

Cod. Barras/ 297297

N.º R. ALEPH 1018819
N.º R. Bib. 5313
Signat. M/CI-40 Bueno

APLICACIÓN DE TENSIOACTIVOS A LA BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS POLICICLICOS AROMÁTICOS.

TRABAJO REALIZADO DURANTE EL XL CURSO
INTERNACIONAL DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA VEGETAL

MARISA BUENO MONTES
(Licenciada en Ciencias Químicas)

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA.



Julio de 2003



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Julio Ortega- Calvo por su acertada labor de dirección, ayuda y asesoramiento en la elaboración de éste proyecto, así como por sus consejos y conocimientos transmitidos.

Al Dr. Luis Clemente, coordinador del Curso Internacional de Edafología y Biología Vegetal por facilitarme el acceso a este curso.

A mi familia y en especial a Darío por su inestimable apoyo e inagotable paciencia.

A mis compañeros de laboratorio, Patricia, Rosa, César, José Luis, Agui y Alfonso por la ayuda y amistad brindada en todo momento.

Por último, expresar mi agradecimiento al convenio Universidad de Sevilla-CSIC, dentro del cual ha sido posible la realización de prácticas y el desarrollo de este trabajo experimental en el IRNAS (CSIC).

I- INTRODUCCION.....	1
I.1- BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS.....	2
I.1.1 – Microbiología del suelo.....	2
I.1.2 – Factores que afectan a la biorrecuperación.	3
a) Factores medioambientales.....	3
b) Factores físicos.....	4
c) Factores químicos.....	5
I.2- SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (PAHs).....	6
I.3- TENSIOACTIVOS.....	8
I.3.1 – Factores fisico-químicos de los tensioactivos.	8
I.3.2 – Interacciones tensioactivo – microorganismo.	9
a) Toxicidad.....	9
b) Biodegradación del Tensioactivo.	10
c) Influencia de los tensioactivos en la movilidad bacteriana.....	10
d) Tensioactivos y biodisponibilidad del contaminantes.....	11
I.4 – CINÉTICA DE DESORCIÓN DE PAHs.....	12
II. OBJETIVOS	14

III. MATERIALES Y METODOLOGÍA	16
III.1- Reactivos.....	16
III.2- Suelos.....	17
III.3 – Desorción.	18
III.4- Bacterias, medios, condiciones de cultivo y preparación de inóculos.....	19
III.5- Adhesión bacteriana.....	21
III.6- Mineralización y biodegradación.....	22
III.6.1- Mineralización y biodegradación de fenantreno en sistemas acuosos en presencia de tensioactivo.	22
III.6.2- Mineralización y biodegradación de varios PAHs en suelos en suspensión por las bacterias autóctonas del suelo.	23
III.6.3- Mineralización y biodegradación de varios PAHs en suelos en suspensión inoculados.	24
III.6.4 - Mineralización y biodegradación de fenantreno en suelos en suspensión inoculados y en presencia de Triton X-100.	25
III.6.5 - Mineralización y biodegradación de fenantreno en suelos en suspensión inoculados y en presencia de los tensioactivos Triton X-100, Brij 30 y Brij 35.	27
III.7 – Extracción de PAHs del suelo y limpieza de la muestra.	28
III.8 – Análisis de PAHs por Cromatografía Líquida de Alta Resolución .	29

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
IV.1 - Contenido de PAHs del suelo B.	31
IV.2 – Estudio de las cinéticas de desorción de los PAHs.....	33
IV.3 – Determinación de la CMC de los tensioactivos.....	36
IV.4 – Estudio de la toxicidad de los tensioactivos sobre las bacterias y su influencia en la biodisponibilidad de los PAHs en sistemas acuosos.....	37
IV.5 – Estudio de la mineralización de PAHs por bacterias autóctonas en sistemas de suelo en suspensión.....	38
IV.6 – Estudio de la mineralización de PAHs en sistemas de suelo en suspensión inoculados.....	41
IV.7 – Estudio de la mineralización de PAHs en sistemas de suelo en suspensión inoculados y en presencia del tensioactivo Tritón X-100.....	44
IV.8 – Estudio de la mineralización de PAHs en sistemas de suelo en suspensión inoculados y en presencia de los tensioactivos Tritón X-100, Brij 30 y Brij 35.....	47
V. CONCLUSIONES	51
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	53

I- INTRODUCCION

La recuperación mediante procesos biológicos capaces de transformar o fijar contaminantes en terrenos o aguas subterráneas (*biorrecuperación*) constituye un campo de la ingeniería ambiental que está evolucionando y expandiéndose rápidamente.

El empleo de la biorrecuperación en el tratamiento de los residuos peligrosos supone un concepto relativamente nuevo, aunque se ha convertido en una tendencia de rápido crecimiento dentro de la gestión ambiental.

Los problemas de contaminación de terrenos y aguas subterráneas a gran escala son consecuencia directa del desarrollo de nuestra moderna sociedad industrializada. Desde 1970, en la mayoría de los países industrializados, el tratamiento de emplazamientos contaminados ha venido cobrando cada vez más importancia, y generalmente, se ha comprobado que los tratamientos biológicos son más económicos que los procedimientos químicos o físicos.

Durante los últimos años, la mayor parte de los estudios publicados sobre biorrecuperación se han referido al tratamiento de terrenos contaminados con compuestos derivados del petróleo. Esto es en parte debido a que la mayoría de los hidrocarburos derivados del petróleo son relativamente fáciles de degradar, como tales, debido al gran número de emplazamientos contaminados con hidrocarburos resultantes de fugas en depósitos de almacenamiento subterráneos.

Hasta la fecha de hoy, gran parte de las aplicaciones de la biorrecuperación han sido experimentales y los trabajos desarrollados se han dedicado a comprobar la aplicabilidad de un método de biorrecuperación a unas determinadas condiciones del emplazamiento y a determinados contaminantes.

I.1- BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS.

I.1.1 – Microbiología del suelo.

Las actividades humanas que ocasionan la contaminación de los suelos por compuestos orgánicos sintéticos son, principalmente de tipo agrícola, a través del uso de pesticidas y derivados, así como de tipo industrial, que conllevan la descarga, intencionada o no, de los compuestos utilizados en los procesos de fabricación y de los productos de desecho. Como regla, estos contaminantes orgánicos no se encuentran de forma individual, sino en mezclas complejas.

Una vez liberados a los suelos, una compleja serie de procesos de transformación interviene en el destino de estos contaminantes. Las modificaciones pueden ser abióticas y biológicas. Las modificaciones abióticas incluyen reacciones fotoquímicas (en zonas expuestas) y químicas, y aunque pueden destruir o alterar significativamente el compuesto, nunca lo convierten en productos inorgánicos. Las modificaciones biológicas consisten en reacciones enzimáticas que frecuentemente dan lugar a una transformación profunda del contaminante. Estas reacciones de biodegradación conllevan la aparición de productos inorgánicos, orgánicos totalmente nuevos, así como de productos muy similares a los originales debido a transformaciones menores. Solo los microorganismos mineralizan totalmente los compuestos orgánicos sintéticos.

Las comunidades naturales de microorganismos presentes en estos suelos contaminados son capaces de metabolizar e incluso mineralizar un número enorme de moléculas orgánicas.

Cuando los contaminantes orgánicos han sido convertidos en CO_2 y H_2O , se dice que se ha producido la mineralización, la cual nunca se produce completa, debido a que parte del material orgánico se transforma en células y una parte importante en masa celular. Sin embargo, la transformación de materiales tóxicos y peligrosos en una combinación de CO_2 , H_2O y nuevas células elimina la mayor parte de los problemas que requieren recuperación.

El papel más importante de los microorganismos en la transformación de los contaminantes es su capacidad de llevar a cabo la detoxificación, que es la conversión de una molécula de tóxico en otra que lo es menos para cierta especie viva (humanos, animales, plantas, etc.). Desde el punto de vista del microorganismo, la detoxificación puede ser beneficiosa:

- a) Si el tóxico se encuentra en una concentración dentro del rango de toxicidad para el mismo, ó
- b) Si se utiliza el tóxico como fuente de carbono.

I.1.2 – Factores que afectan a la biorrecuperación.

Los factores que afectan al rendimiento de la biorrecuperación pueden clasificarse en tres grandes grupos: medioambientales, físicos y químicos.

a) Factores medioambientales.

Los factores medioambientales son aquellos necesarios a la hora de proporcionar las condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos que llevan a cabo la biorrecuperación. Los microorganismos son muy sensibles a los cambios de temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, oxígeno y humedad.

Los microorganismos tienen regiones de temperaturas óptimas y temperaturas por encima de las cuales la actividad microbiana se detiene. Las bacterias de un terreno actúan habitualmente en el intervalo de 5 a 40 °C, aunque la temperatura óptima dentro de dicho rango depende de cada especie. La mayoría de los microorganismos se desarrollan mejor dentro del rango de pH de 6 a 9, encontrándose las condiciones óptimas de crecimiento entre los pH 7 y 8.

Los nutrientes son aquellos compuestos químicos necesarios para el crecimiento microbiano que no proporcionan energía o carbono a los organismos.

Los microorganismos, oxidan compuestos orgánicos o inorgánicos, obteniendo así la energía necesaria para su crecimiento. El proceso de oxidación de los compuestos da lugar a electrones cuyo aceptor final es el oxígeno y cuyo producto final del proceso es el agua.

La humedad constituye un factor importante en la biorrecuperación debido a que los microorganismos obtienen todos los nutrientes necesarios para su crecimiento de soluciones.

b) Factores físicos

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

Muchos de los contaminantes más habituales poseen una baja solubilidad en agua y son adsorbidos con gran intensidad por partículas sólidas. Por ejemplo, los hidrocarburos derivados del petróleo son, en general, apolares y, de entre todas las fases, tienden a distribuirse en la fase sólida principalmente, lo que resulta en unas concentraciones de contaminante en la fase líquida muy bajas. Los contaminantes pueden acumularse en intersticios microscópicos demasiado pequeños para que las bacterias los colonicen. Debido a que los microorganismos toman los nutrientes de la fase líquida la tasa de biorrecuperación puede verse limitada por la velocidad con que se produce la desorción del contaminante desde la fase sólida a la fase acuosa.

La presencia de agua es necesaria ya que, como se ha visto con anterioridad, los microorganismos toman el carbono orgánico, los nutrientes inorgánicos y los aceptores de electrones, necesarios para el crecimiento bacteriano, de la fase líquida.

Por lo tanto, el agua debe estar en contacto con el contaminante y estar presente en cantidades que permitan el desarrollo de las comunidades bacterianas. Sin embargo, el agua puede llegar a inhibir el flujo de aire y reducir el suministro de oxígeno necesario para la respiración microbiana.

c) Factores químicos.

El factor químico más importante en biorrecuperación es la estructura molecular del contaminante, cómo ésta afecta a sus propiedades químicas y físicas y su capacidad para ser degradado. La capacidad para ser biodegradado está relacionada con factores tales como la solubilidad, el grado de ramificación, el grado de saturación y la naturaleza y el efecto de los sustituyentes.

La solubilidad constituye una propiedad fundamental, ya que los microorganismos toman los nutrientes de una solución acuosa. Una elevada solubilidad se traduce en una gran disponibilidad, en potencia, de un determinado compuesto.

Aunque la rotura de los enlaces carbono-carbono saturados no conlleva dificultad, el grado de saturación está relacionado con la volatilidad y la solubilidad. Los microorganismos degradan con mayor dificultad los anillos saturados, o los alcanos muy ramificados. La razón de fondo es la especificidad de los microorganismos para sus sustratos, una especificidad que está ligada, en gran parte, con la especificidad de los enzimas para catalizar sólo ciertos tipos de reacciones.

I.2- SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (PAHs).

El término *suelo* se refiere al material suelto de la superficie de la tierra. Los suelos proporcionan soporte físico y nutrientes para el crecimiento de las plantas y los microorganismos.

Las actividades humanas ocasionan la contaminación de los suelos por compuestos orgánicos sintéticos, entre los cuales se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs). Estos compuestos muy recalcitrantes y se encuentran en el petróleo. Son bien conocidos como compuestos cancerígenos tanto para los humanos como para otros organismos vivos, lo cual hace que la biorrecuperación de lugares contaminados con estos hidrocarburos sea de gran interés. Estos compuestos son producidos por actividades industriales tales como el procesamiento, almacenamiento y combustión del petróleo.

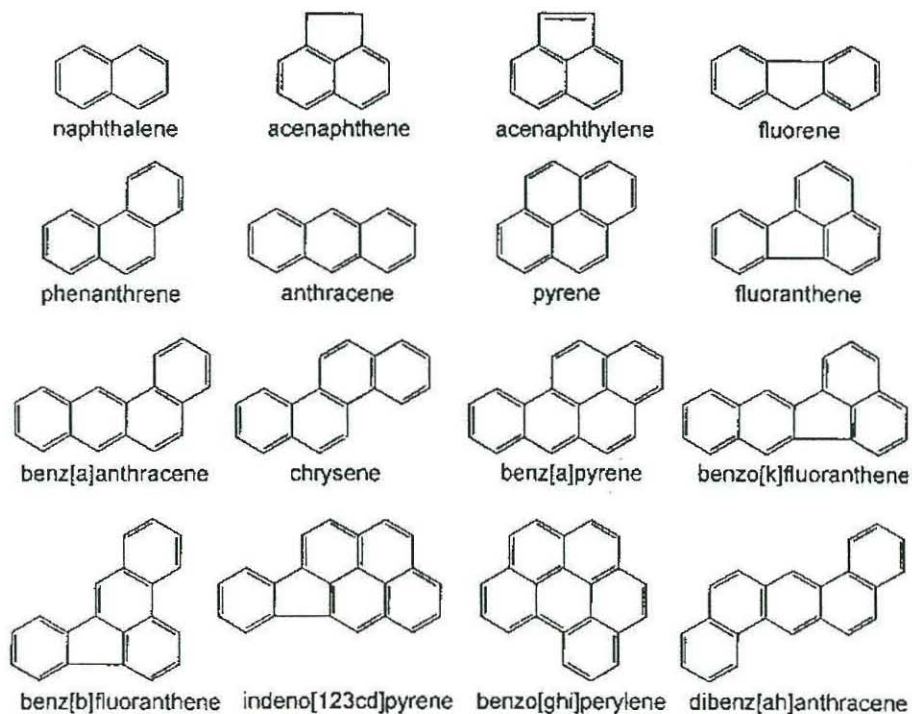


fig. 1: Estructura de los 16 PAHs.

