre-cultivada con fenantreno ha adquirido una resistencia al tensioactivo Triton X-100 mientras que las bacterias pre-cultivadas con el naftaleno han mostrado una alta sensibilidad al Triton X-100.
6. La arcilla muestra un cambio subitito en su capacidad de adsorción a altas concentraciones de fenantreno.

## **REFERENCIAS**



1. **Alexander, M.** 1994. Biodegradation and Bioremediation. Academic, New York, NY, USA .
2. **Alexander, M.** 1999. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press: San Diego, CA .
3. **Alexander, M. y K M Scow.** 1989. In Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. (Sawhney, B.L., Brown, K., Eds.) Soil Science Society of America: Madison, WI .
4. **Alexander, M.** 1991. Research needs in bioremediation. Environmental Science & Technology **25**:1972-1973.
5. **Alexander, M.** 1995. How toxic are toxic chemicals in soil? Environmental Science & Technology **29**:2713-2717.
6. **Asther, M, y G Corrieu.** 1987. Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by Phanerochate chrysosporium INA-12. Enzyme Microbial Technol **9**:245-249.
7. **Backhus D.A.and Gschwend P.M.** 1990. Fluorescent polycyclic aromatic hydrocarbons as probes for studying the impact of colloids on pollutant transport in ground-water. Environ.Sci.Technol. **24**:1214-1223.
8. **Bailey, G. W., y J. L. White.** 1970. Factors influencing the adsorption, desorption and movement of pesticides in soils. Residue Review **32**:29-92.
9. **Bastiaens, L., D. Springael, P. Wattiau, H. Harms, R. DE Wachter, H. Verachtert, y L. Diels.** 2000. Isolation of Adherent Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Degrading Bacteria Using PAH-Sorbing Carriers. Appl.Environ.Microbiol **66**:1834-1843.
10. **Bastiaens, L., D. Springael, P. Wattiau, H. Harms, R. deWachter, H. Verachtert, y L. Diels.** 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. Appl.Environ.Microbiol. **66**:1834-1843.
11. **Bedard, D. L.** 1990. Bacterial transformation of polychlorinated biphenyls. In D.Kamely, A.Chakrabarty and G.S.Omenn, eds., Biotechnology and Biodegradation.Portfolio Publishing, The Woodlands, TX :369-388.

12. **Bezalel, L., Y.Hadar., y C.E.Cerniglia.** 1996. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl.Environ.Microbiol* **62**:292-295.
13. **Bitton, G., Y. Henis, y N. Lahav.** 1972. Effect of several clay minerals and humic acid on the survival of *Klebsiella aerogenes* exposed to ultraviolet radiation. *Appl.Microbiol* **23**.
14. **Bitton, G., Y. Henis, y N. Lahav.** 1976. Influence of clay minerals, humic acid and bacterial capsular polysaccharide on the survival of *Klebsiella aerogenes* exposed to drying and heating. *Plant Soil* **45**.
15. **Bitton, G., N. Lahav, y Y. Henis.** 1974. Movement and retention of *Klebsiella aerogenes* in soil columns. *Plant Soil* **40**:373-380.
16. **Bosma, T. N. P., P. J. M. Middeldorp, G. Schraa, y A. J. B. Zehnder.** 1997. Mass transfer limitation of biotransformation: Quantifying bioavailability. *Environmental Science & Technology* **31**:248-252.
17. **Bouchez, M., D. Blanchet, y J.-P. Vandecasteele.** 1995. Substrate availability in phenanthrene biodegradation: transfer mechanism and influence on metabolism. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **43**:952-960.
18. **Bouchez, M., D. Blanchet, y J.-P. Vandecasteele.** 1997. An interfacial uptake mechanism for the degradation of pyrene by a *Rhodococcus* strain. *Microbiology* **143**:1087-1093.
19. **Bowman, B. T.** 1979. Method of repeated additions for generating pesticide adsorption-desorption isotherm data. *Canadian Journal of soil science* **59**:435-437.
20. **Bowmer, K. H.** 1991. *Aust.J.Soil.Res* **29**:339-350.
21. **Breitenbeck, G., H. Yang, y E. P. Dunigan.** 1988. Water-facilitated dispersal of inoculant *Bradyrhizobium japonicum* in soils. *Biol.Fertil.Soils* **7**:58-62.
22. **Brown, R. A., M.Jackson, y M.Loucy.** 1995. A rational approach to the remediation of soil and groundwater at manufactured gas plant sites. *Land Contamination & Reclamation* vol 3, number 4- special issue -International symposium and trade fair on the clean-up of manufactured gas plants - Prague, september 19-21 .
23. **Brusseau, M. L., R. E. Jessup, P. Suresh, y C. Rao.** 1991. Nonequilibrium sorption of organic chemicals: Elucidation of rate-limiting processes. *Environmental Science & Technology* **25**:134-142.