La estructura aromática de estos compuestos, así como otras características químicas hacen que los PAHs sean altamente hidrofóbicos, con relativa baja solubilidad en agua y con gran tendencia a adsorberse en la superficie de las partículas orgánicas (minerales de la fracción arcillosa del suelo). La extensión de la degradación de los PAHs dependerá de la proporción de contaminante transferida desde la fase sólida a la fase acuosa donde se encuentran los microorganismos.

La adsorción se va afectada por varios factores, de los cuales, los más importantes son las propiedades del compuesto contaminante (por ejemplo, estructura molecular, carga, polaridad y solubilidad en agua) y las propiedades del terreno (por ejemplo, contenido en arcillas y compuestos orgánicos, pH, humedad y temperatura).

La presencia de fases orgánicas líquidas (“nonaqueous phase liquids – NAPLs) también afecta notablemente la biodegradación de compuestos hidrófobos que se acumulan en estas fases y se liberan muy lentamente. Las mezclas de NAPLs se liberan a los suelos de muchas formas, por ejemplo como pérdidas de tanques subterráneos de gasolina, alquitrán presente en los suelos de las instalaciones de gasificación del carbón, bifenilos policlorados (PCBs) liberados como residuos industriales. De esta forma, los NAPLs constituyen una fuente de contaminación a largo plazo si sus constituyentes pasan por reparto a la fase acuosa. Un compuesto también puede ser poco o nada biodisponible si entra en un microporo que es inaccesible a los microorganismos.

Todas estas circunstancias hacen que el mayor problema para el empleo de la biorrecuperación de suelos contaminados con PAHs, y por tanto una limitación a este procedimiento, sea la baja biodisponibilidad de este tipo de contaminantes.

I.3- TENSIOACTIVOS

I.3.1 – Factores físico-químicos de los tensioactivos.

Los tensioactivos son usados en biorrecuperación de suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) debido a que son capaces de aumentar la solubilidad y desorción de estos compuestos desde las partículas del suelo haciendo que el contaminante se encuentre más disponible para los microorganismos.

Los tensioactivos son moléculas orgánicas consistentes en una parte hidrofóbica y otra hidrofílica. La parte hidrofílica hace que los tensioactivos sean solubles en agua mientras que la parte hidrofóbica los hace tener tendencia a concentrarse en las interfases y por tanto, reducir la energía libre del sistema con el cual interaccionan.

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

La presencia de moléculas de tensioactivo en las interfases aire – agua provoca una reducción en la tensión superficial de la solución y lleva a la estabilización de las espumas. Algunos tensioactivos pueden reducir la tensión superficial de una solución acuosa desde 72 mN/m (valor del agua) hasta 30 ± 5 mN/m, dependiendo del tipo y concentración del tensioactivo.

Otra característica de los tensioactivos es la formación de micelas, pequeños agregados de moléculas del tensioactivo. A bajas concentraciones, en solución acuosa, lo que están presente son moléculas individuales del tensioactivo. Por encima de una cierta concentración, llamada concentración crítica micelar (“Critical Micelle Concentration”, CMC) las moléculas del tensioactivo se encuentran apiñadas formando agregados que oscilan entre 20 y 200 moléculas. La CMC es dependiente de la temperatura y diferente para cada tensioactivo. En términos simples, las micelas son pequeñas gotas con un núcleo hidrofóbico y una envoltura hidrofílica. La presencia de las micelas permite aumentar la solubilidad aparente de los compuestos orgánicos hidrofóbicos (HOCs). Esto es interpretado como un fenómeno de pseudo-solubilización.

I.3.2 – Interacciones tensioactivo – microorganismo.

a) Toxicidad

La introducción de un tensioactivo en el medioambiente podría considerarse como la entrada de un contaminante, por tanto la toxicidad del tensioactivo y sus productos de degradación son factores importantes a tener en cuenta a la hora de elegir un tensioactivo para la biorrecuperación de un suelo.

El efecto tóxico de los tensioactivos sobre las bacterias puede ser explicado de la siguientes formas:

- Interrupción del funcionamiento de las membranas celulares por interacción con los componentes lipídicos.
- Reacciones de las moléculas de tensioactivo con proteínas esenciales para el funcionamiento de la célula.

A pH 7 y superiores, los tensioactivos catiónicos son los más tóxicos mientras que los tensioactivos aniónicos tienen el comportamiento más tóxico a valores de pH menores. Los tensioactivos no-iónicos son en general menos activos contra las bacterias que los tensioactivos iónicos.

El uso de biotensioactivos es más aceptado desde el punto de vista social ya que se espera que sean menos tóxicos que los sintéticos pero en determinadas situaciones unos pueden ser tan tóxicos como los otros.

b) Biodegradación del Tensioactivo.

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

Los efectos negativos pueden ser causados por agotamiento de los minerales o el oxígeno, por toxicidad de los productos inmediatos de degradación del tensioactivo (pueden incluso ser más tóxicos que el compuesto inicial), o bien por una mayor preferencia del microorganismo por utilizar el tensioactivo como fuente de carbono disminuyendo la degradación del contaminante.

El efecto positivo más obvio del empleo de tensioactivos es que si es degradado desaparece del lugar al que se aplica.

c) Influencia de los tensioactivos en la movilidad bacteriana.

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

Este efecto puede explicarse por:

- El tensioactivo puede causar una disminución de la adsorción reversible de la bacteria debido a su densidad de carga.
- El tensioactivo puede aumentar la floculación y con ello incrementar el transporte de la bacteria.
- El tensioactivo puede provocar la disolución de los polímeros extracelulares responsables de la irreversible adsorción de la bacteria.

Por tanto la adhesión puede alterar la actividad de los microorganismos. Este efecto de los tensioactivos puede ser importante para la biorrecuperación de suelos *in situ* en el cual el transporte de bacterias puede ser un proceso esencial

d) Tensioactivos y biodisponibilidad del contaminantes.

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

- Emulsificación de los contaminantes en fase líquida no acuosa. Los tensioactivos pueden disminuir la tensión superficial entre una fase acuosa y otra no acuosa. Esto puede incrementar la formación de micro-emulsiones, lo cual resulta en un aumento del área de contacto, permitiendo aumentar el transporte del contaminante hacia la fase acuosa.
- Aumento de la solubilidad aparente del contaminante. Este efecto es también denominado pseudo-solubilización y es causado por la presencia de micelas. Los compuestos orgánicos hidrofóbicos, podrían disolverse significativamente en el núcleo de las micelas.
- El transporte de los hidrocarburos en la micela hacia la fase acuosa puede ser rápido debido al pequeño tamaño de las micelas pero no está demasiado claro que los hidrocarburos pseudo- solubilizados estén disponibles directamente a los microorganismos. Este hecho provoca que las micelas estén disminuyendo la biodisponibilidad del contaminante y por tanto su biodegradación.
- Transporte del contaminante facilitada por la disminución de la tensión superficial que provoca el tensioactivo en el agua contenida en los poros del suelo.

I.4 – CINETICA DE DESORCION DE PAHs.

El proceso de desorción de los compuestos orgánicos desde una matriz como el suelo normalmente muestra un comportamiento similar al de la degradación, es decir, una primera fase de rápida desorción seguida de una segunda etapa de desorción lenta.

El mecanismo que explica este comportamiento sugiere que:

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

Debido a que los microorganismos probablemente solo pueden degradar PAHs disueltos, la baja desorción de compuestos orgánicos desde las partículas del suelo hasta el agua interfacial, donde serán degradados, es la causa más citada de la limitación de la biodegradación. Si la desorción lenta limita la biodegradación, es posible que la degradación en la primera fase rápida solo se vea limitada por factores microbiológicos y la segunda fase de desorción lenta éste limitada por procesos de difusión.

Las cinéticas de desorción de PAHs desde una matriz como es un suelo contaminado pueden ser estudiadas utilizando Tenax. Se trata de un polímero poroso con alta capacidad de absorción, capaz de absorber los PAHs del suelo manteniendo la fase acuosa libre de soluto. La extracción con Tenax es usada para determinar la fracción de desorción rápida del contaminante y poder predecir la extensión de la biodegradación ya que el Tenax posee un comportamiento muy similar al de los microorganismos, en el sentido en que ambos aumentan el gradiente de concentración de PAHs en la interfase suelo – agua.

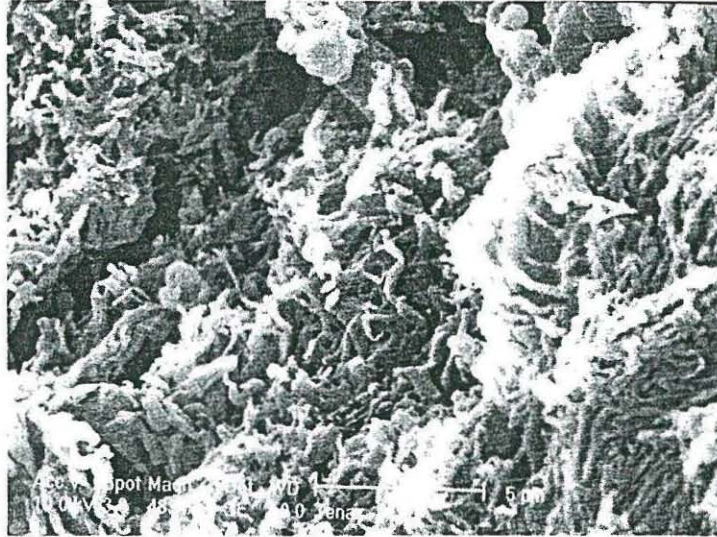


Foto 1: vista de una perla de Tenax a través del microscopio electrónico.

El proceso de desorción de los contaminantes desde el suelo puede ser descrito siguiendo un modelo de doble compartimento con cinética de primer orden para cada uno de ellos. Para esta interpretación asumimos que $K_{slow} \ll K_{fast}$ en la siguiente ecuación:

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

donde S_t y S_o son la cantidad desorbida del suelo a un tiempo t (h) y la cantidad presente al comienzo del experimento respectivamente. F_{rap} y F_{slow} son las fracciones de desorción rápida y lenta. Las constantes de desorción rápida y lenta son designadas como k_{rap} y k_{slow} (h^{-1}), respectivamente.

Los valores de F_{rap} , F_{slow} , k_{rap} y k_{slow} fueron determinadas por mínimos cuadrados de las fracciones residuales acumulativas entre los valores experimentales y los calculados de $\ln (S_t/S_o)$ por la ecuación anterior.

El estudio de la cinética de desorción del contaminante puede ayudarnos a probar que la baja desorción es la causa de la limitada biodegradación y en que medida se puede actuar en un suelo biorremediándolo.

II. OBJETIVOS

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

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

El trabajo realizado ha consistido en el uso de inóculos específico del género *Mycobacterium* y *Sphingomonas*, bacterias del suelo especializadas en biodegradación de PAHs, y tensioactivos sintéticos para incrementar la acción descontaminadora en suelos originales.

Los objetivos principales de este trabajo han sido:

1. Estudiar el posible efecto tóxico de los tensioactivos sobre la población microbiana, tanto en sistemas acuosos como en suspensiones de suelo, utilizando diferentes concentraciones de los tensioactivos objeto de estudio, todas ellas superiores a sus valores de CMC.
2. Investigar el efecto de los tensioactivos en la velocidad de biodegradación de sistemas acuosos y en suspensiones de suelos contaminados con PAHs.
3. Estudiar la cinética de desorción de los PAHs mediante la utilización de Tenax. Probar que la baja desorción de los PAHs es la causa de la limitada biodegradación.
4. Comparación entre la fracción de PAHs resistente a desorción y la fracción resistente a biodegradación. .
5. Estudiar la influencia de los tensioactivos en la fase de biodegradación lenta.

III. MATERIALES Y METODOLOGÍA

III.1- Reactivos

Los compuestos no marcados usados en este estudio han sido los siguientes: fluoreno (98%), antraceno (99%), fenantreno (>96%, HPLC), fluoranteno (99%, HPLC) y pireno (98%), todos ellos obtenidos de la casa Sigma Chemical Co. Los compuestos marcados usados son: [9-14C] fenantreno, [4,5,9,10-14C] pireno, [1,2,3,4,4a,9a-14C] antraceno, [9-14C] fluoreno y [3-14C] fluoranteno todos ellos con una pureza radioquímica >98% también de Sigma.

Se utilizaron tres tensioactivos diferentes para este estudio, todos ellos pertenecientes al grupo de los no-iónicos. El valor de CMC para cada tensioactivo fue determinado mediante la medida de la tensión superficial de soluciones acuosas del tensioactivo a distintas concentraciones usando para ello un tensiometro de anillo (Td1 LAUDA). Los tensioactivos utilizados fueron todos ellos suministrados por la casa Sigma-Aldrich. Los valores de CMC que se obtuvieron para estos tensioactivos, tanto en agua como en el medio de cultivo utilizado en los diferentes ensayos, medio de mineralización, se muestran en la siguiente tabla:

TENSIOACTIVO	PESO MOLECULAR	FORMULA MOLECULAR	CMC (dyn/cm) en agua	CMC (dyn/cm) en medio de cultivo
BRIJ 30	363	$C_{12}H_{25}(CH_2CH_2O)_4OH$	40	80
BRIJ 35	1200	$C_{12}H_{25}(CH_2CH_2O)_{23}H$	100	150
TRITON X-100	625	$C_{14}H_{21}(CH_2CH_2O)_{10}OH$	100	80

Tabla 1: Propiedades de los tensioactivos

Para la realización de las cinéticas de desorción de los PAHs se utilizó Tenax TA (60 – 80 de malla), un polímero suministrado por Teknokroma. Antes de usarlo, el Tenax debe ser acondicionado mediante sucesivos lavados con agua destilada, acetona y hexano (3 lavados con 10 ml/g de Tenax) y secado durante toda una noche en estufa a 75 – 80°C.

III.2- Suelos

Para el desarrollo de este estudio se utilizó un suelo contaminado con Creosota procedente de una planta de tratamiento de maderas localizada en el Sur de España.

La muestra fue tomada del horizonte superficial del suelo a una profundidad de un metro hasta donde la Creosota había penetrado. En el muestreo se tomaron diferentes puntos que fueron nombrados por orden alfabético. En este estudio utilizaremos la muestra B.

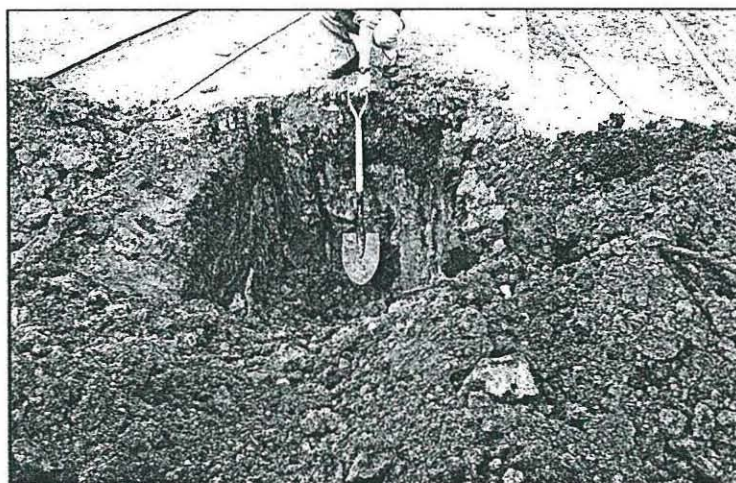


Foto 2: Zona de muestreo del suelo B.

El suelo húmedo fue homogeneizado, secado al aire, pasado por un molino de tambor rotatorio y cilindros de acero y posteriormente tamizado a través de un tamiz de 2 mm de luz de malla. Se conservó a 4°C y en oscuridad.

El análisis del suelo B reveló que poseía una humedad del 4.9%, un contenido en materia orgánica de 2.84 % y pH 8.17 %. El análisis granulométrico fue el siguiente: 1.1 % de arena gruesa, 2.4 % de arena fina, 37.0 % de limo y 59.5 % de arcilla.

III.3 – Desorción.

Las cinéticas de desorción de los PAHs fueron determinadas a temperatura ambiente mediante un proceso de extracción en fase sólida con Tenax.

La extracción con Tenax es una buena técnica para la realización de los experimentos de desorción debido a su alta capacidad de absorción del soluto desde la fase acuosa.

Para la realización de la desorción se utilizó un embudo de decantación de 250 ml donde se introdujo una mezcla de Tenax TA (1.5 g), suelo (1g peso seco), agua milli-Q (70 ml) y formaldehído al 40 % (0.5 ml por cada 100 ml de fase acuosa) que actúa como biocida. El embudo fue sometido a agitación constante (180 rpm).

El Tenax fue renovado por Tenax nuevo a intervalos de tiempo periódicos y extraído con 50 ml de hexano durante 48 horas. Tras separar el Tenax y el hexano mediante filtración se redujo el volumen de hexano en el rotavapor hasta aproximadamente unos 5 ml. Posteriormente se evaporó totalmente el hexano llevando el extracto a corriente de Nitrógeno. Previamente a su análisis por HPLC, se resuspendió el extracto en acetonitrilo (fase móvil del HPLC).

Tras finalizar la desorción, el suelo fue extraído con Soxhlet para el análisis analizado de la fracción de PAHs residuales resistentes a la desorción con Tenax..

III.4- Bacterias, medios, condiciones de cultivo y preparación de inóculos.

Las bacterias utilizadas en este estudio tienen como origen el propio suelo contaminado con hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) y son capaces de crecer con los PAHs individuales como única fuente de carbono y de energía. Estas bacterias pertenecen al género *Mycobacterium* (VM 552 WT capaz de degradar fenantreno, fluoranteno y pireno) y *Sphingomona* (LH 128 WT degradadora de fenantreno). La *Mycobacterium* fue aislada del suelo contaminado mediante un método en el que se usó una membrana de Teflón que contenía los PAHs adsorbidos. La *Sphingomona* fue aislada mediante el método de enriquecimiento en medio acuoso. Ambas bacterias fueron cedidas por el Dr. Dirk Springael (Vlaamse Instelling Voor Technologisch Onderzoek, Mol, Belgium).

Dos diferentes medios se utilizaron para cultivar las estirpes: un medio mínimo Tris, que hemos llamado medio Bélgica (MB), utilizado para la estirpe LH 128 WT, cuya composición, en 1 litro de agua destilada, era: 6 g de Tris, 4.67 g de NaCl, 1.5 g de KCl, 0.42 g de Na₂SO₄, 0.20 g de MgCl₂.6H₂O, 0.022 g de CaCl₂.2H₂O, 0.080 g de Na₂HPO₄.12H₂O, 0.0048 g Fe(III)NH₄ citrato y, como solución traza, se añadió 1 ml de una solución stock compuesta por 100 ml de agua destilada y 14.4 mg de ZnSO₄.7H₂O, 9.8 mg de MnCl₂.4H₂O, 6.18 mg de H₃BO₃, 19 mg de CoCl₂.6H₂O, 1.7 mg de Cl₂Cu.2H₂O, 2.37 mg de NiCl₂.6H₂O, 3.6 mg de Na₂MoO₄.2H₂O. Después de ajustar el pH a 7 con HCl 2N, el medio se esterilizó.

Un medio fosfato tomponado, que hemos denominado medio Suiza (SW), utilizado para la estirpe VM 552 WT tenía la siguiente composición, por litro de agua destilada: un Stock I de 1.75 g de Na₂HPO₄.2H₂O y 0.2 g de KH₂PO₄. Otro Stock II de 0.5 g de (HN₄)₂SO₄, 0.1 g de MgCl₂.6H₂O y 0.05 g de Ca(NO₃)₂.4H₂O. Ambos Stocks se autoclavaron por separado.

Como solución traza se añadieron, através de fitro Millipore de 0.2 μm , 2.5 ml de una solución stock III de 1 l compuesta por 800 mg de Na_2EDTA , 300 mg de FeCl_2 , 10 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mg de CuSO_4 , 3 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 mg de ZnCl_2 , 0.5 mg de LiCl , 0.5 mg de SnCl_2 , 1mg de H_3BO_3 , 2 mg de KBr , 2 mg de KI y 0.5 mg de BaCl_2 {Harms & Zehnder 1994 23 /id}. Este medio de cultivo se usó para la estirpe VM 552 WT.

Las bacterias se mantuvieron en el medio de sales minerales correspondiente, en continua agitación a 30°C y con 0.2 % del PAH respectivo como única fuente de carbono.

En los experimentos de mineralización y de biodegradación complementarios se utilizó un medio de cultivo al que hemos llamado medio de mineralización , y está compuesto por cada litro de agua: un Stock I que contiene 900 mg de KH_2PO_4 , 100 mg de K_2HPO_4 , un Stock II de 100 mg de NH_4NO_3 , 100 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 80 mg de CaCl_2 . Ambos Stocks se autoclavaron por separado y una vez enfriados se mezclaron y se les añadió 10 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, y 1 ml de un Stock III que contenía por litro de agua los siguientes elementos traza: 1.4 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 2 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 2 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Este medio de cultivo tiene pH de 5.7 {Efroymsen & Alexander 1994 27 /id}.

Para la preparación de los inóculos de ambas bacterias se siguió el mismo procedimiento. Los cultivos se pasaron a través de un filtro de placa porosa de 40 μm de tamaño de poro, para eliminar el resto de los cristales del PAH.

El cultivo se lavó tres veces con medio de mineralización fresco centrifugando durante 10 minutos a 8000 rpm. Tras el lavado se resuspendió el pellet en un volumen conocido de medio de mineralización fresco y estéril. Las células viables fueron cuantificadas en cada experimento como unidades formadoras de colonias (CFU) después de sucesivas diluciones del pellet con medio de cultivo y sembrar en placas de TSA (Tryptone Soy Agar).

La estirpe de *Sphingomonas* forma en medio TSA (Trypticase Soy Agar) colonias pequeñas amarillas y las de *Mycobacterium* colonias de mayor tamaño, color anaranjado y de aspecto opaco y mucoso.

Además se midió la densidad óptica a 600 nm del pellet obtenido en un espectrometro de UV – Visible (Genesys 10 vis, Spectronic Unicam).

III.5- Adhesión bacteriana.

La medida de la adhesión bacteriana se realizó tomando un cultivo en fase exponencial tardía de crecimiento. Tras filtrarlo a través de una placa porosa para eliminar los cristales del PAH, se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en 10 – 20 ml de medio de cultivo y se midió su densidad óptica a 400 nm (D.O₁). A continuación a 2 ml del inóculo se le añadieron 0.5 ml de hexadecano o heptametilnonano y se agitó durante 2 minutos en el Vórtex. Tras la separación de las dos fases, se tomó la fase acuosa y se midió su densidad óptica a 400 nm (D.O₂).

La hidrofobicidad se midió como % de adherencia de las bacterias a la fase orgánica.

$$\% \text{ adherencia} = [1 - (D.O_2 / D.O_1)] \times 100$$

Los valores obtenidos para las estirpes utilizadas en este estudio fueron de 28.9 % para la *Sphingomonas* LH 128 WT y de 65.5 % para la *Mycobacterium* VM 552 WT. Con estos valores se concluyó que la bacteria VM 552 WT es mas hidrofóbica que la LH 128 WT, lo cual supone una mayor tendencia a adherirse a superficies hidrofóbicas como es la de los PAHs.

III.6- Mineralización y biodegradación.

III.6.1- Mineralización y biodegradación de fenantreno en sistemas acuosos en presencia de tensioactivo.

Para medir la mineralización de fenantreno en sistemas acuosos se prepararon duplicados en matraces Erlenmeyer de 250-ml. Se añadieron entre 80000 y 100000 dpm de fenantreno marcado [$9\text{-}^{14}\text{C}$] y suficiente compuesto no marcado para tener una concentración final de 1.4-1.5 mg por cada 70 ml de medio de cultivo en cada matraz, lo cual supone una cantidad de fenantreno similar a la que hay por cada gramo de suelo (cantidad utilizada en los experimentos de mineralización y biodegradación con suelo en suspensión). El substrato se añadió en una solución de diclorometano, que se dejó evaporar. Se prepararon dos series de matraces diferentes los cuales fueron inoculados con 10^7 CFU/ml de *Mycobacterium* y *Sphingomonas* respectivamente.

Se añadió una solución acuosa de Tritón X-100 de forma que en cada matraz la concentración final del tensioactivo era de 500 $\mu\text{g/ml}$. Los matraces 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 en continua agitación.

Se midió la producción de $^{14}\text{CO}_2$ midiendo la radioactividad que aparecía en una trampa de sosa {Ortega-Calvo, Birman, et al. 1995 175 /id}. Esta trampa 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 obscuridad durante al menos 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 $p=0.05$.

Para el estudio de la biodegradación en sistemas acuosos, complementario a la mineralización, las dos series de matraces fueron preparadas en las mismas condiciones que para el estudio de la mineralización con la diferencia de que no se añadió sustrato marcado ni se cerraron con trampas de sosa. A tiempo final del experimento estos matraces fueron congelados, por duplicado para cada tratamiento, a -80°C , para detener la actividad microbiana. Posteriormente se analizó la cantidad residual de fenantreno mediante HPLC de fluorescencia previa extracción del contaminante.

III.6.2- Mineralización y biodegradación de varios PAHs en suelos en suspensión por las bacterias autóctonas del suelo.

Para medir la mineralización de PAHs en sistemas formados por suelos en suspensión se prepararon duplicados en matraces Erlenmeyer de 250-ml para cada uno de los sustratos seleccionados. Se añadieron entre 80000 y 100000 dpm de fluoreno marcado [$9\text{-}^{14}\text{C}$], fenantreno [$9\text{-}^{14}\text{C}$], [1,2,3,4,4a,9a- ^{14}C] antraceno, [3- ^{14}C] fluoranteno y [4,5,9,10- ^{14}C] pireno en matraces diferentes. Los sustratos marcados se añadieron en solución acuosa de medio de mineralización para facilitar su absorción en el suelo. Se añadieron, a cada matraz, 15 gramos de suelo seco y 100 ml de medio de cultivo. Los matraces 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 en continua agitación. Se midió la producción de $^{14}\text{CO}_2$ midiendo la radioactividad que aparecía en una trampa de sosa {Ortega-Calvo, Birman, et al. 1995 175 /id}.

Esta trampa 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 obscuridad durante al menos 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 $p=0.05$.