24. **Burns, R. G.** 1980. Microbial adhesion to soil surfaces: Consequences for growth and enzyme activities, in *Microbial Adhesion to Surfaces*, Berkeley, R. C. W., Lynch, J. M., Melling, J., Rutter, P. R., and Vincent, B. Eds., Ellis Horwood, Chichester .
25. **Bushby, H. V. A., y K. C. Marshall.** 1977. Some factors affecting the survival of root-nodule bacteria on desiccation. *Soil Biol.Biochem* .
26. **Bushby, H. V. A., y K. C. Marshall.** 1977. Water status of rhizobia in relation to their susceptibility to desiccation and to their protection by montmorillonite. *J.Gen.Microbiol* .
27. **Cabaniss, S. E.** 1990. *Environ.Sci.Technol.* **24**.
28. **Callahan MA, Slimak MW Gabel NW May IP Fowler CF Freed JR Jennings P Durfee RC Whitmore FC Maestri B Mabey WR, Holt BR, y Gould C.** 1979. Water related environmental fate of 129 priory pollutants. Halogenated aliphatic hydrocarbons, halogenated ethers, monocyclic aromatics, phthalate esters, polycyclic aromatic hydrocarbons, nitrosoamines and miscellaneous compounds.EPA-440/4-79-029 b II.
29. **Carroquino, M. J., y M. Alexander.** 1998. factors affecting the biodegradation of phenanthrene initially dissolved in different nonaqueous-phase liquids. *Environ.Toxicol.Chem.* **17**:265-270.
30. **Celis, R., J. Cornejo, M. C. Hermosin, y W. C. Koskinen.** 1998. Sorption of atrazine and simazine by model soil colloidal association. *Soil Sci.Soc.Am.J* **62**:911-915.
31. **Celis, R., M. C. Hermosin, L. Cox, y J. Cornejo.** 1999. Sorption of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid by model particles simulations naturally occurring soil colloids. *Environ.Sci.Technol.* **33**:1200-1206.
32. **Cerniglia CE.** 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Appl Microbiol* **30**:31-71.
33. **Cerniglia, C. E.** 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in applied microbiology* **30**:31-71.
34. **Cerniglia, C. E.** 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**:351-368.
35. **Cerniglia, C. E, y M. A Heitkamp.** 1989. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: Varanasi, U. (Eds.):

- Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. CRC Press, Boca Raton, FL, USA :41-68.
36. **Chakravarty, M., P. M. Amin, H. D. Singh, J. N. Baruah, y M. S. Iyengar.** 1972. *Biotechnol.Bioeng* **14**:61-73.
  37. **Chen, C. S. H., J. J. Delfino, y P. S. C. Rao.** 1994. Partitioning of organic and inorganic components from motor oil into water. *Chemosphere* **28**:1385-1400.
  38. **Chin, Y.-P., y W. J. Weber.** 1989. Estimating the effects of dispersed organic polymers on the sorption of contaminants by natural solids. 1. A persictive thermodynamic humic substance-organic solute interaction model. *Environ.Sci.Technol.* **23**:978-984.
  39. **Chiou, C. T.** 1989. Theoretical considerations of the partition uptake of nonionic organic compounds by soil organic matter. Soil Science Society of America, Madison, WI, USA.Eds, *Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils* :1-29.
  40. **Chiou, C. T, D. E. Kile, T. I. Brinton, R. L. Malcolm, Leenheer J.A., y P. MacCarthy.** 1987. A comparison of water solubility enhancements of organic solutes by aquatic humic materials and comercial humic acids. *Environ.Sci.Technol.* **21**:1231-1234.
  41. **Chiou, C. T.** 1989. In *Reactions and Movement of Organic Chemicals in soils*; Sawhney, B. L., Brown, K. Eds, Soil Science Society of America: Madison, WI :1-29.
  42. **Chiou, C. T., R. L. Malcolm, T. I. Brinton, y D. E. Kile.** 1986. Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids. *Environmental Science & Technology* **20**:502-508.
  43. **Chiou, C. T., R. L. Malcolm, T. I. Brinton, y D. E. Kile.** 1986. Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids. *Environ.Sci.Technol.* **20**:502-508.
  44. **Chiou, C. T., L. J. Peters, y V. H. Freed.** 1979. A physical concept of soil-water equilibria for nonionic organic compounds. *Science* **206**:831-832.
  45. **Chiou, C. T., P. E. Porter, y D. W. Schmedding.** 1983. Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. *Environmental Science & Technology* **17**:227-231.
  46. **Coates, J. D., J.Woodward., J.Allen., P.Philp., y D.R.Lovley.** 1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in

- petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3589-3593.
47. **Cornelissen, G., H. Rigterink, M. M. A. Ferdinandy, y P. C. M. Van Noort.** 1998. Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation. *Environmental Science & Technology* **32**:966-970.
  48. **Costerton, J. W., y H. M. Lappin-Scott.** 1989. Behaviour of bacteria in biofilms. *ASM News* **55**:650-654.
  49. **Cox, L., R. Celis, M. C. Hermosin, y J. Cornejo.** 2000. Natural soil colloids to retard simazine and 2,4-D leaching in soil. *J. Agric. Food. Chem.* **48**:93-99.
  50. **Dagher, F., E. Déziel, P. Lirette, G. Paquette, J. G. Bisailon, y R. Villemur.** 1997. Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. *Canadian Journal Microbiology* **43**:368-377.
  51. **DeLeon, I. R., J. B. Ferrario, y C. J. Byrne.** 1988. Bioaccumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by the clam, *Rangia cuneata*, in the vicinity of a creosote spill. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* **41**:872-879.
  52. **Devare, M., y M. Alexander.** 1995. Bacterial transport and phenanthrene biodegradation in soil and aquifer sand. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **59**:1316-1320.
  53. **Dzombak, D. A., y R. G. Luthy.** 1984. Estimating adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils. *Soil Sci.* **137**:292-308.
  54. **Edwards, C. A., S. D. Beck, y E. P. Lichtenstein.** 1957. Bioassay of aldrin and lindane in soil. *J. Econ. Entomol.* **50**:622-626.
  55. **Edwards, D. A., Z. Adeel, y R. G. Luthy.** 1994. Distribution of nonionic surfactant and phenanthrene in a sediment/aqueous system. *Environmental Science & Technology* **28**:1550-1560.
  56. **Efroymsen, R. A., y M. Alexander.** 1991. Biodegradation by an arthrobacter species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1441-1447.
  57. **Efroymsen, R. A., y M. Alexander.** 1994. Biodegradation in soil of hydrophobic pollutants in nonaqueous-phase liquids (NAPLs). *Environ. Toxicol. Chem.* **13**:405-411.