Para el estudio de la biodegradación, en sistemas con suelo en suspensión, complementario a la mineralización, se prepararon matraces en las mismas condiciones que para el estudio de la mineralización con la diferencia de que no se añadió sustrato marcado ni se cerraron con trampas de sosa. A intervalos de tiempo determinados y a tiempo final del experimento se congelaron matraces, por duplicado, a -80°C para detener la actividad microbiana. Posteriormente se analizaron las cantidades residuales de los PAHs mediante HPLC de fluorescencia previa extracción Soxhlet del contaminante.

III.6.3- Mineralización y biodegradación de varios PAHs en suelos en suspensión inoculados.

Para medir la mineralización de PAHs en sistemas formados por suelos en suspensión se prepararon duplicados en matraces Erlenmeyer de 250-ml para cada uno de los sustratos seleccionados. Se añadieron entre 80000 y 100000 dpm de fenantreno [$9\text{-}^{14}\text{C}$], [$3\text{-}^{14}\text{C}$] fluoranteno y [$4,5,9,10\text{-}^{14}\text{C}$] pireno en matraces diferentes. Los sustratos marcados se añadieron en solución acuosa de medio de mineralización para facilitar su absorción en el suelo. Se añadieron, a cada matraz, 1 gramo de suelo seco y estéril y 70 ml de medio de mineralización, con lo cual se guardan las mismas condiciones que en los experimentos de desorción con Tenax. Se prepararon dos series de matraces diferentes los cuales fueron inoculados con 10^7 CFU/ml de *Mycobacterium* y *Sphingomonas* respectivamente.

Los matraces 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 en continua agitación. Se midió la producción de $^{14}\text{CO}_2$ midiendo la radioactividad que aparecía en una trampa de sosa {Ortega-Calvo, Birman, et al. 1995 175 /id}. Esta trampa 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 obscuridad durante al menos 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 $p=0.05$.

Para el estudio de la biodegradación, en sistemas con suelo en suspensión, complementario a la mineralización, se prepararon matraces en las mismas condiciones que para el estudio de la mineralización con la diferencia de que no se añadió sustrato marcado ni se cerraron con trampas de sosa. A tiempo final del experimento se congelaron los matraces, por duplicado para cada bacteria, a -80°C para detener la actividad microbiana. Posteriormente se analizaron las cantidades residuales de los PAHs mediante HPLC de fluorescencia previa extracción Soxhlet del contaminante.

III.6.4 - Mineralización y biodegradación de fenantreno en suelos en suspensión inoculados y en presencia de Triton X-100.

Para medir la mineralización de fenantreno en sistemas formados por suelos en suspensión se prepararon duplicados en matraces Erlenmeyer de 250-ml. Se añadieron aproximadamente 90000 dpm de fenantreno [$9\text{-}^{14}\text{C}$] en cada matraz. El sustrato marcado se añadió en solución acuosa de medio de mineralización para facilitar su absorción en el suelo.

Se añadieron , a cada matraz, 1 gramo de suelo seco y estéril y 60 ó 70 ml de medio de mineralización (según el volumen a añadir de los stocks de Triton X-100 preparados), con lo cual se guardan las mismas condiciones que en los experimentos de desorción con Tenax.

Se prepararon dos Stocks en medio de mineralización de Tritón X-100 de 35000 y 70000 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Se añadieron 1 ó 2 ml del stock de 35000 $\mu\text{g/ml}$ a cada matraz según queramos conseguir una concentración de 500 ó 1000 $\mu\text{g/ml}$ y 5 ó 10 ml del stock de 70000 $\mu\text{g/ml}$ para conseguir 5000 ó 10000 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

La suspensión se mantuvo en agitación durante 48 horas para homogeneizar el suelo con el tensioactivo y el sustrato marcado. Tras homogeneizar, los matraces fueron inoculados con 10^7 CFU/ml de *Mycobacterium* VM 552 WT. Posteriormente 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 en continua agitación. Se midió la producción de $^{14}\text{CO}_2$ midiendo la radioactividad que aparecía en una trampa de sosa {Ortega-Calvo, Birman, et al. 1995 175 /id}. Esta trampa 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 obscuridad durante al menos 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 $p=0.05$.

Para el estudio de la biodegradación, en sistemas con suelo en suspensión en presencia de distintas concentraciones de Tritón X-100, complementario a la mineralización, se prepararon matraces en las mismas condiciones que para el estudio de la mineralización con la diferencia de que no se añadió sustrato marcado ni se cerraron con trampas de sosa. A tiempos intermedios y a tiempo final del experimento se congelaron los matraces, por duplicado para cada tratamiento, a -80°C para detener la actividad microbiana.

Posteriormente se analizaron las cantidades residuales de los PAHs mediante HPLC de fluorescencia previa extracción Soxhlet del contaminante.

III.6.5 - Mineralización y biodegradación de fenantreno en suelos en suspensión inoculados y en presencia de los tensioactivos Triton X-100, Brij 30 y Brij 35.

Para medir la mineralización de fenantreno en sistemas formados por suelos en suspensión se prepararon duplicados en matraces Erlenmeyer de 250-ml. Se añadieron aproximadamente 90000 dpm de fenantreno [$9\text{-}^{14}\text{C}$] en cada matraz. El sustrato marcado se añadió en solución acuosa de medio de mineralización para facilitar su absorción en el suelo. Se añadieron, a cada matraz, 1 gramo de suelo seco y estéril y 60 ó 70 ml de medio de mineralización (según el volumen a añadir de los stocks de los tensioactivos preparados), con lo cual se guardan las mismas condiciones que en los experimentos de desorción con Tenax.

Se prepararon tres Stocks en medio de mineralización de Tritón X-100, Brij 30 y Brij 35 de 70000 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Se añadieron 0.5 ó 10 ml del stock de cada tensioactivo a cada matraz según queramos conseguir una concentración de 500 ó 10000 $\mu\text{g/ml}$ en el matraz. La suspensión se mantuvo en agitación durante 48 horas para homogeneizar el suelo con el tensioactivo y el sustrato marcado. Tras homogeneizar, los matraces fueron inoculados con 10^7 CFU/ml de *Mycobacterium* VM 552 WT. Posteriormente 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 en continua agitación.

Se midió la producción de $^{14}\text{CO}_2$ midiendo la radioactividad que aparecía en una trampa de sosa {Ortega-Calvo, Birman, et al. 1995 175 /id}. Esta trampa 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 al menos 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 $p=0.05$.

Para el estudio de la biodegradación, en sistemas con suelo en suspensión en presencia de distintas concentraciones de Tritón X-100, Brij 30 y Brij 35, complementario a la mineralización, se prepararon matraces en las mismas condiciones que para el estudio de la mineralización con la diferencia de que no se añadió sustrato marcado ni se cerraron con trampas de sosa. A tiempo final del experimento se congelaron los matraces, por duplicado para cada tratamiento, a -80°C para detener la actividad microbiana. Posteriormente se analizaron las cantidades residuales de los PAHs mediante HPLC de fluorescencia previa extracción Soxhlet del contaminante.

III.7 – Extracción de PAHs del suelo y limpieza de la muestra.

Tanto para el análisis del contenido en PAHs del suelo B original como para las muestras a tiempos intermedios y tiempo final de los ensayos de biodegradación, el procedimiento de extracción y limpieza que se siguió es el que a continuación se detalla.

Para la extracción de los PAHs del suelo se utilizó un extractor Soxhlet de 250 ml. El extractante utilizado fue diclorometano (100 ml). La muestra de suelo seco (1g aproximadamente) se introdujo en un cartucho de celulosa (19 x 90 mm) y se sometió a extracción continua durante 8 horas. El extracto recogido se llevó al rotavapor hasta reducir el volumen a unas gotas, tras lo cual se añadieron 5 ml de diclorometano. Posteriormente este extracto se pasó por un cartucho de limpieza de florisil (Sep-Pak cartridges, WATERS) previamente acondicionados con 9.6 ml de diclorometano con ayuda de una jeringa Hamilton.

Tras pasar el extracto a través del cartucho se pasaron también 2 ml de diclorometano para arrastrar los posibles PAHs que hayan podido quedar retenidos. El extracto limpio se llevó a una corriente de Nitrógeno hasta sequedad. Posteriormente se resuspendió en un volumen perfectamente conocido de acetonitrilo (fase móvil del HPLC) y se llevó al sonicador. El extracto fue filtrado a través de filtros Watman (grado 1, $0.45\ \mu\text{m}$ y 2.5 cm de diámetro) antes de llevarlo a los viales de HPLC, para eliminar posibles partículas de sólido que puedan interferir en la columna del HPLC.

III.8 – Análisis de PAHs por Cromatografía Líquida de Alta Resolución .

Tanto para el análisis del contenido en PAHs del suelo B original como para las muestras a tiempos intermedios y tiempo final de los ensayos de biodegradación, las condiciones cromatográficas fueron las mismas.

Los análisis se llevaron a cabo con un cromatógrafo líquido de alta resolución (Waters 2690 Separations Module) equipado con dos detectores: un detector de UV-VIS (Waters 996 Photodiode Array Detector) y otro de fluorescencia (Waters 474 Scanning Fluorescence Detector). La columna empleada era especial para análisis de PAHs (Waters PAH Columns, C18, 5 μ m, 4.6 x 250 mm). Como fases móviles se utilizaron acetonitrilo de calidad HPLC y agua milli-Q.

Para la puesta a punto de las condiciones cromatográficas óptimas para el análisis de los PAHs se utilizó un patrón que contenía 16 PAHs (8270 Calibration Mix #5, 2000 μ g/ml de cada PAH, en diclorometano, RESTEK Corporation).

Las condiciones cromatográficas que se utilizaron fueron las siguientes:

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

GRADIENTE DE LA FASE MOVIL

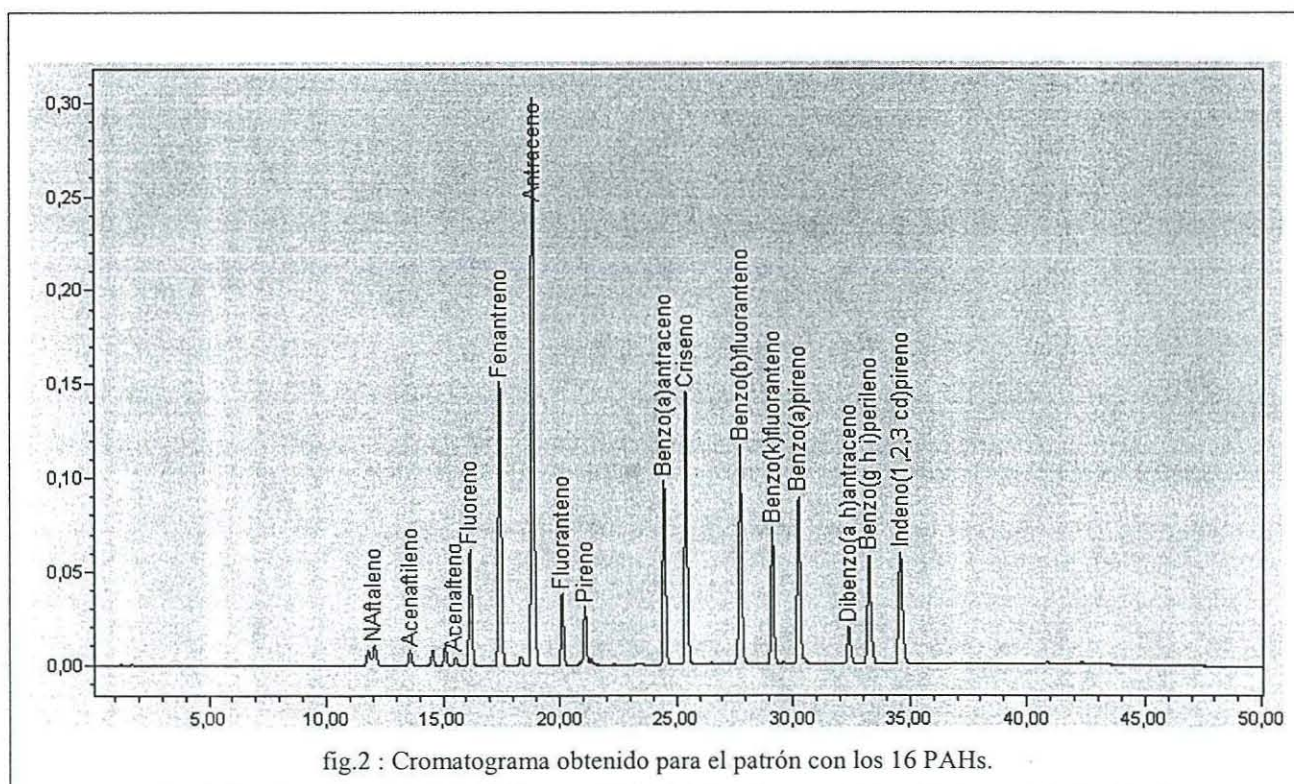
TIEMPO (min)	% ACETONITRILO	% AGUA
0	45	55
5	45	55
25	95	5
31	100	0
38	100	0
43	45	55

Tabla 2: Gradiente empleado como fase móvil en el análisis de las muestras de suelo.

PROGRAMACIÓN DETECTOR DE FLUORESCENCIA

TIEMPO (min)	λ excitación	λ emisión
0.0	270	323
14.5	248	374
21.0	270	400
32.5	305	430
38.0	270	323

Tabla 3: Programación detector de fluorescencia, HPLC.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 - Contenido de PAHs del suelo B.

Previamente a los experimentos de desorción, mineralización y biodegradación, se sometió el suelo objeto de estudio a un procedimiento de extracción de los contaminantes y posterior análisis de estos por HPLC siguiendo el protocolo que se explicó en el apartado de metodología.

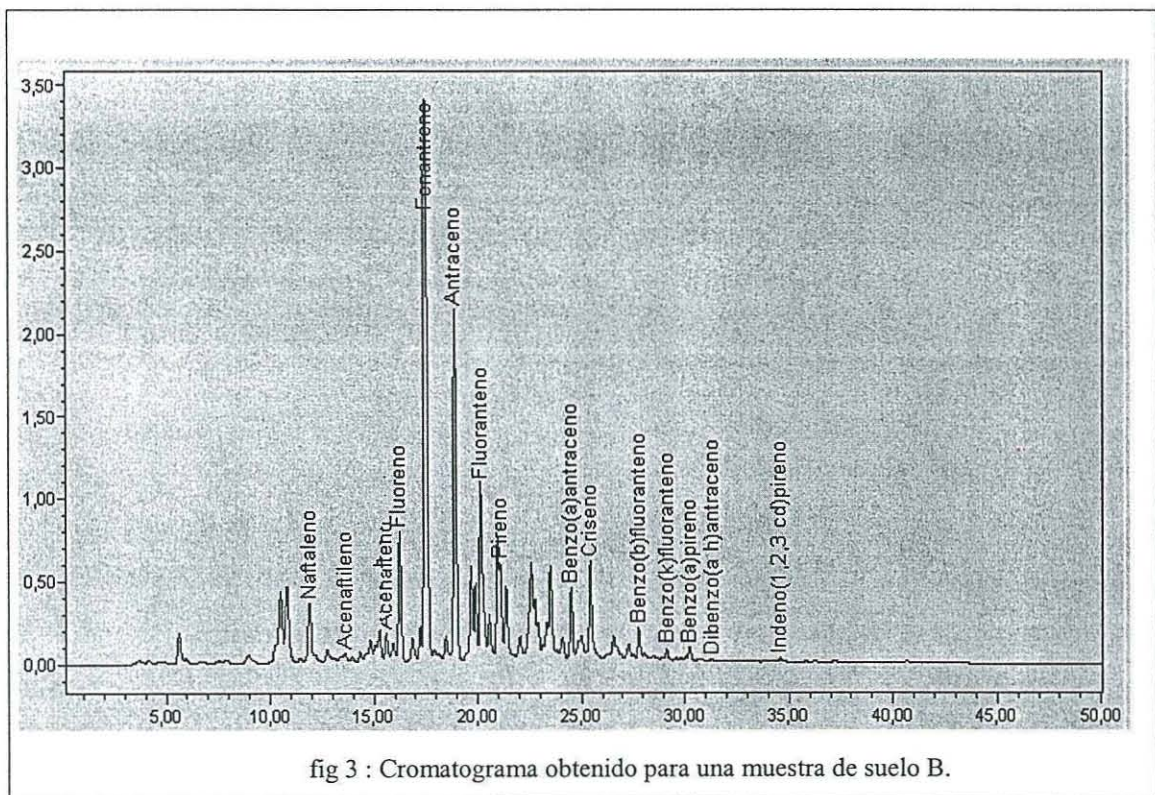


fig 3 : Cromatograma obtenido para una muestra de suelo B.

Las concentraciones obtenidas para cada uno de los 16 PAHs presentes en el suelo B fueron utilizadas como valores iniciales a los experimentos de desorción, mineralización y biodegradación llevados a cabo en este estudio.

Las concentraciones para los 16 PAHs obtenidas para el suelo B fueron las siguientes:

PAHs	[PAHs]	
	(mg(Kg S:S))	DESVIACION
Naftaneno	57.021	12.687
Acenaftileno	20.996	0.0000
1-metilnaftaleno	260.280	49.874
2-metilnaftaleno	277.956	16.015
Acenafteno	793.338	8.778
Fluoreno	306.328	5.653
Fenantreno	1315.845	98.379
Antraceno	286.315	9.097
Fluoranteno	881.505	3.420
Pireno	395.217	15.033
Benzo(a)antraceno	127.488	3.658
Criseno	143.137	3.697
Benzo(b)fluoranteno	76.066	3.124
Benzo(k)fluoranteno	30.516	2.200
Benzo(a)pireno	27.676	2.796
Dibenzo(ah)antraceno	22.546	0.0000
Benzo(ghi)perileno	4.866	0.0000
Indeno(1,2,3-cd)pireno	11.545	0.0000

Tabla 4: Contenido en PAHs del suelo B.

Los valores obtenidos muestran que se trata de un suelo altamente contaminado por hidrocarburos policíclicos aromáticos. De los 16 PAHs encontrados en el suelo, el fenantreno es el que se encuentra en mayor concentración. Por ello será este compuesto el que utilizaremos como valor de referencia a la hora de comprobar en que extensión se ha producido la biodegradación de los PAHs en el suelo.

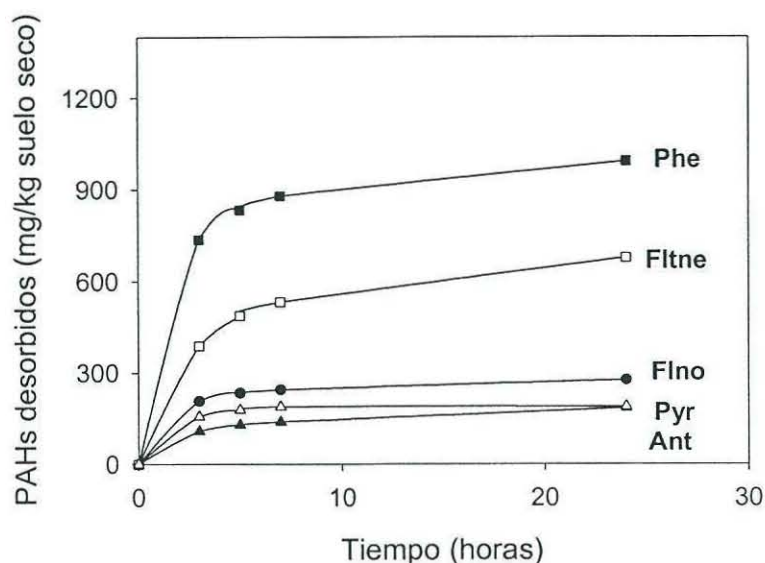
IV.2 – Estudio de las cinéticas de desorción de los PAHs.

Como paso previo a los experimentos de mineralización y biodegradación, se estudiaron las cinéticas de desorción de varios PAHs. Con ello se obtuvo información previa sobre la fracción lábil de PAHs y por tanto la extensión en la que podría ocurrir la biodegradación de estos compuestos.

El estudio de las cinéticas además, nos dió información sobre qué cantidad de PAHs quedaba en el suelo como fracción resistente a la biodegradación y por tanto podría limitar este proceso.

Los cinco PAHs elegidos para este estudio fueron fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno, por ser los que se encuentran en mayor concentración en el suelo y porque las bacterias que se utilizaron en los experimentos de mineralización y biodegradación degradan estos compuestos principalmente.

Las cinéticas obtenidas, mediante la utilización de Tenax, para cada uno de los compuestos mencionados fueron las siguientes:

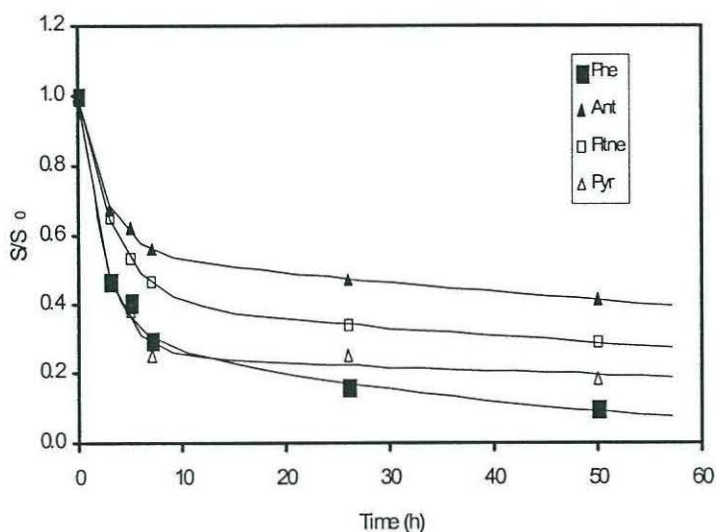


graf 1: Cinetica de desorcion con Tenax para cinco PAHs.

El proceso de desorción de los contaminantes desde el suelo puede ser descrito siguiendo un modelo de doble compartimento con cinética de primer orden para cada uno de ellos. Para esta interpretación asumimos que $K_{slow} \ll K_{fast}$ en la siguiente ecuación:

$$S_t / S_0 = F_{rap} \exp(-k_{rap} \cdot t) + F_{slow} \exp(-k_{slow} \cdot t)$$

donde S_t y S_0 son la cantidad desorbida del suelo a un tiempo t (h) y la cantidad presente al comienzo del experimento respectivamente. F_{rap} y F_{slow} son las fracciones de desorción rápida y lenta. Las constantes de desorción rápida y lenta son designadas como k_{rap} y k_{slow} (h^{-1}), respectivamente.



graf 2: Ajuste cinética de desorción con Tenax del suelo B.
El Ajuste para Fluoreno está por determinar.

Los valores de F_{rap} , F_{slow} , k_{rap} y k_{slow} fueron determinadas por mínimos cuadrados de las fracciones residuales acumulativas entre los valores experimentales y los calculados de $\ln(S_t/S_0)$ por la ecuación anterior.

PAHs	Fslow	Ffast	$K_{slow} (h^{-1})$	$K_{fast} (h^{-1})$
Phe	0.34	0.66	0.03	0.45
Antr	0.55	0.45	0.01	0.38
Ftno	0.41	0.59	0.01	0.29
Pyr	0.25	0.75	0.01	0.40

Tabla 5 : Valores experimentales ajustados obtenidos para el suelo B para las fracciones de rápida y lenta desorción.

De acuerdo con los valores obtenidos para la fracción rápida (F_{fast}), se llegó a la conclusión de que los PAHs más disponibles, y que por tanto serían degradados por los microorganismos con mayor facilidad, independientemente de la complejidad estructural, serían fenantreno y pireno. Los valores de la fracción lenta (F_{slow}) nos indicaron que serían antraceno y fluoranteno los que presentarían una mayor fracción resistente a biodegradación.

A tiempo final de la cinética de desorción con Tenax de los PAHs desde el suelo, éste se analizó para determinar la fracción resistente y poder comparar estos valores posteriormente con las fracciones resistentes a biodegradación. La extracción de los PAHs del suelo se realizó siguiendo el protocolo habitual. Los valores obtenidos fueron los siguientes:

PAHs	Fracción resistente a desorción con Tenax (mg/kg ss)
Fluoreno	
Fenantreno	13.67
Antraceno	12.57
Fluoranteno	19.96
Pireno	12.68

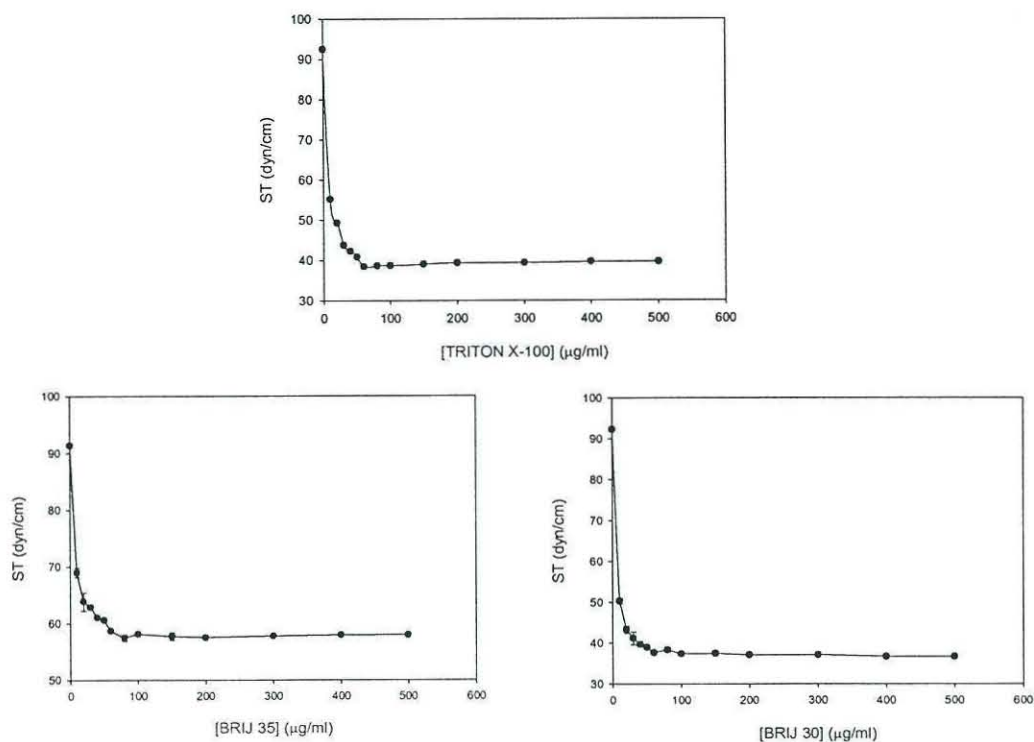
Tabla 6 : Fracción resistente a desorción con Tenax para el suelo B.

IV.3 – Determinación de la CMC de los tensioactivos.

Para la determinación de los valores de la CMC de los distintos tensioactivos se midió la tensión superficial de soluciones acuosas a distintas concentraciones del tensioactivo. Se tomó como valor de la CMC, aquella concentración del tensioactivo a partir de la cual el valor de tensión superficial permaneció constante.

Los tensioactivos estudiados fueron Tritón X-100, Brij 30 y Brij 35, todos ellos no iónicos. Las soluciones de dichos tensioactivos se prepararon en medio de mineralización por ser éste el que posteriormente se emplearía en los experimentos de mineralización y biodegradación.