58. **Efroymsen, R. A., y M. Alexander.** 1994. Role of partitioning in biodegradation of phenanthrene dissolved in nonaqueous-phase liquids. *Environ.Sci.Technol.* **28**:1172-1179.
59. **Efroymsen, R. A., y M. Alexander.** 1995. Reduced mineralization of low concentration of phenanthrene because of sequestering in nonaqueous-phase liquids. *Environmental Science & Technology* **29**:515-521.
60. **Evans WC., Fernley HN., y Griffith E.** 1965. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil Pseudomonads: The ring-fission mechanism. *Biochem J* **95**:819-831.
61. **Fendorf, S. E., G. Li, M. J. Morra, y L.-M. Dandurand.** 1997. Imaging a pseudomonad in mineral suspensions with scanning force and electron microscopy. *Soil Sci.Soc.Am.J.* **61**:109-115.
62. **Filip, Z.** 1979. Wechselwirkungen von Mikroorganismen and Tonmineralen-eine Übersicht. *Zeit.Pflanzenernähr.Bodenk.* **142**.
63. **Flaig W.** 1968. Uptake of organic substances from soil organic matter by plants and their influence on metabolism. *Pontificiae Academiae Scientiarum Scripta Varia* **32** :723-776.
64. **Fletcher, M.** 1991. The physiological activity of bacteria attached to solid surfaces. *Adv.Microb.Physiol* .
65. **Fontes, D. E., A. L. Mills, G. M. Hornberger, y J. S. Herman.** 1991. Physical and chemical factors influencing transport of microorganisms through porous media. *Appl.Environ.Microbiol.* **57**:2473-2481.
66. **Foster, R. C.** 1978. Ultramicromorphology of some South Australian soils. *Modification of soil Structure*, Emerson, W.W., Bond, R.D., and Dexter, A.R., Eds., John Wiley, Chichester .
67. **Fu, M. H., H. Mayton, y M. Alexander.** 1994. Desorption and biodegradation of sorbed styrene in soil and aquifer solids. *Environ.Toxicol.Chem.* **13**:749-753.
68. **Gannon, J. T., J. T. Manilal, y M. Alexander.** 1991. Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil. *Appl.Environ.Microbiol.* **57** :190-193.
69. **Gannon, J. T., Y. Tan, P. Baveye, y M. Alexander.** 1991. Effect of sodium chloride on transport of bacteria in a saturated aquifer material. *Appl.Environ.Microbiol.* **57**:2497-2501.
70. **Garbarini, D. R., y L. W. Lion.** 1986. *Environ.Sci.Technol.* **20**:1263-1269.

71. **Gauthier, T. D., W. R. Seitz, y C. L. Grant.** 1987. Effects of structural and compositional variations of dissolved humic materials on pyrene  $K_{oc}$  values. *Environmental Science & Technology* **21**:243-248.
72. **Ghosh, K., y M. Schnitzer.** 1980. Macromolecular structures of humic substances. *Soil Sci* **129**:266-276.
73. **Ghoshal, S., y R. G. Luthy.** 1996. Bioavailability of hydrophobic organic compounds from nonaqueous-phase liquids: The biodegradation of naphthalene from coal tar. *Environ.Toxicol.Chem.* **15**:1894-1900.
74. **Gibson DT., Mahadevan V., Jerina DM., Yagi H., y Yeh HJC.** 1975. Oxidation of carcinogens benz[a]pyrene and benz[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science* **189**:295-297.
75. **Gibson, D. T., y V. Subramanian.** 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: *Microbial degradation of organic compounds.* Gibson, D.T.(Eds.).Marcel Dekker Inc.New York **13**:181-242.
76. **Giles, C. H., S. N. Mac Ewan, S. N. Nakhwa, y D. Smith.** 1960. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface area in solids. *J.Chem.Soc* :3973-3993.
77. **Grathwohl, P.** 1990. Influence of organic matter from soils and sediments from various origins on the sorption of some chlorinated aliphatic hydrocarbons: Implications on  $K_{oc}$  correlations. *Environ.Sci.Technol.* **24**:1687-1693.
78. **Grunda B.** 1970. Der Einfluss der Humusstoffe auf die Anzahl der Bodenkleinlebewesen in Kulturene. *Zentralblatt für Bacteriologie Parasitenkunde, Infektionskrankheiten and Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung* **125**:584-593.
79. **Gschwend, P. M., y S Wu.** 1985. On the constancy of sediment-water partition coefficients of hydrophobic organic pollutants. *Environ.Sci.Technol.* **19**:90-96.
80. **Guerin, W. F., y S. A. Boyd.** 1992. Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species. *Appl.Environ.Microbiol.* **58**:1142-1152.
81. **Guerin, W. F., y S. A. Boyd.** 1997. Bioavailability of naphthalene associated with natural and synthetic sorbents. *Water Res.* **31**:1504-1512.
82. **Guerin, W. F., y G. E. Jones.** 1988. Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl.Environ.Microbiol* **54** (4):937-944.