Las medidas de tensión superficial se realizaron en un rango de concentraciones que abarcó desde 0 $\mu\text{g/ml}$ del tensioactivo (medida del medio de mineralización) hasta 500 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:



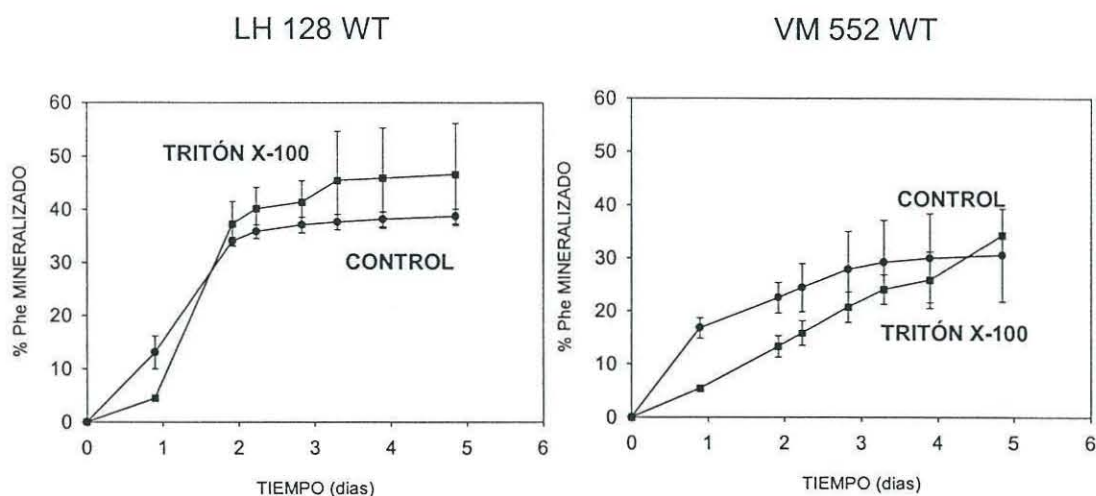
graf 3: Cálculo de la CMC de los tensioactivos.

IV.4 – Estudio de la toxicidad de los tensioactivos sobre las bacterias y su influencia en la biodisponibilidad de los PAHs en sistemas acuosos.

Para el estudio de la toxicidad de los tensioactivos sobre la población bacteriana encargada de la degradación de PAHs en sistemas acuosos se realizaron ensayos de mineralización donde el tensioactivo se encontraba en elevada concentración, unas cinco veces el valor de su CMC.

El motivo de la utilización de tan elevada concentración de tensioactivo es debido a que parte de éste queda absorbida en el suelo, con lo cual disminuye su concentración en la fase acuosa. El objetivo del uso de tan elevada concentración de los tensioactivos es que aunque sean absorbidos por el suelo, en la fase acuosa haya una concentración tal (superior a la CMC donde tenemos micelas) que permita la pseudo-solubilización de los PAHs que se encuentran adsorbidos en el suelo. Esta elevada concentración puede provocar efectos tóxicos en la población bacteriana.

La utilización de sistemas acuosos con cristales de PAHs se eligió para que hubiera total disponibilidad del contaminante y que no fuera este proceso el limitante de la biodegradación, solo la toxicidad por la presencia del tensioactivo si ésta existiera. El tensioactivo elegido para éste estudio fue el Tritón X-100, en una concentración de 500 µg/ml. El ensayo fue realizado en presencia de cristales de fenantreno en concentración por matraz igual a la encontrada en un gramo de suelo (1.5 mg en 70 ml de medio). El seguimiento de la mineralización se realizó con éste PAH, ya que tanto la bacteria LH 128 WT como la VM 552 WT son capaces de degradarlo



graf 4 :Mineralización de fenantreno en sistemas acuosos en presencia de Tritón X-100.

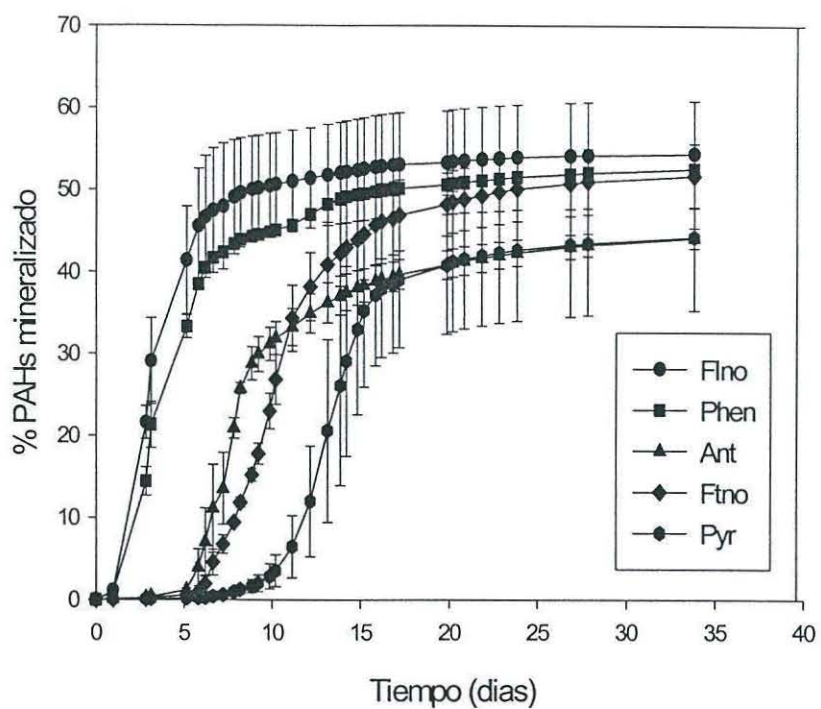
La velocidad de mineralización de fenantreno en el caso de la *Sphingomonas* LH 128 WT fue mucho mayor que en el caso de la *Mycobacterium* VM 552 WT. En ambos casos la mineralización en presencia de Tritón X-100 es ligeramente superior al control. En el ensayo realizado con la bacteria VM 552 WT, el control alcanzó su % máximo de mineralización al 30% aproximadamente mientras que en el caso del tratamiento con el tensioactivo éste % siguió en aumento. Esto pudo deberse a que por causa de la presencia del tensioactivo, la pseudo-solubilización del PAH fue mayor y por tanto su mineralización también.

El tensioactivo Tritón X-100 no resultó tóxico para ninguna de las dos estirpes utilizadas en los ensayos de mineralización de fenantreno en fase acuosa.

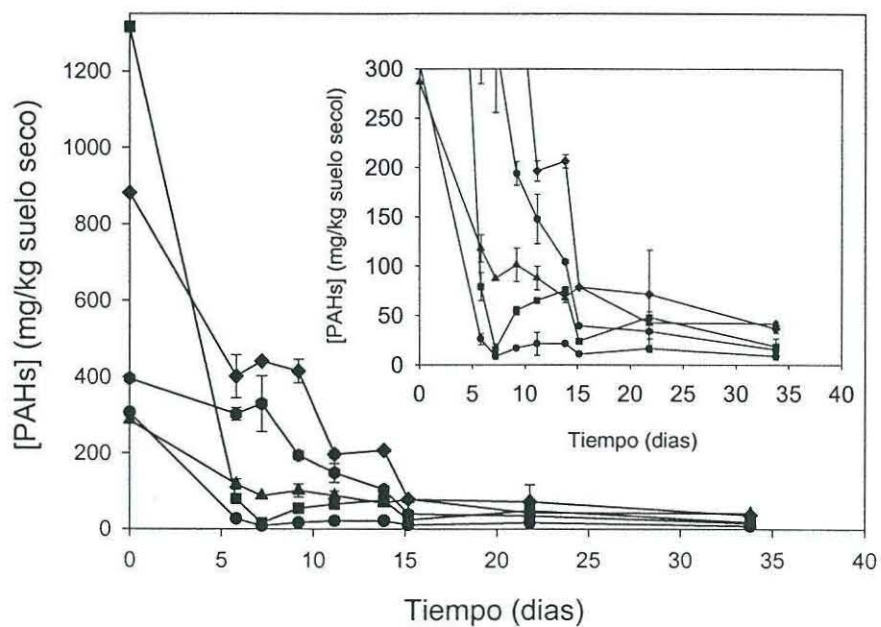
IV.5 – Estudio de la mineralización de PAHs por bacterias autóctonas en sistemas de suelo en suspensión.

El seguimiento de la mineralización de sistemas con suelo en suspensión se llevó a cabo con los mismos cinco PAHs de los que se estudió su cinética de desorción con Tenax.

Paralelamente a la mineralización, se siguió la biodegradación de matraces que se encontraban en las mismas condiciones que los sometidos a mineralización para el estudio de la curva de biodegradación y de la fracción resistente de los distintos PAHs.



graf 5 : Mineralización del suelo B en suspensión por las bacetrias autóctonas.



graf 6: Biodegradación del suelo B en suspensión por las bacterias autóctonas.

La mineralización de PAHs por las bacterias autóctonas del suelo siguió una secuencia igual a la de desorción de los PAHs, es decir, conforme éstos se van desorbiendo del suelo las bacterias lo van mineralizando. Esto además se produjo en orden de acuerdo a la complejidad de la molécula. Las bacterias mineralizaron primero aquellos PAHs de estructura molecular más simple, de dos y tres anillos (fluoreno, fenantreno y antraceno), los cuales a su vez son los que poseen una cinética de desorción más rápida y por tanto son los que la bacteria tiene más disponibles.

A pesar de que el fenantreno se desorbió con una cinética mayor que el fluoreno, éste se mineralizó en primer lugar debido a que la bacteria “seleccionó” el PAH con estructura molecular más simple y por tanto más fácil de biodegradar.

Las tasas máximas de mineralización que se obtuvieron para los distintos PAHs mostraron también la mineralización secuencial de los contaminantes. Las mayores tasas de mineralización se obtuvieron para fenantreno y fluoranteno, los cuales eran los que mayores valores de fracción de desorción rápida (K_{fast}) presentaban, es decir, que al desorberse la fracción lábil con mayor rapidez estos PAHs se encontraban más disponibles para la mineralización y la biodegradación.

Los valores que se obtuvieron como fracción resistente a biodegradación fueron del mismo orden aunque ligeramente superiores a las encontradas como fracción resistente a la desorción con Tenax. Esto pudo deberse a que en los ensayos de desorción no hubo presencia de bacterias (por el uso de formaldehído como biocida) mientras que en los experimentos de mineralización las bacterias pudieron adherirse a las partículas de suelo creando un “biofilm” que impidiera la desorción de la fracción lenta del contaminante y por tanto su biodegradación.

Por tanto, el objetivo principal de la utilización de tensioactivos en ensayos de mineralización y biodegradación de suelos en suspensión fue:

- impedir la adhesión de las bacterias a las partículas del suelo facilitando la desorción de la fracción lenta de los PAHs.
- provocar la pseudo-solubilización de los PAHs en fase acuosa donde serán biodegradados.

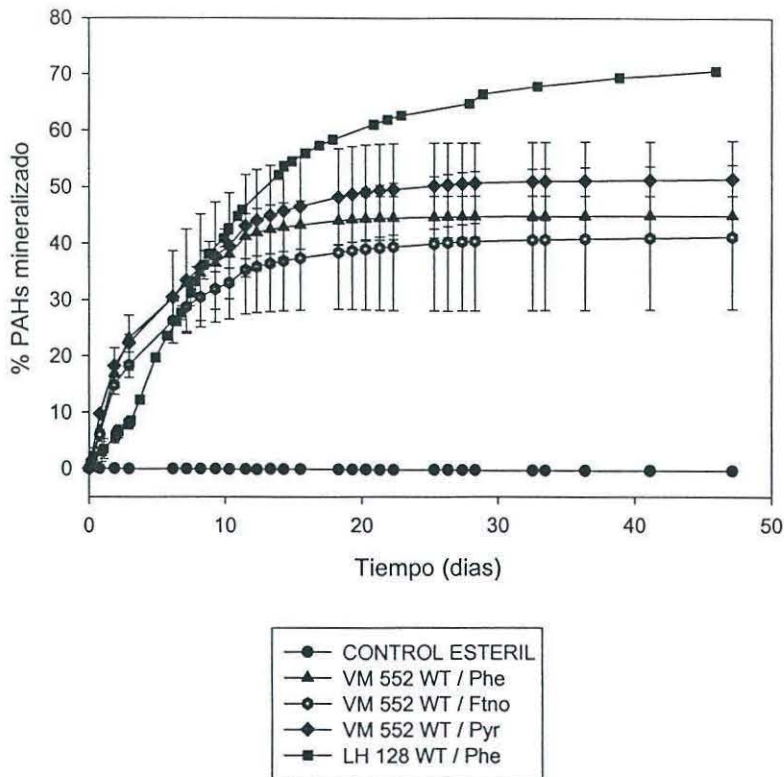
PAHs	[PAHs] SUELO B2 (mg/kg ss)	[PAHs] FRACCIÓN RESISTENTE (mg/kg ss)	TASAS MAXIMAS DE MINERALIZACIÓN (% mg/kg día)
Fluoreno	306.33 ± 5.65	8.20 ± 2.85	24.50 ± 4.18
Fenantreno	1315.84 ± 98.38	11.90 ± 3.12	96.07 ± 1.00
Antraceno	286.31 ± 9.10	41.44 ± 2.25	23.47 ± 1.68
Fluoranteno	881.50 ± 3.42	36.41 ± 4.29	56.50 ± 11.87
Pireno	395.22 ± 15.03	15.11 ± 0.56	29.70 ± 7.94

Tabla 7: Valores experimentales de la mineralización del suelo B en suspensión por las bacterias autóctonas.