83. **Haderlein, S. B., K. W. Weissmahr, y R. P Schwarzenbach.** 1996. Specific adsorption of nitroaromatic - explosives and pesticides to clay minerals. *Environ.Sci.Technol.* **30**:612-622.
84. **Harms, H., y A. J. B. Zehnder.** 1994. Influence of substrate diffusion on degradation of dibenzofuran and 3-chlorodibenzofuran by attached and suspended bacteria. *Appl.Environ.Microbiol.* **60**:2736-2745.
85. **Harms, H., y A. J. B. Zehnder.** 1995. Bioavailability of sorbed 3-chlorodibenzofuran. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**:27-33.
86. **Harvey, R. W., L. H. George, R. L. Smith, y D. R. LeBlanc.** 1989. Transport of microspheres and indigenous bacteria through a sandy aquifer: Results of natural- and forced-gradient tracer experiments. *Environmental Science & Technology* **23**:51-56.
87. **Hatzinger, P. B., y M. Alexander.** 1995. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental Science & Technology* **29**:537-545.
88. **Hatzinger, P. B., y M. Alexander.** 1997. Biodegradation of organic compounds sequestered in organic solids or in nanopores within silica particles. *Environ.Toxicol.Chem.* **16**:2215-2221.
89. **Heitkamp MA., y Cerniglia CE.** 1988. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below un oil field. *Appl.Environ.Microbiol* **54**:1612-1614.
90. **Hekman, W. E., C. E. Heijnen, S. L. G. E. Burgers, J. A. van Veen, y J. D. van Elsas.** 1995. Transport of bacterial inoculants through intact cores of two different soils as affected by water percolation and the presence of wheat plants. *FEMS Microbiology Ecology* **16**:143-158.
91. **Helenius, A., y K Simons.** 1975. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim.Biophys Acta* **415**:29-79.
92. **Helsen, J. A., y B. A. Goodman.** 1983. Characterization of iron(II)- and iron(III)- exchanged montmorillote and hectorite using the mössbauer effect. *Clay Minerals* **18**:117-125.
93. **Hiemenz, P. C.** 1986. *Principles of Colloid and Surface Chemistry.* Marcel Dekker, Inc., New York.
94. **Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, y S. T. Williams.** 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.*



95. **Huang, W. L., M. A. Schlautman, y W. J. Weber.** 1996. A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 5. The influence of near-surface characteristics in mineral domains. *Environ.Sci.Technol.* **30**:2993-3000.
96. **Huysman, F., y W. Verstraete.** 1993. Water-facilitated transport of bacteria in unsaturated soil columns: influence of cell surface hydrophobicity and soil properties. *Soil Biol.Biochem.* **25**:83-90.
97. **Jackson, A., D. Roy, y G. Breitenbeck.** 1994. Transport of a bacterial suspension through a soil matrix using water and anionic surfactant. *Water Res.* **28**:943-949.
98. **Jackson, T. J., T. L. Wade, T. J. McDonald, D. Wilkinson, y J. M. Brooks.** 1994. Polynuclear aromatic hydrocarbon contamination in oysters from the gulf of mexico. *Environ.Poll* **83**:291-298.
99. **Jacques, N. A., V. L. Jacques, A. C. Wolf, y C. L. Wittenberger.** 1985. Does an increase in membrane unsaturated fatty acids account for Tween 80 stimulation of glucosyltransferase secretion by *Streptococcus salivarius*? *J.Gen.Microbiol* **131**:67-72.
100. **Jaynes, W. F., y S. A. Boyd.** 1991. Hydrophobicity of siloxane surfaces in smectites as revealed by aromatic hydrocarbon adsorption from water. *Clay and Clay Min* **39**:428-436.
101. **Jazubczak E.and Leclerc H.** 1980. Mesure de l'ATP bactérien por bioluminescence: étude critique des méthode d'extraction. *Annales de biologie Clinique* **38**:297-304.
102. **Johnson, W. P., y B. E. Logan.** 1996. Enhanced transport of bacteria in porous media by sediment-phase and aqueous-phase natural organic matter. *Water Res.* **30**:923-931.
103. **Jones, K. D., y C. L. Tiller.** 1999. Effect of solution chemistry on the extent of binding of phenanthrene by a soil humic acid: A comparison of dissolved and clay bound humic. *Environmental Science & Technology* **33**:580-587.
104. **Jucker, B. A.** 1998. Polymer Interactions and Bacterial Adhesion. Ph.D.thesis.Swiss Federal Institue of Technology, Zürich .
105. **Kan, A. T., G. Fu, M. Hunter, W. Chen, C. H. Ward, y M. B. Tomson.** 1998. Irreversible sorption of neutral hydrocarbons to sediments: Experimental observations and model predictions. *Environmental Science & Technology* **32**:892-902.

106. **Karanfil, T., J. E. Kilduff, M. A. Schlautman, y W. J. Weber.** 1996. Adsorption of organic macromolecules by granular activated carbon. 1. Influence of molecular properties under anoxic solution conditions. *Environ.Sci.Technol.* **30**:2187-2194.
107. **Karanfil, T., M. A. Schlautman, J. E. Kilduff, y Weber W.J.** 1996. Adsorption of organic macromolecules by granular activated carbon. 2. Influence of molecular properties under anoxic solution conditions. *Jr.Environ.Sci.Technol.* **30**:2195-2201.
108. **Karickhoff, S. W.** 1980. In *Contaminants and Sediments*. Baker R.A., Eds. Ann Arbor Science: Ann Arbor, MI, 1980 :193-205.
109. **Karickhoff, S. W, D. S Brown, y T. A Scott.** 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Res* **13**:241-248.
110. **Karickhoff, S. W., D. S. Brown, y T. A. Scott.** 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Res.* **13**:241-248.
111. **Karickhoff, S. W.** 1984. *J.Hydraul.Eng* **110**:707-735.
112. **Käppeli.O., P. Walther, M. Mueller, y A. Fiechter.** 1984. Structure of the cell surface of the yeast *Candida tropicalis* and its relation to hydrocarbon transport. *Arch.Microbiol* **138**:279-282.
113. **Kelsey, J. W., B. D. Kottler, y M. Alexander.** 1997. Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environmental Science & Technology* **31**:214-217.
114. **Kile, D. E., C. T. Chiou, H. Zhou, H. Li, y O. Xu.** 1995. Partition of nonpolar organic pollutants from water to soil and sediment organic matters. *Environ.Sci.Technol.* **29**:1401-1406.
115. **Komatsu T., Oori T., y Kodama T.** 1993. Microbial degradation of polycyclic aromatic Hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. *Biosci.Biotechnol.Biochem* **57**:864-865.
116. **Kwee, S., J. V. Moller, y M le Maire.** 1986. Binding of detergents by membrane proteins. In K.L.Mittal and P.Brothorel, eds., *Surfactants in Solution*, Plenum, New York, NY. **5**:853-860.
117. **Labare, M. P., y Alexander.M.** 1995. Enhanced mineralization of organic compounds in non-aqueous phase liquids. *Environ.Toxicol.chem* **14**:257-265.

118. **Lahlou, M., H. Harms, D. Springael, y J. J. Ortega-Calvo.** 2000. Influence of soil components on the transport of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria through saturated porous media. *Environ.Sci.Technol.*
119. **Lahlou, M., y J. J. Ortega-Calvo.** 1999. Bioavailability of labile and desorption-resistant phenanthrene sorbed to montmorillonite clay containing humic fractions. *Environ.Toxicol.Chem.* **18**:2729-2735.
120. **Laird, D. A.** 1996. Herbicide metabolites in surface waters and ground water. Meyer and Troman (eds) *Amer.Chem.Soc.Washington D.C* :86-100.
121. **Liang, L., y J. J. Morgan.** 1990. Chemical Modeling of Aqueous Systems II, American Chemical Society: Washington, DC :293-308.
122. **Liu, B. V., S.P.Pradhan., V.J.Srivastava., J.R.Pope., T.D.Hayes., D.G.Linz., C.Proulx., D.E.Jerger., y P.M.Woodhull.** 1994. An evaluation of slurry-phase bioremediation of MGP soils. The 7th International IGT symposium on gas, Oil, and Environmental Biotechnology.Dec.12-14, Colorado Springs, Colorado .
123. **Lobartini, J. C., y K. H. Tan.** 1988. Differences in Humic Acid Characteristics as Determined by Carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance, Scanning Electron Microscopy, and Infrared Analysis. *Soil.Sci.Soc.Am* **52**:125-130.
124. **Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L, y and Randall R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**:265-275.
125. **Luthy, R. G., G. R. Aiken, M. L. Brusseau, S. D. Cunningham, P. M. Gschwend, J. J. Pignatello, M. Reinhard, S. J. Traina, W. J. Weber, y J. C. Westall.** 1997. Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. *Environmental Science & Technology* **31**:3341-3347.
126. **Lynch, J. M.** 1979. Micro-organisms in their natural environments. *Microbial Ecology: A Conceptual Approach*, Lynch, J.M.and Poole, N.J., Eds., Blackwell, Oxford .
127. **Mader, B. T., K. Uwe-Gosse, y S. J. Eisenreich.** 1997. Sorption of nonionic, hydrophobic organic chemicals to mineral surfaces. *Environ.Sci.Technol.* **31**:1079-1086.
128. **Madhun, Y. A., Young.J.L., y V. H. Freed.** 1986. *J.Environ.Qual* **15**:64-68.
129. **Madsen, E. L., y M. Alexander.** 1982. Transport of *Rhizobium* and *Pseudomonas* through soil. *Soil Sci.Soc.Am.J.* **46**:557-560.

130. **Magdaliniuk, S., J. C. Block, C. Leyval, J. Y. Bottero, G. Villemin, y M. Babut.** 1995. Biodegradation of naphthalene in montmorillonite/polyacryamide suspensions. *Water Science Technology* **31**:85-94.
131. **Manilal, V. B., y M. Alexander.** 1991. Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **35**:401-405.
132. **Marshall, K. C.** 1971. Sorptive interactions between soil particules and microorganisms. *Soil Biochemistry, Volume 2, McLaren, A.D.and Skujins, J., Eds., Marcel Dekker, New York .*
133. **Martin, J. P., A. A. Parsa, y K. Haider.** 1978. Influence of intimate association with humic polymers on biodegradation of [<sup>14</sup>C] labeled organic substrates in soil. *Soil Biol.Biochem.* **10**:483-486.
134. **Martin, R. E., E. J. Bouwer, y L. M. Hanna.** 1992. Application of clean-bed filtration theory to bacterial deposition in porous media. *Environmental Science & Technology* **26**:1053-1058.
135. **Martin, R. E., E. J. Bouwer, y L. M. Hanna.** 1992. Application of clean-bed filtration theory to bacterial deposition in porous media. *Environmental Science & Technology* **26**:1053-1058.
136. **McCarthy, J. F., y B. D. Jimenez.** 1985. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and dissolved humic material: binding and dissociation. *Environmental Science & Technology* **19**:1072-1076.
137. **McCarthy, J. F., y J. M. Zachara.** 1989. Mobile colloids in the subsurface environment may alter the transport of contaminants. *Environmental Science & Technology* **23**:496-502.
138. **Means, J. C., S. G. Wood, J. J. Hassett, y W. L. Banwart.** 1980. Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Environ.Sci.Technol.* **14**:1524-1528.
139. **Mihelcic, J. R., D. R. Lueking, R. J. Mitzell, y J. M. Stapleton.** 1993. Bioavailability of sorbed- and separate-phase chemicals. *Biodegradation* **4**:141-153.
140. **Mihelcic, J. R., y R.G.Luthy.** 1988. Microbial degradation of acanaphthene and naphthalene under denitrification conditions in soils-water systems. *Appl.Environ.Microbiol* **54**:1188-1198.
141. **Miller, M. M., y Wasik.S.P.** 1985. Relationships between octanol-water partition coefficient and aqueous solubility. *Environ.Sci.Technol.* **19**:522-529.