IV.6 – Estudio de la mineralización de PAHs en sistemas de suelo en suspensión inoculados.

Con este ensayo se pretendió comparar las diferencias entre la mineralización del suelo por bacterias autóctonas y la mineralización por bacterias inoculadas. Para asegurarnos de que en cada sistema solo estaba presente la bacteria inoculada, se sometió el suelo a sucesivas esterilizaciones en autoclave.

El seguimiento de la mineralización de sistemas con suelo en suspensión se llevó a cabo con los PAHs que las bacterias con las que se inoculó eran capaces de degradar (fenantreno para la bacteria LH 128 WT y fenantreno, fluoranteno y pireno para la VM 552 WT). Paralelamente a la mineralización, se siguió la biodegradación de matraces que se encontraban en las mismas condiciones que los sometidos a mineralización (1g de suelo seco y 70 ml de medio de mineralización) para el estudio de la fracción resistente de los distintos PAHs.



graf 7: Mineralización del suelo B en suspensión e inoculado.

Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento diferente entre la mineralización del suelo por la población autóctona y la mineralización llevada a cabo por las estirpes de *Sphingomona* y *Mycobacterium* con las que se inoculó. Las diferencias también fueron apreciables en las mineralizaciones del suelo, bajo las mismas condiciones, de estas dos bacterias.

En el caso de la mineralización realizada por la bacteria VM 552 WT, la utilización de los distintos sustratos siguió una secuencia diferente a la que ocurrió en la cinética de desorción de los PAHs y en la mineralización del suelo por las bacterias autóctonas. Mientras que en estos dos procesos la secuencia de utilización de los diferentes PAHs fue la misma que el orden en el que se desorbieron (fenantreno, fluoranteno y pireno), en este caso de mineralización con bacterias inoculadas este orden se vió alterado ya los tres PAHs seleccionados fueron utilizados por la bacteria desde tiempo inicial del ensayo.

Esta diferencia puede ser debida a que la bacteria VM 552 WT funcionó de forma muy diferente a la población autóctona del suelo, posiblemente debido a su marcado carácter hidrofóbico..

Mientras que para la *Sphingomonas* LH 128 WT la mineralización del fenantreno alcanzó el 70 % para la *Mycobacterium* VM 552 WT en las mismas condiciones se alcanzó un 45 % aunque la tasa máxima de mineralización fue mayor en el caso de la VM 552 WT (101.61 ± 5.55) que para la bacteria LH 128 WT (78.58 ± 7.02). Probablemente esto fue debido a una mayor biodisponibilidad del sustrato para la bacteria VM 552WT debida al carácter hidrofóbico de su membrana.

PAHs	[PAHs] SUELO B (mg/kg ss)	[PAHs] FRACCIÓN RESISTENTE (mg/kg ss)	TASAS MAXIMAS DE MINERALIZACIÓN (% mg/kg día)
LH 128 WT / Phe			78.53 ± 7.02
VM 552 WT / Phe	1315.84 ± 98.38		101.61 ± 5.55
VM 552 WT / Ftno	881.50 ± 3.42	POR DETERMINAR	71.94 ± 7.63
VM 552 WT / Pyr	395.22 ± 15.03		31.05 ± 10.53

Tabla 8: Resultados experimentales de la mineralización del suelo B en suspensión e inoculado.

IV.7 – Estudio de la mineralización de PAHs en sistemas de suelo en suspensión inoculados y en presencia del tensioactivo Tritón X-100.

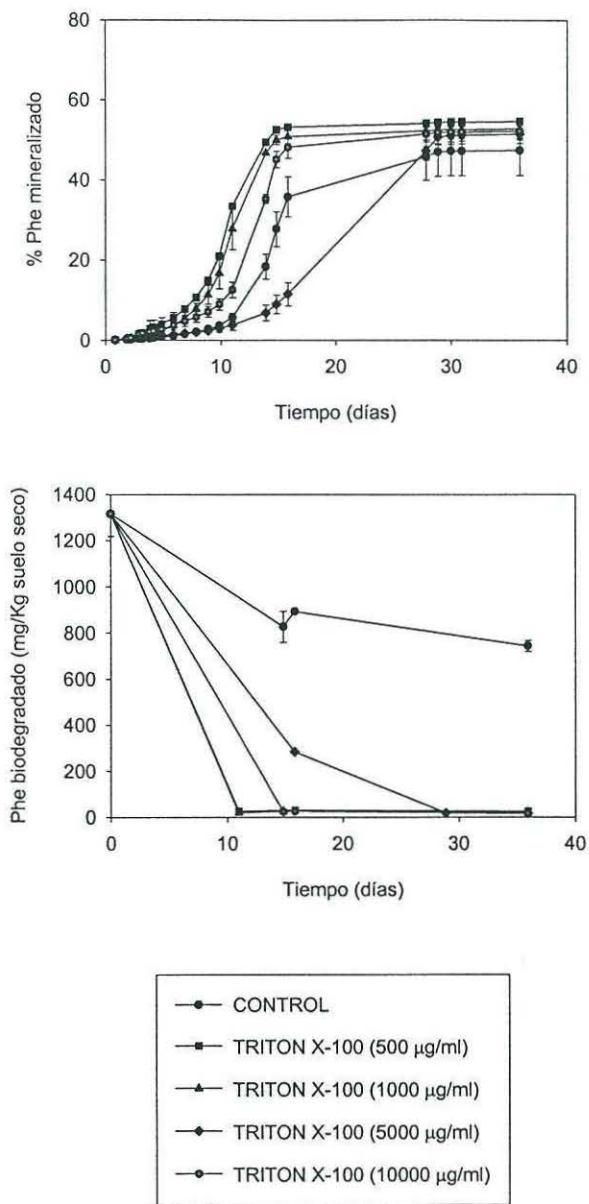
El objetivo que se persiguió con la realización de este ensayo fue probar que la velocidad de mineralización de los contaminantes aumentaba con la presencia del tensioactivo y comprobar si dicha velocidad se veía incrementada al aumentar la concentración del tensioactivo. También se trató de aumentar la desorción de los PAHs del suelo, y que por tanto la fracción resistente a biodegradación fuera menor.

El PAH elegido para el seguimiento de la mineralización fue el fenantreno debido principalmente a dos razones : a) la *Mycobacterium* VM 552 WT es capaz de degradarlo, b) es el PAH que se encuentra en mayor concentración en el suelo y por tanto el más representativo de la contaminación existente y c) debido a la alta concentración de tensioactivos utilizada, los cromatogramas obtenidos en el análisis del suelo presentaban gran cantidad de interferencias donde el fenantreno mostraba el pico mejor resuelto y por tanto mejor cuantificable .

Se eligió como bacteria para este ensayo la *Mycobacterium* VM 552 WT por ser la que mayor tasa de mineralización presentó en los experimentos de mineralización de fenantreno en sistemas de suelo en suspensión.

Para la realización de este experimento se eligió Tritón X-100 en concentraciones superiores a su CMC en varios ordenes de magnitud. Se eligieron las concentraciones de 500, 1000, 5000 y 10000 µg/ml.

El seguimiento de la biodegradación y la determinación de la fracción resistente de fenantreno fue determinada mediante el análisis de matraces que encontrándose en las mismas condiciones que los que se habían sometido a mineralización, fueron congelados a tiempos intermedios y a tiempo final de la biodegradación.



Graf 8 : Mineralización y biodegradación del suelo B en suspensión por la bacteria VM 552 WT en presencia de distintas concentraciones de Tritón X-100.

A pesar de que la mineralización del contaminante ocurrió en todos los casos, se observó un retraso en el inicio de la mineralización cuando la concentración de Tritón X-100 era muy elevada (5000 µg/ml).

Esto se debió a que la bacteria sufrió un período de aclimatación a este sistema, tras el cual la mineralización alcanzó un porcentaje de mineralización máxima similar al del resto de ocurrió de los tratamientos con el tensioactivo.

Los resultados obtenidos mostraron que la mineralización en presencia de distintas concentraciones de Tritón X-100 ocurrió en mayor porcentaje que en el caso del control. Este aumento en la extensión de la mineralización puede ser explicado por un incremento de la desorción de los PAHs del suelo cuando está presente el tensioactivo. Esto implica un aumento de la biodisponibilidad y por tanto de la biodegradación de los contaminantes al encontrarse estos en mayor concentración en la fase acuosa.

TRATAMIENTO	[Phe] SUELO B (mg/kg ss)	[Phe] FRACCIÓN RESISTENTE (mg/kg ss)	TASAS MAXIMAS DE MINERALIZACIÓN (% mg/kg día)	% DE MINERALIZACIÓN MAXIMA ALCANZADO
CONTROL		743.02 ± 24.60	70.56 ± 10.66	47.32 ± 6.24
TRITON X-100 (500 µg/ml)	1315.84	24.22 ± 8.22	115.28 ± 1.19	54.54 ± 0.99
TRITON X-100 (1000 µg/ml)	± 98.38	21.14 ± 4.78	109.69 ± 6.43	52.68 ± 2.26
TRITON X-100 (5000 µg/ml)		16.61 ± 1.68	38.78 ± 0.40	51.44 ± 1.49
TRITON X-100 (10000 µg/ml)		15.89 ± 6.78	108.34 ± 0.49	51.15 ± 3.03

Tabla 9: Valores experimentales obtenidos en la mineralización y biodegradación del suelo B en suspensión por la bacteria VM 552 WT en presencia de distintas concentraciones de Tritón X-100.

Este razonamiento esta de acuerdo con la curva de biodegradación que se obtuvo donde el control presentó mayor fracción resistente a biodegradación que en los distintos tratamientos del tensioactivo ya que en ausencia de éste la desorción de los PAHs fue menor.

Para todos los tratamientos con el tensioactivo, la fracción de fenantreno encontrada resistente a biodegradación fue del mismo orden de magnitud y menor a la obtenida para el control.

Las tasas máximas de mineralización (velocidades de mineralización) mostraron que efectivamente los tratamientos con tensioactivos aumentaban considerablemente la velocidad de mineralización del fenantreno en sistemas con suelo en suspensión.

Estas tasas también mostraron que el tratamiento con 5000 µg/ml de Tritón mostró una velocidad de mineralización mucho menor que el resto de los tratamientos e incluso con respecto al control debido al periodo de adaptación sufrido por la bacteria y anteriormente comentado.

IV.8 – Estudio de la mineralización de PAHs en sistemas de suelo en suspensión inoculados y en presencia de los tensioactivos Tritón X-100, Brij 30 y Brij 35.

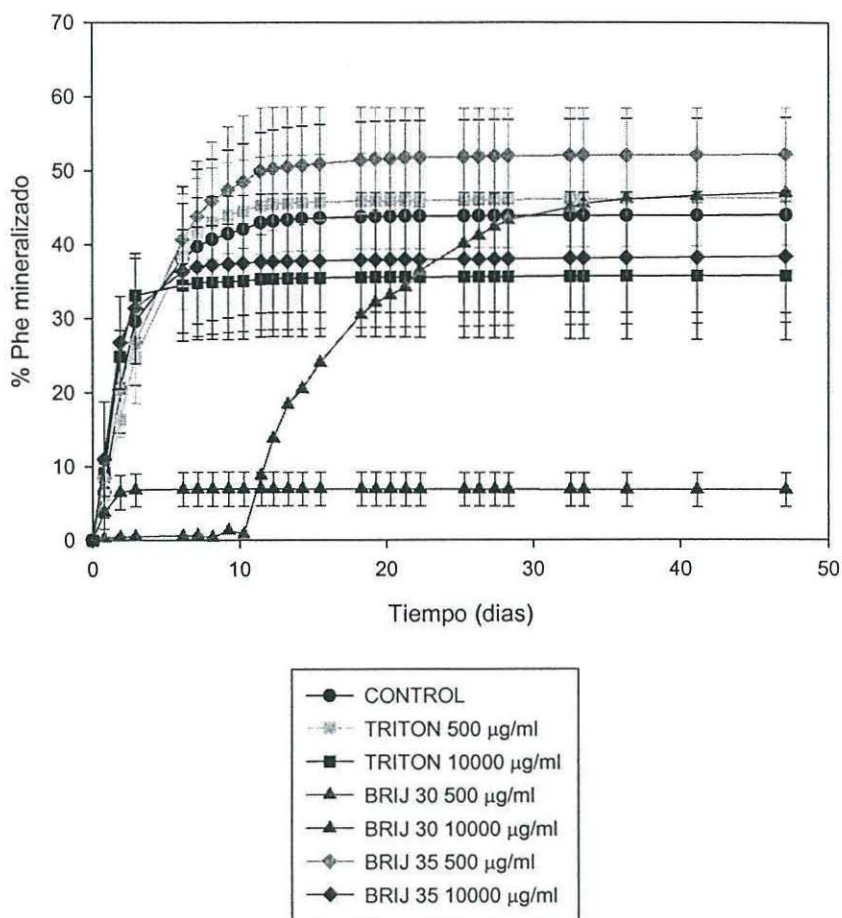
El objetivo perseguido con la realización de este ensayo fue probar que la velocidad de mineralización de los contaminantes aumentaba con la presencia de otros tensioactivos no iónicos además del Tritón usado con anterioridad en otros ensayos. Igualmente se trataba de aumentar la desorción de los PAHs del suelo, y que por tanto la fracción resistente a biodegradación fuera menor.

El PAH elegido para el seguimiento de la mineralización fue el fenantreno debido principalmente a dos razones : a) la *Mycobacterium* VM 552 WT es capaz de degradarlo, b) es el PAH que se encuentra en mayor concentración en el suelo y por tanto el más representativo de la contaminación existente y c) debido a la alta concentración de tensioactivos utilizada, los cromatogramas obtenidos en el análisis del suelo presentaban gran cantidad de interferencias donde el fenantreno mostraba el pico mejor resuelto y por tanto mejor cuantificable .