142. **Mills, A. L., J. S. Herman, G. M. Hornberger, y T. D. De Jesus.** 1994. Effect of solution ionic strength and iron coatings on mineral grains on the sorption of bacterial cells quartz sand. *Appl.Environ.Microbiol.* **60**:3300-3306.
143. **Mingelgrin, U., y Z. Gerstl.** 1983. Reevaluation of partitioning as a mechanism of nonionic chemicals adsorption in soils. *J.Environ.Qual* **12**:1-11.
144. **Murphy, E. M., J. M. Zachara, y S. C. Smith.** 1990. Influence of mineral-bound humic substances on the sorption of hydrophobic organic compounds. *Environmental Science & Technology* **24**:1507-1516.
145. **Murphy, E. M., J. M. Zachara, S. C. Smith, J. L. Phillips, y T. W. Wietsma.** 1994. Interaction of hydrophobic organic compounds with mineral-bound humic substances. *Environmental Science & Technology* **28**:1291-1299.
146. **Murphy, EM., JM. Zachara, SC. Smith, JL. Phillips, y TW. Wietsma.** 1994. Interaction of hydrophobic organic compounds with mineral - bound humic substances. *Environmental Science & Technology* **28**:1291-1299.
147. **Nakahara, T., L. E. Erickson, y J. R. Gutierrez.** 1977. Characteristics of hydrocarbon uptake in cultures with two liquid phases. *Biotechnol Bioeng* **19**:9-25.
148. **Nam, K., y M. Alexander.** 1998. Role of nanoporosity and hydrophobicity in sequestration and bioavailability: Tests with model solids. *Environmental Science & Technology* **32**:71-74.
149. **Nam, K., N. Chung, y M. Alexander.** 1998. Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. *Environmental Science & Technology* **32**:3785-3788.
150. **Neu, T. R.** 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol.Rev.* **60**:151-166.
151. **Ogram, A. V., R. E. Jessup, L. T. Ou, y P. S. C. Rao.** 1985. Effects of sorption on biological degradation rates of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid in soils. *Appl.Environ.Microbiol.* **49**:582-587.
152. **Ogram, A. V., R. E. Jessup, L. T. Ou, y P. S. C. Rao.** 1985. Effects of sorption on biological degradation rates of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid in soils. *Appl.Environ.Microbiol* **49**:582-587.
153. **Onken, B. M., y S. J. Traina.** 1997. The sorption of pyrene and anthracene to humic acid-mineral complexes: Effect of fractional organic carbon content. *Journal of Environmental Quality* **26**:126-132.

154. **Ortega-Calvo, J. J., y M. Alexander.** 1994. Roles of Bacterial attachment and spontaneous partitioning in the biodegradation of naphthalene initially present in nonaqueous-phase liquids. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2643-2646.
155. **Ortega-Calvo, J. J., I. Birman, y M. Alexander.** 1995. Effect of varying the rate of partitioning of phenanthrene in nonaqueous-phase liquids on biodegradation in soil slurries. *Environ. Sci. Technol.* **29**:2222-2225.
156. **Ortega-Calvo, J. J., C. Fesch, y H. Harms.** 1999. Biodegradation of sorbed 2,4-dinitrotoluene in a clay-rich, aggregated porous medium. *Environmental Science & Technology* **33**:3737-3742.
157. **Ortega-Calvo, J. J., Mohammed. Lahlou, y C. Saiz-Jimenez.** 1997. Effect of organic matter and clays on the biodegradation of phenanthrene in soils. *Int Biodeterior Biodegrad* **40**:101-106.
158. **Osswald, P., P. Bayeve, y J. C. Block.** 1996. Bacterial influence on partitioning rate during the biodegradation of styrene in a biphasic aqueous-organic system. *Biodegradation* **7**:297-302.
159. **Paterek, J. R., B. Aronstein., L.E. Rice., K.A. Jackowski., y V.J. Srivastava.** 1994. Chemical and biological remediation of waste generated during the exploration and production of natural gas. The 7th International IGT symposium on gas, Oil, and Environmental Biotechnology. Dec. 12-14, Colorado Springs, Colorado.
160. **Paterek, J. R., B. Aronstein., L.E. Rice., V.J. Srivastava., J. Chini., y A. Bohrnerud.** 1994. Bioremediation of soil of a manufactured gas plant utilising an in-situ treatment mode. The 7th International IGT symposium on gas, Oil, and Environmental Biotechnology. Dec. 12-14, Colorado Springs, Colorado.
161. **Pavlovstathis, S. G., y K. Jaglal.** 1991. *Environ. Sci. Technol.* **25**:274-279.
162. **Piccolo, A.** 1996. Humus and soil conservation. In *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, Amsterdam :225-264.
163. **Piccolo, A., G. Celano, y P. Conte.** 1996. Adsorption of glyphosate by humic substances. *J. Agric. Food. Chem.* **44**:2442-2446.
164. **Piccolo, A., P. Conte, I. Scheunert, y M. Paci.** 1998. Atrazine interactions with soil humic substances of different molecular structure. *J. Environ. Qual* **27**:1324-1333.

165. **Pignatello, J. J.** 1990. Slowly reversible sorption of aliphatic halocarbons in soils. I. Formation of residual fractions. *Environ.Toxicol.Chem.* **9**:1107-1115.
166. **Pignatello, J. J.** 1998. Soil organic matter as a nanoporous sorbent of organic pollutants. *Adv.Colloid Int.Sci* **77**:445-467.
167. **Piotrowski, M., y J. Cunningham.** 1996. Factors to consider before adding microbes and nutrients. *Soil Groundwater Cleanup* **5**:44-51.
168. **Rajagopalan, R., y C. Tien.** 1976. Trajectory Analysis of Deep-Bed Filtration with the Sphere-in-cell Porous Media Model. *AIChE Journal* **22**:523-533.
169. **Richnow, H. H., R. Seifert, M. Kastner, B. Mahro, y W. Michaelis.** 1993. *Org.Geochem.* **22**:671.
170. **Rijnaarts, H. H. M., A. Bachmann, J. C. Jumelet, y A. J. B. Zehnder.** 1990. Effect of desorption and intraparticle mass transfer on the aerobic biomineralization of  $\alpha$ -hexachlorocyclohexane in a contaminated calcareous soil. *Environ.Sci.Technol.* **24**:1349-1354.
171. **Rittmann, B. E., B. F. Smets, y D. A. Stahl.** 1990. The role of genes in biological processes. *Environ.Sci.Technol.* **24**:23-29.
172. **Roberson, E. B., y M. K Firestone.** 1992. Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *Appl.Environ.Microbiol.*
173. **Robinson, K. G., W. J. Farmer, y J. T. Novak.** 1990. Availability of sorbed toluene in soils for biodegradation by acclimated bacteria. *Water Res.* **24**:345-350.
174. **Robson, A. D. Loneragan J. F.** 1970. Nodulation and growth of *Medicago truntucatula* on acid soils. II. Colonization of acid soils by *Rhizobium meliloti*. *Australian Journal of Agricultural Research* **21**:435-445.
175. **Rosenberg, M., E. A. Bayer, J. Delarea, y E. Rosenberg.** 1982. Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Appl.Environ.Microbiol* **44**:929-937.
176. **Rouse, j. D., D. A Sabatini , Suflita.J.M., y J. H Harwell.** 1994. Influence of Surfactants on Microbial Degradation of Organic Compounds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **24(4)**:325-370.
177. **Saiz-Jimenez, C., B. L. Hawkins, y G. E. Maciel.** 1986. Cross polarization, magic-angle spinning  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy of soil humic fractions. *Organic Geochemistry* **9**:277-284.

178. **Schlautman, M. A., y J. J. Morgan.** 1993. Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved humic materials. *Environmental Science & Technology* **27**:961-969.
179. **Schlautmann, M. A., y J. J. Morgan.** 1993. *Environ.Sci.Technol.* **27**.
180. **Schnitzer, M.** 1982. Organic matter characterization, p. 581-594. *In* A. L. Page, R. H. Miller, and D. R. Keeney (eds.), *Methods of Soil Analysis. Chemical and Microbiological Properties.* Soil Science Society of America., Madison, WI.
181. **Schnitzer, M., y S. U. Khan.** 1972. *Humic Substances in the environment.* Marcel Dekker, Inc.: New York .
182. **Scholl, M. A., y R. W. Harvey.** 1992. Laboratory investigations on the role of sediment surface and groundwater chemistry in transport of bacteria through a contaminated sandy aquifer. *Environmental Science & Technology* **26**:1410-1417.
183. **Schroth, B. K., y G. Sposito.** 1998. *Environ.Sci.Technol.* **32**.
184. **Schwarzenbach, R. P., P. M. Gschwend, and D. M. Imboden.** 1993. *Environmental Organic Chemistry.* John Wiley & Sons, New York.
185. **Schwarzenbach, R. P., y Westall.J.** 1981. Transport of nonpolar organic compounds from surface water to groundwater. Laboratory sorption studies. *Environ.Sci.Technol.* **15**:1360-1367.
186. **Scopes, R. K.** 1987. *Protein purification: Principales and practice.* New York: Springer-Verlag .
187. **Scribner, S. L., T. R. Benzing, S. Sun, y S. A. Boyd.** 1992. Desorption and bioavailability of aged simazine residues in soil from a continuous corn field. *Journal Environmental Quality* **21**:115-120.
188. **Sims, R. C., y M. R. Overcash.** 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Residue Reviews* **88**:1-68.
189. **Smets, B. F., B. E. Rittmann, y D. A. Stahl.** 1990. The role of genes in biological processes. *Environ.Sci.Technol.* **24**:162-169.
190. **Smith, M. S., G. W. Thomas, R. E. White, y D. Ritonga.** 1985. Transport of *Escherichia coli* through intact and disturbed soil columns. *Journal of Environmental Quality* **14**:87-91.
191. **Sposito, G.** 1984. *The surface Chemistry of Soil.* Oxford University Press: New York :78-95.