Se eligió como bacteria para este ensayo la *Mycobacterium* VM 552 WT por ser la que mayor tasa de mineralización presentó en los experimentos de mineralización de fenantreno en sistemas de suelo en suspensión.

Para la realización de este experimento se eligieron los tensioactivos Tritón X-100, Brij 30 y Brij 35 todos ellos no iónicos y en concentraciones superiores a su CMC en varios ordenes de magnitud. Se eligieron las concentraciones de 500 y 10000 $\mu\text{g/ml}$.

Las condiciones experimentales se mantuvieron igual a las del resto de ensayos, es decir, 1 g de suelo seco y 70 ml de medio de mineralización.



graf 9: Mineralización del suelo B en suspensión por la bacteria VM 552 WT en presencia de diferentes tensioactivos.

Como puede observarse en las curvas de mineralización obtenida para los distintos tratamientos, los porcentajes máximos de mineralización para el fenantreno se obtuvieron para las concentraciones más bajas de tensioactivo ensayadas, es decir, 500

$\mu\text{g/ml}$. En el caso del tratamiento con Brij 30 a $10000 \mu\text{g/ml}$, la mineralización no alcanzó el 10 % (6.78 ± 2.31) con lo cual se concluyó que este tensioactivo a la concentración de $10000 \mu\text{g/ml}$ resultaba tóxico para la estirpe VM 552 WT.

Con el tratamiento de Brij 30 a $500 \mu\text{g/ml}$ la mineralización del fenantreno se vió retardada, aunque una vez que comenzó alcanzó el mismo porcentaje de mineralización máxima que para los casos del Tritón X-100 y Brij 35 a las mismas concentraciones.

Este efecto podría tener las siguientes posibles explicaciones:

- Que la bacteria haya sufrido una fase de adaptación al medio en presencia del tensioactivo Brij 30 que en principio le resultaba tóxico.
- Que el Brij 30, al tener mayor parte hidrofóbica que hidrofílica haya potenciado que los PAHs, en este caso el fenantreno, se “particionen” más en la micela que en la fase acuosa con lo cuál no están disponibles para la bacteria.
- Que una vez que la micela se ha “saturado” de PAH, estos comienzan a estar en mayor proporción en la fase acuosa donde son mineralizados.
- Que el tensioactivo Brij 30 al ser más hidrofóbico que el resto de los tensioactivos empleados, es más tóxico porque interacciona más con la superficie hidrofóbica de la bacteria e impide la adhesión del microorganismo al PAH.

TRATAMIENTO	TASAS MAXIMAS DE MINERALIZACIÓN (% mg/kg día)	% DE MINERALIZACIÓN MAXIMA ALCANZADO
CONTROL	141.31 ± 39.72	43.96 ± 13.22
TRITON X-100 (500 µg/ml)	113.97 ± 37.56	46.27 ± 6.43
TRITON X-100 (10000 µg/ml)	168.9 ± 3.41	35.75 ± 8.68
BRIJ 30 (500 µg/ml)	84.62 ± 0.0	46.99 ± 0.0
BRIJ 30 (10000 µg/ml)	32.90 ± 1.22	6.78 ± 2.31
BRIJ 35 (500 µg/ml)	112.71 ± 4.38	52.13 ± 6.34
BRIJ 35 (10000 µg/ml)	125.64 ± 2.27	38.34 ± 8.89

Tabla 10: Valores experimentales de la mineralización del suelo B en suspensión por la bacteria VM 552 WT en presencia de diferentes tensioactivos.

Aunque los porcentajes mayores de mineralización del fenantreno se obtuvieron para la concentración de 500 µg/ml de tensioactivo, las velocidades mayores de mineralización se obtuvieron para la concentración de 10000 µg/ml (excepto para el Brij 30) ya que al encontrarse éste en mayor concentración, la cantidad absorbida en el suelo permite que en la fase acuosa esté aún en concentración superior a su CMC lo cual favorece la desorción de los PAHs a la fase acuosa donde serán biodegradados.

V. CONCLUSIONES

Tras el desarrollo experimental sobre la aplicación de tensioactivos a técnicas de biorrecuperación de suelos contaminados con Creosota las conclusiones obtenidas para éste estudio fueron las siguientes:

1. El estudio de las cinéticas de desorción de los contaminantes proporciona información sobre la extensión en la que ocurre la biodegradación de estos.
2. La biodegradación de PAHs por las bacterias autóctonas del suelo sigue una secuencia igual a la ocurrida en la desorción con Tenax, mineralizándose en primer lugar aquellos que tenían un mayor valor para la fracción de desorción rápida (K_{fast}).
3. Las concentraciones de PAHs obtenidas como fracción resistente a biodegradación fueron del mismo orden de magnitud aunque ligeramente superiores a las encontradas como fracción resistente a la desorción con Tenax, debido entre otras causas a la formación de biofilm que podría ser la causa de la desorción total del contaminante.
4. La inoculación de sistemas de suelos en suspensión con bacterias del género *Mycobacterium* aumento las tasas máximas de mineralización de los PAHs, es decir, su velocidad de desaparición del suelo.
5. El empleo de tensioactivos no resultó tóxico para las bacterias aunque en algunos casos sí se observó un período de aclimatación de los microorganismos a las nuevas condiciones experimentales.
6. La utilización de tensioactivos en sistemas de suelo en suspensión aumentó considerablemente la velocidad de mineralización de los contaminantes debido al aumento de la desorción de los PAHs.

7. El tensioactivo Brij 30, con alta fracción hidrofóbica, resultó tóxico para la bacteria VM 552 WT debido a la mayor interacción con su superficie hidrofóbica de la bacteria cuando éste fue empleado en concentraciones muy superiores a su CMC.
8. Aunque los porcentajes mayores de mineralización del fenantreno se obtuvieron para la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ de tensioactivo, las velocidades mayores de mineralización se obtuvieron para la concentración de 10000 $\mu\text{g/ml}$ (excepto para el Brij 30 por la conclusión citada anteriormente) ya que al encontrarse el tensioactivo en mayor concentración, la cantidad absorbida en el suelo permite que en la fase acuosa este aún en concentración mayor a su CMC. Esto favorece la desorción de los PAHs y por tanto su biodegradación en la fase acuosa.

VI. BIBLIOGRAFÍA.

Alexander,M. (1995) “Biodegradation and bioremediation”. *Academic Press, San diego,CA.*

Aronstein,B.N and Alexander,M. (1993) “Effect of a non-ionic surfactant added to the soil surface on the biodegradation of aromatic hydrocarbons within the soil”. *Applied Microbiology Biotechnology* 39, 386-390.

Aronstein,B.N. and Alexander,M. (1992) “Surfactants at low concentrations stimulate biodegradation of sorbed hydrocarbons in samples of aquifer sands and soil slurries”. *Enviromental Toxicology and Chemistry* 11, 1227-1233.

Aronstein,B.N; Calvillo,Y.M and Alexander,M (1991) “Effect of surfactants al low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil” *Enviromental Science & Technology*25, 1728-1731.

Chu,W and So,W.S. (2001) “Modeling the two stages of surfactant-aided soil washing”. *Water Res.* 35, 761-767.

Colores,G.M; Macur, R.E; Ward,D.M and Inskeep,W.P. (2000) “Molecular analysis or surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon-contaminated soil”. *Applied and Enviromental Microbiology* 66, 2959-2964.

Cornelissen,G; Rigterink,H, Ferdinandy,M.M.A and Van Noort,P.M: (1998) “Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation”. *Enviromental Science & Technology* 32, 966-970.

Cornelissen,G; Rigterink,H; Ten Hulscher,D.E.M; Vrind,B.A and Van Noort,P. (2001) “A simple Tenax extration method to determine the availability of sediment-sorbed organic compounds”. *Enviromental Toxicology and Chemistry* 120, 706-711.

Cornelissen,G; Van Noort,P and Goverst, H. (1997) “Desorption kinetics of Chlorobenzenes, Polycyclic aromatic hydrocarbons, and Polychlorinated Biphenyls: sediment extraction with Tenax and effects of contact time and solute hydrophobicity”. *Enviromental Toxicology and Chemistry* 16, 1351-1357.

Dean,S.M; Jin,Y; Wilson,S.V and Radosevich,M. (2001) “ Phenanthrene degradation in soil Co-inoculated with Phenanthrene-degrading and biosurfactant-producing bacteria”. *J.Environ.qual.* 30 1126-1133.

Eweis,J.B; Ergas,S.J; Chang,D and Schroeder,E. (1999) “Principios de biorrecuperación: Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos”. *WCB/ Mc Graw-Hill.*

García,J.M; Wick,L.Y and Harms,H. (2001) “Influence of the nonionic surfactant Brij 35 on the bioavailability of solid and sorbed Dibenzofuran”. *Enviromental Science & Technology.*

García-Junco,M; De Olmedo,E and Ortega-Calvo,J.J. (2001) “Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid (NAPL)-dissolved Phenanthrene to the biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosas* 19SJ”. *Enviromental Mycobiology* 3(9), 561-569.

García-Junco,M; Gomez-Lahoz,C;Niqui-Arroyo,J.L and Ortega-Calvo,J.J. (2003) “Biosurfactant-and biodegradation-enhanced partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from nonaqueous-phase liquids”. *Enviromental Science & Technology.*

Gert-Jan de Maagd,P; Sinnige,T.L and Schrap,S.M. (1998) “ Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons for two lake sediments: influence of the bactericide sodium azide”. *Enviromental Toxicology and Chemistry* 17, 1899-1907.

Gert-Jan de Maagd,P; Ten Hulscher,D.E.M; Van Den Heuvel,H; Opperhuizen,A and Sijm.D. (1998) "Physicochemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons: aqueous solubilities, n-Octanol/water partition coefficients, and Henry's law constants". *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 251-257.

Kim, I.S; Park,J and Kim,K. (2001) "Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry". *Applied Geochemistry* 16 1419-1428.

Laha, S and Luthy,R.(1992) "Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems". *Biotechnology and Bioengineering* 40, 1367-1380.

Lahlou,M; Harms,H; Springael,D and Ortega-Calvo,JJ. (2000) "Influence of soil components on the transport of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria through saturated porous media". *Environmental Science & Technology* 34, 3649-3656.

Liu,Z; Jacobson,A.M and Luthy,R.G. (1995) "Biodegradation of Naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems". *Applied and Environmental Microbiology* 61, 145-151.

Liu,Z; Laha,S and Luthy,R. (1991) "Surfactant solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in soil-water suspensions". *Water Science & Technology* 23, 475-485.

Marchesi,J.R; White,G.F, Russell,N.J and House,W.A. (1997) "Effect of river sediment on the biodegradation kinetics of surfactant and non-surfactant compound". *Fems Microbiology Ecology* 23, 55-63.

Niqui-Arroyo,J.L; Bueno-Montes,M and Ortega-Calvo,J.J. (2003). "Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in clay-rich, creosote polluted soils". 8^a *International FKZ/TNO Conference on contaminated soil* (CONSOIL). 12-16 Mayo de 2003, Gante, Bélgica.

Ortega-Calvo,J.J and Sainz-Jimenez,C. (1997).” Microbial degradation of Phenanthrene in two European cathedrals”. *Fems Microbiology Ecology* 22, 95-101.

Resina-Pelfort,O; García-Junco,M; Ortega-Calvo,J.J; Comas-Riu,J and Vives-Rego,J. (2003).”Flow cytometry discrimination between bacteria and clay-humic acid particles during grown-linked biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ”. *Fems Microbiology Ecology* 43, 55-61.

Roch,F. and Alexander,M. (1995) “Biodegradation of hidrofobic compounds in the presence of surfactants”. *Enviromental Toxicology and Chemistry* 14, 1151-1158.

Smith,M; Lethbridge,G and Burns,R.G. (1997). “Bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils”. *Fems Microbiology Ecology* 152, 141-147.

Tang,J; Carroquino,M.J; Robertson,B:K and Alexander,M. (1998) “Combined effect of sequestration and bioremediation in reducing the bioavailability of polycyclic aromatic hidrocarbons in soil”. *Enviromental Science & Technology* 32, 3586-3590.

Thibault,S.L; Anderson,M and Frankenberger,W.T. (1996) “Influence of surfactants on Pyrene desorption and degradation in soils” *Applied and Enviromental Microbiology* 62, 283-287.

Tiehm,A. (1993) “Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants”. *Applied and Enviromental Microbiology* 60, 258-263.

Tiehm,A; Stieber,M; Werner,P and Frimmel,F.H. (1997) “Surfactant-enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil”. *Enviromental Science & Technology* 31, 2570-2576.

Tsomides,H.J; Hughes,J.B; Thomas,J.M and Herb Ward,C. (1995) “ Effect of surfactant addition on Phenanthrene biodegradation in sediments”. *Enviromental Toxicology and Chemistry* 14, 953-959.

Volkering,F; Breure,A.M and Rulkens,W.H.(1998) “Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation”. *Biodegradation* 8, 401-417.

Weissenfels,W.D; Klewer,H-J and Langhoff,J. (1992) “Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity”. *Applied Microbiology Biotchnology* 36, 689-696.

Willumsen,P.A and Arvin,E. (1999) “Kinetics of degradation surfactant-solubilized Fluotanthene by a *Sphingomonas paucimobilis*”. *Enviromental Science & Technology* 33, 2571-2578.

Wodzinski,R.S and Coyle,J.E. (1974) “Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria”. *Applied Microbiology*, 1081-1084.

Yeom,I.T; GhoshM.M and CoxC.D. (1996) “Kinetic aspects of surfactant solubilization of soil-bound polycyclic aromatic hidrocarbons”. *Enviromental Science & Technology* 30, 1589-1595.