192. **Steinberg, S. M., J. J. Pignatello, y B. L. Sawhney.** 1987. Persistence of 1,2-dibromoethane in soils: Entrapment in intraparticle micropores. *Environmental Science & Technology* **21**:1201-1208.
193. **Stenström, T. A.** 1989. Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:142-147.
194. **Stevenson, F. J.** 1994. *Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions.* 2nd ed., Wiley Interscience: New York .
195. **Stotzky, G.** 1986. Influence of soil mineral colloids on metabolic processes, growth, adhesion, and ecology of microbes and viruses, in *Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes*, Huang, P. M. and Schnitzer, M. Eds., Soil Science Society of America, Madison, WI.
196. **Stringfellow, W. T., y L. Alvarez-Cohen.** 1999. Evaluating the relationship between the sorption of PAHs to bacterial biomass and biodegradation. *Water Res.* **33**:2535-2544.
197. **Stucki, G., y M. Alexander.** 1987. Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:292-297.
198. **Studdert, J. P, H. K. Kaya, y J. M Duniway.** 1990. Effect of water potential, temperature, and clay-coating on survival of *Beauveria bassiana* conidia in a loam and peat soil. *J. Invertebrate Pathol.* **55**.
199. **Tang, J., M. J. Carroquino, B. K. Robertson, y M. Alexander.** 1998. Combined effect of sequestration and bioremediation in reducing the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environmental Science & Technology* **32**:3586-3590.
200. **Theng, B. K. G.** 1979. *Formation and Properties of clay-Polymer Complexes.* Elsevier, Amsterdam .
201. **Theng, B. K. G. and V. A. Orchard.** 1995. Interactions of clays with microorganisms and bacterial survival in soil: a physicochemical perspective., p. 123-143. *In* P. M. Huang (ed.), *Environmental Impact of Soil Component Interactions*, vol 2: Metals, Other Inorganics, and Microbial Activities. Lewis, Boca Raton, FA.
202. **Theng. B. K. G., y Orchard. V. A.** 1995. Interactions of clays with Microorganisms and Bacterial Survival in soil: A Physicochemical Perspective. ``Environmental Impact of Soil Component interactions: Metals, other

- inorganics, and Microbial Activities'' Huang, P.M., (ed.). Lewis: Boca Raton, Flo. 2:123-143.
203. **Thomas, J. M., y M Alexander.** 1987. Colonization and mineralization of palmitic acid by *Pseudomonas pseudoflava*. *Microb Ecol* **14**:75-80.
  204. **Tiehm, A.** 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol* **60**:258-263.
  205. **Tipping, E., y D. Cooke.** 1982. *Geochim. Cosmochim. Acta* **46**.
  206. **Uhlinger, D. J., y D.C. White.** 1983. Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*. *Appl. Environ. Microbiol* **45**:64-70.
  207. **van Loosdrecht, M. C. M., J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa, y A. J. B. Zehnder.** 1987. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1989-1901.
  208. **Vansant, E. F., y J. B. Uytterhoeven.** 1973. The adsorption of aromatic, heterocyclic and cyclic ammonium cations by montmorillonite. *Clay Minerals* **10**:61-69.
  209. **Visser, S. A.** 1985. Physiological action of humic substances on microbial cells. *Soil Biol. Biochem.* **17**:457-462.
  210. **Voice TC., Rice CP., y Weber WJ Jr.** 1983. Effect of solids concentration on the sorptive partitioning of hydrophobic pollutants in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* **17**:513-518.
  211. **Wallace, H. R.** 1978. Dispersal in time and space: soil pathogens., p. 181-202. *In* J. G. Horsfall and E. B. Cowling (eds.), *Plant Disease: an Advanced Treatise*, Vol. II. Academic Press, New York.
  212. **Walton BT., y Anderson TA.** 1988. Structural properties of organic chemicals as predictors of biodegradation and microbial toxicity in soils. *Chemosphere* **17**:1501-1507.
  213. **Weiss, T. H., A. L. Mills, G. M. Hornberger, y J. S. Herman.** 1995. Effect of bacterial cell shape on transport of bacteria in porous media. *Environmental Science & Technology* **29**:1737-1740.
  214. **Weissenfels, W. D., M. Beyer, y J. Klein.** 1990. Degradation of phenanthrene, fluorene, and fluoranthene by pure bacterial cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* **32**:479-484.

215. **Weissenfels, W. D., H. J. Klewer, y J. Langhoff.** 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **36**:689-696.
216. **Wershaw, R. L., K. A. Thorn, D. J. Pinckney, P. MacCarthy, J. A. Rice, y H F. Hemond.** 1986. In *Peat and Water*. Elsevier Applied Science Publishers Ltd :133-157.
217. **White, J. C., y M. Alexander.** 1996. Reduced biodegradability of desorption-resistant fractions of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and aquifer solids. *Environ.Toxicol.Chem.* **15**:1973-1978.
218. **Wild, S. R., M. L. Berrow, S. P. McGrath, y K. C. Jones.** 1992. Polynuclear aromatic hydrocarbons in crops from long-term field experiments amended with sewage sludge. *Environ.Microbiol* **76**:25-32.
219. **Willumsen, P. A.** 1998. Surfactant-Enhanced Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. PhD thesis .
220. **Wilson, S. C., y K. C. Jones.** 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ.Pollut* **81**:229-249.
221. **Wollum, A. G., y D. K. Cassel.** 1978. Transport of microorganisms in sand columns. *Soil Sci.Soc.Am.J.* **42**:72-76.
222. **Womack, M. D., D. A. Kendall, y R. C MacDonald.** 1983. Detergent effects on enzyme activity and solubilization of lipid bilayer membranes. *Biochim.Biophys.Acta* **733** :210-215.
223. **Wu, S.-C., y P. M. Gschwend.** 1986. Sorption Kinetics of hydrophobic organic compounds to naturel sediments and soils. *Environ.Sci.Technol.* **20**:717-725.

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes  
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de  
D. Mohammed Lahou

titulada Remediación biológica de suelos contaminados = biodisponibilidad  
de hidrocarburos policíclicos aromáticos asociados a cationes del suelo  
y a líquidos en fase no acuosa

acordó otorgarle la calificación de Sobresaliente "cum laude"

por unanimidad

Sevilla, 20 de Diciembre

2001

El Vocal,

El Vocal

El Vocal,

El Secretario,

El Vocal,

El Doctorado,